



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT  
FÜR TROPENMEDIZIN



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Hamburg University of Applied Sciences

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**

Vergleichende Evaluierung von Methoden zur quantitativen Auswertung von *in vitro*  
Infektionen mit Leishmania-Parasiten

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie  
zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science

vorgelegt von  
**Janika Bartsch**  
**Matrikelnummer 2052063**

Hamburg  
10. Februar 2015

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** PD Dr. rer. nat. Joachim Clos (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg (AG Clos, Leishmaniasen).

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Herrn Prof. Dr. André danke ich für die hochschulinterne Betreuung meiner Arbeit sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Joachim Clos, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht, mir jederzeit beratend zur Seite stand und nie an meine Fähigkeiten gezweifelt hat.

Ganz herzlich danken möchte ich außerdem Paloma Tejera Nevado und Eugenia Bifeld, die mich bei der Planung und Durchführung meiner Experimente unterstützt haben sowie der gesamten AG Clos, die mir eine sehr schöne Zeit im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin bereitet hat.

Nicht zuletzt gebührt meiner Mutter Dank, da sie während des Studiums nicht nur finanziell, sondern auch emotional immer für mich da war.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1 Leishmaniose.....	10
1.2 Behandlungsmöglichkeiten.....	12
1.3 <i>Screening</i> -Methoden zur Entwicklung neuer Wirkstoffe .....	13
1.4 Maus-Knochenmarks-Makrophagen und THP1-Zellen .....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>18</b>
2.1 Verbrauchsmaterial.....	18
2.2 Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologische Kits .....	19
2.3 Verwendete Chemikalien .....	19
2.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....	19
2.5 Verwendete Zellen .....	20
2.6 Zellkulturmedien.....	20
2.7 Antibiotika.....	20
2.8 Nährmedien und ihre Zusammensetzung .....	21
2.9 Primer und Sonden .....	21
2.10 Geräte und Software .....	22
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>23</b>

<b>3.1</b>	<b>Zellkulturtechniken</b> .....	<b>23</b>
3.1.1	Zellkultur von Leishmanien.....	23
3.1.2	Kryokonservierung von Leishmanien.....	23
3.1.3	Zellkultur von THP1-Zellen .....	24
3.1.4	Kryokonservierung von THP1-Zellen .....	24
3.1.5	Isolierung und Kultivierung von Maus-Knochenmarks-Makrophagen.....	24
3.1.6	Zellzahlbestimmung mittels CASY Cellcounter & Analyser .....	25
3.1.7	Zelldichtebestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	25
<b>3.2</b>	<b><i>In vitro</i>-Infektionsexperimente</b> .....	<b>26</b>
3.2.1	Aussäen von THP1-Zellen .....	26
3.2.2	Aussäen von Maus-Knochenmarks-Makrophagen .....	27
3.2.3	Infektion von THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen .....	27
3.2.4	Behandlung der infizierten Maus-Knochenmarks-Makrophagen und THP1-Zellen mit Miltefosin.....	28
<b>3.3</b>	<b>Mikroskopische Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.3.1	Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung.....	28
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung von Infektionsrate und Parasitenlast.....	30
<b>3.4</b>	<b>Durchflusszytometrie</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>Isolierung von genomischer DNA</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Semiquantitative <i>real-time</i> PCR</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Datenverarbeitung</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich von THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen</b> .....	<b>38</b>
4.1.1	Infektionsrate und Parasitenlast .....	38
4.1.2	Verträglichkeit von Miltefosin.....	39
<b>4.2</b>	<b>Mikroskopische Auswertung</b> .....	<b>40</b>
4.2.1	Bestimmung von Infektionsrate und Parasitenlast nach Behandlung mit Miltefosin.....	40
4.2.2	Vergleichende Betrachtung von Zellen im DAPI- und RFP-Kanal .....	41
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie</b> .....	<b>42</b>
4.3.1	Überprüfung der Eignung von CFSE für das Versuchsmodell .....	42
4.3.2	Ermittlung der Infektionsrate nach Behandlung mit Miltefosin.....	46
4.3.2.1	Infektionsverhältnis 1:6 .....	48
4.3.2.2	Testen unterschiedlicher Infektionsverhältnissen an THP1-Zellen.....	49

4.3.2.3	Infektionsverhältnis 1:3 .....	49
4.3.2.4	Infektionsverhältnis 2:1 für THP1-Zellen.....	51
4.3.2.5	Reduktion der CFSE-Konzentration .....	52
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der Parasitenlast mittels semiquantitativer <i>real-time</i> PCR .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>THP1-Zellen vs. Maus-Knochenmarks-Makrophagen.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2</b>	<b>Semiquantitative <i>real-time</i> PCR.....</b>	<b>58</b>
5.2.1	Semiquantitative <i>real-time</i> PCR vs. Mikroskopie .....	58
5.2.2	Vergleich mit anderen PCR-Verfahren .....	60
<b>5.3</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>QUELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Promastigote <i>L. donovani</i> . .....	10
<b>Abbildung 2:</b> Lebenszyklus der Leishmanien. ....	11
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung des Zählprinzips in einem Quadrat der Neubauer-Zählkammer	26
<b>Abbildung 4:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines infizierten Maus-Knochenmarks-Makrophagen.. ....	30
<b>Abbildung 5:</b> Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion .....	32
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung des Prinzips der <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Sonde .....	34
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich von THP1-Zellen und BMMs bezüglich Parasitenlast und Infektionsrate .....	38
<b>Abbildung 8:</b> Vergleich der Morphologie von THP1-Zellen und BMMs unter Einfluss von Miltefosin .....	39
<b>Abbildung 9:</b> Mikroskopische Auswertung von Infektionsraten und Parasitenlast nach Behandlung mit Miltefosin. ....	40
<b>Abbildung 10:</b> Vergleichende Darstellung einer intakten und einer zerstörten Makrophagenzelle.. ....	41
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich von mit CFSE markierten und nicht markierten Leishmanien. ...	43
<b>Abbildung 12:</b> Unterscheidung von mit CFSE markierten und nicht markierten Parasiten mittels Durchflusszytometrie. ....	44
<b>Abbildung 13:</b> Differenzierung von infizierten und nicht infizierten THP1-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	44
<b>Abbildung 14:</b> Differenzierung von infizierten und nicht infizierten Makrophagen mittels Durchflusszytometrie. ....	45
<b>Abbildung 15:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen infiziert mit CFSE-markierten <i>L. donovani</i> 1SR HSP23 -/- .....	46
<b>Abbildung 16:</b> Vorgehensweise zur Auswertung der Durchflusszytometrie.....	47
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der Infektionsrater die mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung bei Infektionen im Verhältnis 1:6 ermittelt wurden.. .....	48
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Infektionsraten die mittels Durchflusszytometrie bei Infektionen in unterschiedlichen Verhältnissen ermittelt wurden. ....	49
<b>Abbildung 19:</b> Vergleich der Infektionsraten die bei Infektionen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung ermittelt wurden .....	50

**Abbildung 20:** Relative Darstellung der Infektionsraten die bei Infektionen von BMMs im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung ermittelt wurden..... 51

**Abbildung 21:** Infektionsraten die bei der Infektion von THP1-Zellen im Verhältnis 2:1 mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden..... 52

**Abbildung 22:** Infektionsraten die bei der Infektion von BMMs im Verhältnis 1:3 und mit reduzierter CFSE-Konzentration mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden ..... 53

**Abbildung 23:** Vergleich der relativen Parasitenlasten die bei Infektionen von THP1-Zellen und BMMs mittels mikroskopischer Auswertung und semiquantitativer *real-time* PCR ermittelt wurden..... 54

**Abbildung 24:** pH-abhängige Fluoreszenzintensität von CFSE. .... 64

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Auflistung der Verbrauchsmaterialien ..... 18

**Tabelle 2:** Auflistung der Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologischen Kits..... 19

**Tabelle 3:** Auflistung der häufig verwendeten Puffer und Lösungen ..... 19

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten Zellen ..... 20

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien ..... 20

**Tabelle 6:** Auflistung der verwendeten Antibiotika mit Konzentration der Stocklösung .. 20

**Tabelle 7:** Auflistung aller verwendeten Zellarten mit den zugehörigen Nährmedien und deren Zusammensetzung..... 21

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendeten Primer und Sonden mit Sequenz und Größe des PCR-Produkts ..... 21

**Tabelle 9:** Auflistung der Geräte und Computerprogramme ..... 22

**Tabelle 10:** Pipettierschema für die semiquantitative *real-time* PCR..... 36

**Tabelle 11:** Temperaturprofil für die semiquantitative *real-time* PCR..... 36

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BMMs	engl. <i>bone marrow-derived macrophages</i> , Maus-Knochenmarks-Makrophagen
Bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CFDA-SE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	engl. <i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (z. dt. DNS)	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> (und andere)
FC	engl. <i>flow cytometry</i> , Durchflusszytometrie
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
<i>fwd</i>	engl. <i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
h	Stunde (n)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Zweifach destilliertes Wasser
HEPES	4-2-Hydrogenethylpiperazin-1-ethansulfonsäure
iFCS	inaktiviertes fötales Kälberserum
igG	Immunglobulin
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>L.d.</i>	<i>Leishmania donovani</i>
M	Mol pro Liter (molar)

Min	Minute (n)
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<i>rev</i>	engl. <i>reverse</i>
Sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
U	engl. <i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität) Definition: 1U = 1 $\mu$ mol/min
ÜS	Überstand
VL	viszerale Leishmaniose
vs.	lat. <i>versus</i>
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
$\beta$	beta

# 1 Einleitung

## 1.1 Leishmaniose

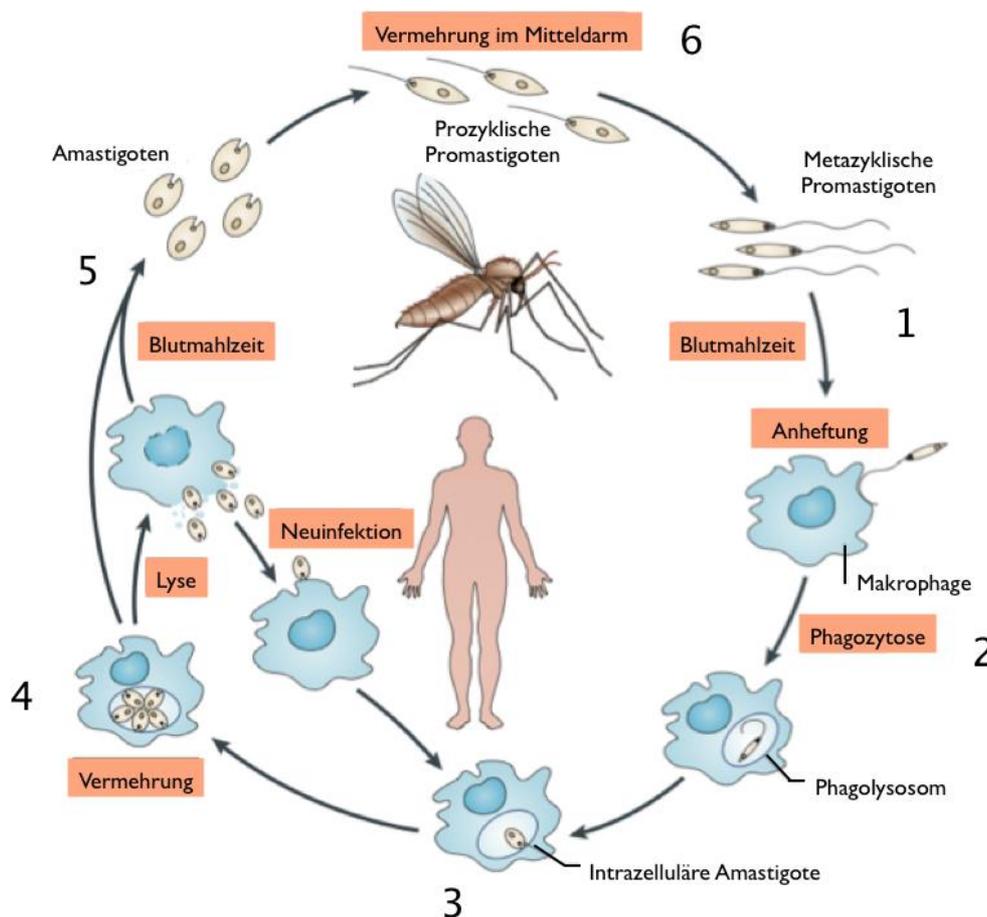
Leishmaniose wird von Protozoen der Gattung *Leishmania* (*L.*) (Beispiel siehe Abb. 1) verursacht. Dies sind trypanosomatide Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida.<sup>1</sup> Der Kinetoplast, der dieser Ordnung ihren Namen gegeben hat, ist ein Netzwerk aus zirkulärer DNA innerhalb des einzigen Mitochondriums der Zelle. Er trägt ca. 15% der zellulären DNA. Die Leishmaniose gehört mit etwa 12 Millionen Erkrankten zu den weltweit am meisten vernachlässigten parasitischen Infektionskrankheiten. Nach Malaria ist sie die zweithäufigste parasitenbedingte Todesursache. Über 350 Millionen Menschen in 98 Ländern sind dem Risiko einer Infektion ausgesetzt.<sup>2,3</sup> Der Krankheitserreger wird von weiblichen Sandmücken der Gattungen *Lutzomyia* und *Phlebotomus* übertragen.



**Abbildung 1: Promastigote *L. donovani*.**  
*L. donovani* Promastigote, gefärbt nach Giemsa, Hellfeld-Mikroskopie, 100x Vergrößerung, Größenbalken = 10 µm

Je nach *Leishmania*-Art manifestieren sich verschiedene Formen der Leishmaniose. Es wird zwischen kutaner, mukokutaner und viszeraler Leishmaniose unterschieden. Die kutane Leishmaniose wird unter anderem von *L. major* und *L. tropica* verursacht und ist überwiegend im Mittleren Osten, Mittelmeerraum, Zentralasien und Afrika verbreitet. Bei dieser Form bildet sich zunächst eine Papula um die Einstichstelle, die sich zu einer ulzerierenden Läsion entwickeln kann. In den meisten Fällen heilt diese Form der Leishmaniose von selbst ab. Jedoch verbleibt häufig entstellendes Narbengewebe. Die mukokutane Leishmaniose, welche nur in Lateinamerika vorkommt, wird überwiegend von *L. brasiliensis* verursacht. Kennzeichnend sind destruktive Entzündungen von Mund- und Rachenraum. Irreversible Entstellungen im Gesicht sind häufig die Folge. Unbehandelt kann die Infektion tödlich verlaufen. Bei einer Infektion mit *L. donovani* und *L. infantum* prägt sich die viszerale Leishmaniose (VL) aus (auch Kala-Azar). Die Symptome sind Müdigkeit, Anorexie, Gewichtsverlust und starke Vergrößerung von Leber und Milz. Unbehandelt führt

die viszerale Leishmaniose in 90% der Fälle zum Tode. Verbreitet ist diese Form überwiegend in Indien, Bangladesch, Nepal und Ostafrika. Sie tritt aber auch im Mittelmeerraum auf.<sup>4,5,6</sup> Die geschätzten jährlichen Neuerkrankungen betragen für kutane Leishmaniose 0,7 - 1,2 Millionen und für viszerale Leishmaniose 0,2 - 0,4 Millionen. Die Zahl der Todesfälle beträgt 20.000 bis 40.000 pro Jahr.<sup>7</sup>



**Abbildung 2: Lebenszyklus der Leishmanien.**

1. Durch die Blutmahlzeit der Sandmücke gelangen promastigote Parasiten in den Blutkreislauf des Menschen. 2. Die Parasiten werden von Makrophagen phagozytiert. 3. Umwandlung von der promastigoten in die amastigote Form im Phagolysosom. 4. Durch die Vermehrung der intrazellulären Amastigoten kommt es zur Lyse der Wirtszelle. 5. Bei einer weiteren Blutmahlzeit der Sandmücke werden die Amastigoten wieder aufgenommen. 6. Umwandlung der Amastigoten in Promastigoten und Vermehrung im Mitteldarm der Sandmücke. Modifiziert nach Kaye P. und Scott P. (2011)<sup>8</sup>

Der Entwicklungszyklus der Leishmanien ist in Abb. 2 dargestellt. Er verläuft in zwei Phasen. Im ersten (extrazellulären) Stadium liegt der Erreger in der promastigoten infektiösen Form vor. In der zweiten (intrazellulären) Phase liegt er in amastigoter pathogener Form vor. Promastigoten haben einen länglichen Körper und eine lange bewegliche Geißel. Amastigoten weisen eine ovale Körperform mit stark verkürzter Geißel auf. Der Entwick-

lungszyklus beginnt, wenn bei der Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke infektiöse promastigote Parasiten in die Haut des Wirtsorganismus injiziert werden. Anschließend werden sie von mononukleären Zellen (Makrophagen, Monozyten), dendritischen Zellen oder neutrophilen Granulozyten aufgenommen. Die Vermehrung erfolgt jedoch ausschließlich in mononukleären Zellen.<sup>8,9</sup> Innerhalb dieser werden die Parasiten vom Phago-lysosom umhüllt und wandeln sich hier innerhalb von 24 Stunden in die amastigote Form um. Diese vermehrt sich durch longitudinale Teilung. Dies führt schließlich zur Lyse der Wirtszelle und Freisetzung des Erregers. Der Erreger kann nun wiederum neue Zellen infizieren.<sup>6</sup> Bei einer weiteren Blutmalzeit der Sandmücke können die im Blut des Menschen enthaltenen Parasiten erneut auf diese übertragen werden. Im Dünndarm der Mücke differenzieren sich die amastigoten Zellen innerhalb von 24 Stunden in die prozyklische promastigote Zellform. Über das Oberflächenmolekül Lipophosphoglykan (LPG), welches nur in diesem nicht-infektiösen Stadium gebildet wird, heften sich die Parasiten an den Microvillisaum des Mitteldarmepithels. So wird das Ausscheiden über den Enddarm verhindert. Anschließend erfolgt die Umwandlung in für Säugetiere hoch-infektiöse metazyklische Promastigoten, welche aktiv in die Mundregion der Sandmücke wandern, wo sie bei der nächsten Blutmahlzeit erneut übertragen werden.<sup>9,10</sup>

## 1.2 Behandlungsmöglichkeiten

Es gibt bisher keine verlässlichen und sicheren Therapiemöglichkeiten, die zur vollständigen Eliminierung des Parasiten und damit völligen Heilung des Patienten führen. Die preiswertesten und daher bis heute am meisten verwendeten Medikamente gegen alle Formen der Leishmaniose wie Glucantime® und Pentostam® basieren auf fünfwertigem Antimon. Seit den 1970ern hat sich jedoch eine zunehmende Antimonresistenz entwickelt, die in Indien zu einer hohen Rate an Fehlschlägen (>60%) bei der Behandlung der Kala-Azar, der schwerwiegendsten Form der Leishmaniose, geführt hat.<sup>11, 12, 13</sup>

Das erste wirksame, oral verabreichte Medikament ist Miltefosin (Hexadecylphosphocholin). Es wurde ursprünglich als antineoplastischer Arzneistoff (Anti-Krebs-Mittel) entwickelt und hat sich mit einer Heilungsrate von über 95% für die Behandlung von VL in Indien als sehr effektiv erwiesen. Es ist sehr verträglich und ist außerdem ein wirksames Medikament gegen, durch *L. Viannia panamensis* verursachte, kutane Leishmaniose (91% Heilungsrate). Gegen die durch *L. Viannia braziliensis* verursachte kutane Leishmaniose

wirkt es jedoch mit einer Heilungsrate von 53% nur unzuverlässig.<sup>14</sup> Miltefosin darf aufgrund seiner, in Tieren nachgewiesenen, Teratogenität nicht von werdenden Müttern eingenommen werden.<sup>6</sup> Als problematisch zu betrachten sind außerdem die verhältnismäßig hohen Kosten des Wirkstoffes in Anbetracht der meist ärmlichen Verhältnisse in den Regionen, in denen die Leishmaniose verbreitet ist. Zusätzlich besteht die Gefahr einer Resistenzentwicklung bei weit verbreiteter und häufiger Anwendung.<sup>15</sup>

Ein äußerst wirksames Medikament gegen VL ist Amphotericin B. Die Heilungsrate beträgt in Bihar und Indien zwischen 96% und 100%. Es muss jedoch über einen längeren Zeitraum (20 – 30 Tage) täglich intravenös verabreicht werden, was in Regionen mit schlechten Hygienestandards und unzureichend ausgestatteten medizinischen Einrichtungen häufig zu Infektionen führt. Außerdem sind weitere Nebenwirkungen, wie Azotämie, Anämie oder Hypokaliämie nicht selten zu beobachten. Die Heilungsrate von Amphotericin B als liposomales Präparat ist unwesentlich geringer (93% - 97% in Bihar und Indien). Von Vorteil sind dafür die kürzere Behandlungszeit (5 - 10 Tage) und die geringere Häufigkeit der auftretenden Nebenwirkungen.<sup>6, 16, 17, 18</sup>

### **1.3 Screening-Methoden zur Entwicklung neuer Wirkstoffe**

Im menschlichen Körper existiert fast nur das intrazelluläre Amastigotenstadium, welches verantwortlich für die Manifestation der Leishmaniose ist. Da sich der Metabolismus von Pro- und Amastigoten unterscheidet, müssen Medikamente darauf ausgelegt sein, speziell in diesem Stadium anzugreifen.<sup>19</sup> *In vitro* infizierte Makrophagen spiegeln die klinisch relevante Phase des Lebenszyklus sehr gut wieder. Daher ist es sinnvoll, potentielle Wirkstoffe im ersten Schritt an diesen zu testen.<sup>20, 21</sup> Um bei der Suche nach wirksamen Anti-Leishmania-Medikamenten erfolgreich zu sein, muss eine große Anzahl an potentiellen Wirkstoffen getestet werden. Hierfür werden Methoden benötigt, die einen hohen Durchsatz erlauben und gleichzeitig möglichst wenig fehleranfällig sind. Die beiden entscheidenden Parameter für die Bewertung eines Wirkstoffes sind die Parasitenlast (Anzahl der Parasiten pro Makrophage) und die Infektionsrate (Prozentsatz der infizierten Makrophagen). Standardmäßig werden diese mikroskopisch durch Auszählen von Makrophagen bestimmt. Dabei werden infizierte Makrophagen mit einem Wirkstoff behandelt und anschließend mit dem Farbstoff DAPI, der Nukleinsäuren sichtbar macht, gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden dann optisch durch Auszählen Parasitenlast

und Infektionsrate bestimmt. Dieses Vorgehen ist sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Außerdem wird das korrekte Auszählen von Leishmanien bei hohen Parasitenlasten nahezu unmöglich, was hohe Fehlerraten zur Folge hat.<sup>22, 20</sup>

Neuere Methoden, die Reportergene wie GFP (grün fluoreszierendes Protein), RFP (rot fluoreszierendes Protein) und LacZ implizieren, sind deutlich komfortabler, objektiver und dadurch weniger fehlerbelastet. Hierbei werden rekombinante Parasiten, die das entsprechende Reporterprotein exprimieren, für die Infektion von Makrophagen verwendet. Nach Behandlung der infizierten Makrophagen mit den zu testenden Wirkstoffen können infizierte Makrophagen aufgrund der Fluoreszenz der Leishmanien mittels Durchflusszytometrie (FC, *flow cytometry*) von nicht infizierten unterschieden werden. Auf diese Weise ist es möglich, eine Reduktion der Infektionsrate nach der Behandlung mit einem Wirkstoff nachzuweisen und zu quantifizieren. Mit Hilfe eines *micro plate readers* kann entsprechend die Parasitenlast bewertet werden. Diese Methoden sind zwar schneller und können in größerem Maßstab durchgeführt werden als die mikroskopische Auswertung. Sie sind jedoch mit einigen Problemen verbunden, die bisher noch nicht vollständig beseitigt werden konnten. So ist zum Beispiel die Fluoreszenz von GFP nur geringfügig höher als die Autofluoreszenz von Makrophagen, was die Bewertung der Infektionsrate sehr schwierig macht.<sup>23</sup> Ein häufig auftretendes Problem ist außerdem die Freisetzung des Reporterproteins in das Zytoplasma der Makrophagen, so dass diese als infiziert identifiziert werden, selbst wenn die Parasiten bereits eliminiert wurden.<sup>24</sup> Des Weiteren ist für die Selektion von rekombinanten Parasiten immer das Einbringen eines Resistenzgens erforderlich, so dass stringente Kultivierungsbedingungen eingehalten werden müssen. Da das Auftreten von Kreuzresistenzen nicht selten ist, muss zudem bei Verwendung rekombinanter Leishmanien für jede einzelne zu testende Komponente überprüft werden, ob das eingebrachte Resistenzgen das Ergebnis beeinflusst.

Zur Bewertung der Parasitenlast eignet sich außerdem die (semi)quantitative *real-time* PCR (engl. *polymerase chain reaction*). Sie ermöglicht die relative oder absolute Quantifizierung der in einer Probe vorliegenden DNA. Einige Varianten dieser PCR-Methode wurden bereits erfolgreich für die Quantifizierung der Parasitenlast evaluiert. Meistens wurde hierfür CYBR® Green eingesetzt, was verhältnismäßig unspezifisch ist, da sich der Farbstoff in alle PCR-Produkte, also auch in unspezifische Produkte und Primerdimere, einlagert.<sup>25, 26</sup> Üblich ist des Weiteren immer noch die absolute Quantifizierung der DNA, was

die Erstellung einer Kalibriergeraden erforderlich macht.<sup>25,27,28</sup> Insgesamt handelt es sich um eine vielversprechende Methode, die zur Ermittlung der Parasitenlast die mikroskopische Auswertung ersetzen könnte.

#### **1.4 Maus-Knochenmarks-Makrophagen und THP1-Zellen**

Für das Wirkstoff-*screening* werden in der Regel Maus-Knochenmarks-Makrophagen (BMMs, *bone marrow-derived macrophages*) verwendet. Diese werden als murine Knochenmarksstammzellen aus Femur und Tibia von Mäusen gewonnen. Unter Einwirkung des *macrophage-colony stimulation factors* (M-CSF) erfolgt innerhalb von 10 Tagen eine Ausdifferenzierung der Zellen zu Makrophagen. Diese sind in der Lage, Leishmanien zu phagozytieren und können so infiziert werden. So wird *in vitro* eine Infektion simuliert. Die ausdifferenzierten Makrophagen sind nicht in Kultur zu halten, da sie sich nicht weiter teilen. Sie müssen daher regelmäßig neu isoliert werden.

Eine Alternative stellen kultivierbare Zelllinien dar. Bei den in dieser Arbeit verwendeten THP1-Zellen handelt es sich um humane monozytäre Zellen, die einige Ähnlichkeit zu primären humanen Monozyten aufweisen. Sie wurden aus dem Blut eines einjährigen, an akuter monozytärer Leukämie erkrankten Jungen, isoliert. THP1-Zellen wachsen in Suspension und lassen sich durch Behandlung mit Phorbolestern, wie zum Beispiel Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), zu Makrophagen differenzieren, wobei sie adhärent werden. Sie sind wie Makrophagen in der Lage Leishmanien zu phagozytieren und können daher ebenfalls als Modell für Leishmania-Infektionen herangezogen werden. Die THP1-Zelllinie ist inzwischen gut etabliert und wird häufig in diversen Bereichen der Forschung verwendet.<sup>29,30</sup> Da THP1-Zellen in ausdifferenziertem Stadium sehr makrophagenähnlich sind, wird im Folgenden bei allgemeinen Beschreibungen auf die Unterscheidung zwischen Maus-Knochenmarks-Makrophagen und THP1-Zellen verzichtet. Beide werden allgemein als Makrophagen bezeichnet.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Mangel an zuverlässig wirkenden Therapien, die teils starken Nebenwirkungen vieler Medikamente sowie die erwähnte Kosten- und Resistenzproblematik machen die Entwicklung neuer Wirkstoffe unumgänglich. Wie bereits erwähnt, ist das herkömmliche Vorgehen beim Wirkstoff-*screening*, bei dem Parasitenlast und Infektionsrate mikroskopisch durch Auszählen ermittelt werden, sehr langwierig, arbeitsintensiv und subjektiv. Es ist für den geforderten hohen Durchsatz nicht geeignet. Des Weiteren sind die für das Wirkstoff-*screening* häufig verwendeten Maus-Knochenmarks-Makrophagen, die regelmäßig frisch aus Mausgewebe differenziert werden müssen, als Modell für die Infektion im Menschen nicht ideal.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zum einen, zwei alternative, zeit- und arbeitssparende, sowie objektive Methoden zur Ermittlung von Parasitenlast und Infektionsrate vergleichend zu der herkömmlichen Auszählmethode zu evaluieren. Zum anderen soll die immortalisierte Zelllinie „THP1“ auf ihre Eignung für ein Wirkstoff-*screening* und somit als mögliche Alternativ zu den Maus-Knochenmarks-Makrophagen getestet werden.

Geplant ist, Maus-Knochenmarks-Makrophagen bzw. THP1-Zellen mit *L. donovani* 1SR WT (Wildtyp) zu infizieren und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Miltefosin zu behandeln. Die Reduktion von Infektionsrate und Parasitenlast durch die Behandlung mit dem Wirkstoff soll dann mit drei Methoden bestimmt werden:

1. Färbung mit DAPI und fluoreszenzmikroskopische Auszählung. Hier werden Infektionsrate und Parasitenlast bestimmt. Zusätzlich wird mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung das Zytoskelett sichtbar gemacht. So soll sichergestellt werden, dass nur intakte Makrophagen in die Auswertung mit einbezogen werden.
2. Semiquantitative *real-time* PCR. Mit dieser Methode soll die durchschnittliche Parasitenlast der infizierten Makrophagen bestimmt werden. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, werden *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden eingesetzt. Als *template* dienen die zuvor isolierten genomischen DNAs von Parasiten und Wirtszellen. Die Quantifizierung der Leishmanien-DNA erfolgt relativ zur Wirtszell-DNA.
3. Durchflusszytometrie. Diese soll Auskunft über die Infektionsrate geben. Hierfür werden die für die Infektion verwendeten Parasiten zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) markiert. Es soll gezeigt werden, dass sich anhand der Fluoreszenz der markierten Leishmanien infizierte von nicht infizierten

Makrophagen mittels Durchflusszytometrie unterscheiden lassen. Aufgrund der pH-Sensitivität von CFSE wird angenommen, dass die Fluoreszenz des Farbstoffes beim Verdau von markierten Leishmanien im sauren Phagolysosom unterdrückt wird. Somit soll weiterhin überprüft werden, ob sich mit dieser Methode eine Reduktion der Infektionsrate nach Behandlung mit Miltefosin nachweisen lässt.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der semiquantitativen *real-time* PCR sollen mit denen der händischen Auszählung am Fluoreszenzmikroskop verglichen und unter dem Gesichtspunkt der Tauglichkeit für ein Wirkstoff-*screening* bewertet werden. Außerdem soll, basierend auf den während der Arbeiten gesammelten Erfahrungen, eingeschätzt werden, inwieweit sich BMMs durch THP1-Zellen ersetzen lassen.

## 2 Material

### 2.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Art.-Nr.</b>
Biosphere® Filter Tips 0,5 - 20 µl	Sarstedt	70.1116.215
Biosphere® Filter Tips 1250 µl	Sarstedt	70.1186.210
Biosphere® Filter Tips 200 µl extra long	Sarstedt	70.1189.215
CASY® ton	Roche	05651808001
Combitips advanced 10 ml	Eppendorf	0030089.464
Deckgläser 24 x 65 mm	R.Langenbrinck	01-2465/1
Einmalinjektionskanüle Gr. 1	B. Braun	4657519
Einmalspritze 20 ml	B. Braun	4606205V
Kulturröhrchen, 4 ml	Carl Roth	AEX8.1
Pasteurpipetten aus Glas, 15 cm	Fisher Scientific	FB50251
PCR Tubes 0,2 ml	LTF Labortechnik	102.0150
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sarstedt	72.690.001
Reaktionsgefäß, 15 ml	Sarstedt	62.554.502
Reaktionsgefäß, 50 ml	Sarstedt	62.547.254
Sterile Aerosol Pipet Tips 100 µl	Biozym	701061
T175 Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1812
T25 Gewebekulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1810.002
T25 Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.3910
T75 Gewebekulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1811.002
T75 Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.3911
Zellkulturkammern, 8-Well	Sarstedt	94.6140.802
Zellkulturplatten, 6-Well	Sarstedt	83.1830
Zellschaber mit 2-Positionen-Klinge, 25 cm	Sarstedt	83.1830

## 2.2 Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologische Kits

Tabelle 2: Auflistung der Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologischen Kits

Material	Hersteller	Art.-Nr.
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse igG (H+L)	Invitrogen	A-11005
CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)	eBioscience	65-0850-84
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich	D9564
Invisorb® Genomic DNA Kit II	Stratec molecular	1032120400
KAPA PROBE FAST Universal qPCR Mastermix	VWR International	07-KK4701-01
Monoklonaler anti-alpha-tubulin Antikörper produziert in der Maus	Sigma-Aldrich	T5168

## 2.3 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden von den Firmen Carl Roth und Biomol bezogen.

## 2.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer und Lösungen werden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Tabelle 3: Auflistung der häufig verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	2% BSA in PBS, 0,1% Triton X-100
FC ( <i>flow cytometry</i> )-Puffer	5% iFCS, 0,01% Natriumazid in PBS
Mowiol	25% Glycerol, 0,1 M Tris-HCl (pH 8.5), 10% Mowiol 4-88
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	2,68 mM KCL, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Permeabilisierungslösung	50 mM NH <sub>4</sub> Cl, PBS (pH 7.0), 0,1% Triton X-100
PFA (Paraformaldehyd)-Lösung	8% PFA in PBS
Trypsin/EDTA	PBS (pH 7.0), 0,02% EDTA, Trypsin 0,05%
Waschpuffer	PBS (pH 7.0), 0,01% Triton X-100

## 2.5 Verwendete Zellen

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Zellen

Bezeichnung	Herkunft
<i>L. donovani</i> 1SR HSP23 -/-	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
<i>L. donovani</i> 1SR WT	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Maus-Knochenmarks-Makrophagen	Isoliert aus C57BL/6 Maus, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
THP1-Zellen	INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR – IBMC Porto, Portugal

## 2.6 Zellkulturmedien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien

Material	Hersteller	Art.-Nr.
Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium ohne Glutamin (IMDM)	Sigma-Aldrich	I3390
Medium 199 mit Earle's Salzen	Sigma-Aldrich	M0393
RPMI-1640 ohne Glutamin (entwickelt am Roswell Park Memorial Institut)	Sigma-Aldrich	R5886

## 2.7 Antibiotika

Alle Antibiotika werden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika mit Konzentration der Stocklösung

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung
Genitcin/G418	100 µg/ml
L-Glutamin-Pen/Strep (Penicillin/ Streptomycin)	2 mM L-Glutamin; 100 U (Units) Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin
Puromycin	25 µg/ml

## 2.8 Nährmedien und ihre Zusammensetzung

Der Überstand (ÜS) von L929-Zellen wird aus der Kultur von L929-Zellen bezogen. Alle sonstigen Medienkomponenten Firmen Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Zellarten mit den zugehörigen Nährmedien und deren Zusammensetzung**

Zellart	Bezeichnung	Zusammensetzung
Leishmanien	M199 <sup>+</sup> (pH 7,0)	M199-Medium 20% inaktiviertes (30 Min bei 56° C) FCS 0,035% Natriumhydrogencarbonat 20 µg/ml Gentamycin 10 µg/ml Haemin 100 µM Adenin 1,2 µg/ml 6-Biopterin 2 mM L-Glutamin 40 mM HEPES (pH 7.4)
	Einfriermedium	30% M199 <sup>+</sup> 50% inaktiviertes (30 Min bei 56 °C) FCS 20% DMSO (Dimethylsulfoxid)
Maus-Knochenmarks-Makrophagen	IMDM <sup>+</sup>	55% IMDM (ohne Glutamin) 10% inaktiviertes FCS (30 Min bei 56 °C) 5% Pferdeserum 30% ÜS von L929 Zellen
THP1-Zellen	RPMI <sup>+</sup>	94,5% RPMI-1640 10% inaktiviertes FCS (30 Min bei 56 °C) 1% L-Glutamin-Pen/Strep
	Einfriermedium	95% inaktiviertes FCS (30 Min bei 56 °C) 5% DMSO

## 2.9 Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden mit dem Programm *MacVector, Inc.*, Version 12.6.0 konstruiert und bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt.

**Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Primer und Sonden mit Sequenz und Größe des PCR-Produkts**

Bezeichnung	Sequenz 5' zu 3'	Größe
LeishAktin <i>fwd</i>	CAGAACCGTGAGAAGATG	75 Bp
LeishAktin <i>rev</i>	ACAGCCTGAATACCAATG	
LeishAktin Sonde	FAM-ATTCAATGTGCCGTCGCTGT-BHQ1	102 Bp
Maus-β-Aktin <i>fwd</i>	CTGGAGAAGAGCTATGAG	
Maus-β-Aktin <i>rev</i>	CTTACCCAAGAAGGAAGGCTG	

Maus- $\beta$ -Aktin Sonde	Cy5-CATCACTATTGGCAACGAGCGG-BHQ3	
Human- $\beta$ -Aktin <i>fwd</i>	CCCATCTACGAGGGGTATG	
Human- $\beta$ -Aktin <i>rev</i>	TCGGTGAGGATCTTCATG	99 Bp
Human- $\beta$ -Aktin Sonde	Cy5-CCTGGCTGGCCGGGACCTGAC-BHQ3	

## 2.10 Geräte und Computerprogramme

Tabelle 9: Auflistung der Geräte und Computerprogramme

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Brutschrank	9020-0011 KBF 240	WTC Binder
Brutschrank	BB16	Haraeus Instruments
Durchflusszytometer	BD Accuri™ C6 Cytometer	BD Bioscience
Fluoreszenzmikroskop	Evos FL Auto	Life Technologies
Mikroskop	Evos XL	Life Technologies
Mr. Frosty Cryo-Einfriergerät		Carl Roth
Multipette®	Plus	Eppendorf
Multipette®	Pro	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer 0,1 mm Tiefe		Assistent
Photometer	Biomate 3	Thermo Electron
<i>Real-time</i> PCR Maschine	Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
Wasserbad	Polystat temperature controller	Cole-Parmer
Zentrifuge	5810R	Eppendorf
Programm	Verwendung	
Adobe® Photoshop® CS3 Extended, Vers. 10.0.1	Bearbeitung von Bildern von Fluoreszenzpräparaten	
FlowJow®, LLC, Vers. 10.0	Auswerten der Daten der Durchflusszytometrie	
Graph Pad Prism5, Vers. 5.0a	Erstellen von Graphen zu Parasitenlast und Infektionsrate	
Keynote '09 Vers. 5.3	Gestaltung von Bildern und Grafiken	
MacVector, Inc., Vers. 12.6.0	Entwerfen von Primern und Sonden	
Rotor-Gene Analysis Software, Vers. 6.1.81	Auswertung der Daten der semiquantitativen <i>real-time</i> PCR	

## 3 Methoden

Grundsätzlich werden, wenn nicht anders beschrieben, bei allen Arbeiten mit THP1-Zellen und BMMs Medium und PBS zuvor im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Bei Arbeiten mit Leishmanien ist ein Vorwärmen von Medium oder PBS nicht erforderlich.

### 3.1 Zellkulturtechniken

#### 3.1.1 Zellkultur von Leishmanien

Die Kultivierung der Leishmanien erfolgt im Promastigotenstadium. Dieses existiert in der Natur im Mitteldarm der Sandmücke. Um vergleichbare Kultivierungsbedingungen zu schaffen, werden die Promastigoten in komplementiertem M199 Medium (M199<sup>+</sup>) bei 25 °C und 5% CO<sub>2</sub> in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen werden zweimal pro Woche auf eine Zelldichte von 1x10<sup>5</sup>-1x10<sup>6</sup> Zellen/ml verdünnt. So wird ein logarithmisches Wachstum sichergestellt. Die Messung der Zelldichte erfolgt mit Hilfe eines CASY Cellcounter & Analyzer (siehe 3.1.6).

Transfizierte Zellen werden zusätzlich mit den entsprechenden Antibiotika inkubiert. Für *L.d. 1SR HSP23 -/-* sind dies Genitacin (G418) in einer Konzentration von 50 µg/ml und Puromycin in einer Konzentration von 25 µg/ml.

#### 3.1.2 Kryokonservierung von Leishmanien

Zur langfristigen Lagerung von Leishmanien können diese in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Durch die Kryokonservierung wird die Vitalität der Zellen nahezu unbegrenzt aufrechterhalten. Der Einsatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellmembran zerstören würden. Von der Kultur werden 1x10<sup>8</sup> Zellen abgenommen, sedimentiert (10 Min, 1.250 x g, 4 °C), in kaltem M199<sup>+</sup> aufgenommen, 1 Volumen kaltes Einfriermedium hinzugegeben und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen werden nach 24-stündiger Lagerung bei -70 °C in den Kryotank überführt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wird ein Aliquot im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in frisches M199-Medium überführt. Dabei sollte die Verdünnung mindestens 1:10 betragen, da DMSO für die Zellen toxisch ist.

### 3.1.3 Zellkultur von THP1-Zellen

Die Kultivierung der THP1-Zellen erfolgt in komplementiertem RPMI-Medium (RPMI<sup>+</sup>) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe. Die Zelldichte und Häufigkeit des Mediumwechsels hat einen wesentlichen Einfluss auf die Ausdifferenzierung bei Behandlung mit PMA. Das beste Ergebnis wird erzielt, wenn die Kultur bei einer Zelldichte von rund 2x10<sup>6</sup> gehalten und alle 5 - 7 Tage das Medium gewechselt wird.<sup>31</sup> Zunächst wird dafür mit der Neubauer-Zählkammer die Zelldichte der Kultur bestimmt (siehe 3.1.7). Anschließend wird das benötigte Volumen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 400 x g und 4 °C für 10 Min sedimentiert. Das Pellet wird in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

### 3.1.4 Kryokonservierung von THP1-Zellen

Die Kryokonservierung von THP1-Zellen erfolgt analog zu der von Leishmanien mit kaltem RPMI<sup>+</sup> und entsprechendem Einfriermedium. Jedoch sind THP1-Zellen weniger robust. Daher muss das Einfrieren der Zellen langsamer erfolgen. Hierfür wird das „Mr. Frosty“ Einfriergerät eingesetzt, welches es ermöglicht, die Temperatur pro Stunde um 1 °C zu senken.

Die THP1-Zellen sind außerdem deutlich empfindlicher gegen DMSO, weshalb die Zellen nach dem Auftauen in 10 ml Medium gegeben und anschließend sedimentiert (10 Min, 400 x g, 4 °C) werden. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Auf diese Weise wird das DMSO aus dem Medium entfernt.

### 3.1.5 Isolierung und Kultivierung von Maus-Knochenmarks-Makrophagen

Murine Knochenmarksstammzellen werden aus Femur und Tibia einer C57BL/6 Maus gewonnen. Hierfür werden die Knochen zunächst isoliert und gereinigt. Um Kontaminationen zu vermeiden werden sie anschließend für 1-2 Min in 70% Isopropanol desinfiziert. Nach Abtrennung der Knochenenden werden die Knochen unter Zuhilfenahme einer Kanüle mit 5 ml komplementiertem IMDM (IMDM<sup>+</sup>) durchgespült. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und durch leichtes Schwenken werden Zellaggregate aufgelöst. Während der anschließenden 10-minütigen Inkubation bei 4 °C sedimentieren möglicherweise vorhandene Knochensplitter. Der Überstand wird in ein neues 50 ml

Reaktionsgefäß überführt und die Zellen sedimentiert (10 min, 400 x g, 4 °C). Das Zellpellet wird in frischem Medium aufgenommen, die Zellen auf zwei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Belüftungsdeckel aufgeteilt und jeweils 20 ml IMDM<sup>+</sup> hinzugegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 3 Tagen wird die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt. An Tag 6 und 9 nach der Isolation wird das Medium komplett verworfen, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und anschließend wieder 25 ml frisches Medium dazugegeben. An Tag 10 ist die Makrophagendifferenzierung abgeschlossen und die Zellen können für Experimente verwendet werden.

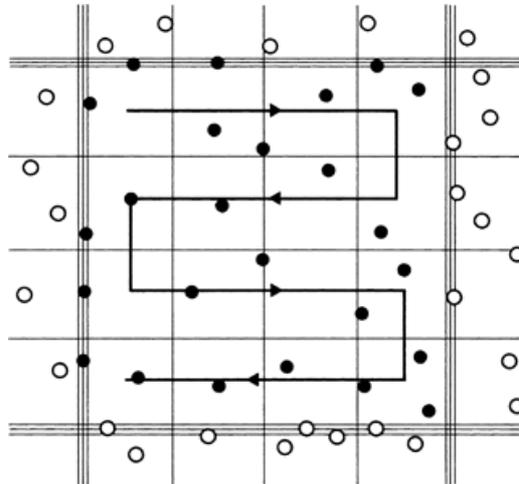
### **3.1.6 Zellzahlbestimmung mittels CASY Cellcounter & Analyser**

Der CASY Cellcounter & Analyser ist ein Gerät, das die Zelldichte in einer Kultur ermitteln und gleichzeitig zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden kann. Zunächst werden die Zellen durch leichtes Schütteln gleichmäßig in der Zellkulturflasche verteilt. Anschließend werden 10 µl der Zellkultur in 10 ml Elektrolytlösung (CASY ton) pipettiert (1:1000 – Verdünnung). Das Gerät saugt pro Messung 2 x 200 µl dieser Lösung durch eine Kapillare. Mithilfe eines elektrischen Feldes kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen besitzen eine intakte Membran, die als Isolator wirkt. Der Strom kann nicht hindurchfließen. Die Membran toter Zellen dagegen ist zerstört und kann somit nicht mehr isolierend wirken. Anhand des entsprechenden Widerstandes wird die Zellzahl/ml berechnet. Es erfolgt immer eine Doppelbestimmung und Bildung des Mittelwertes. In dieser Arbeit wird der CASY Cellcounter & Analyser nur für die Zelldichtebestimmung von Leishmanien verwendet.

### **3.1.7 Zelldichtebestimmung mittels Neubauer-Zählkammer**

Nach gleichmäßiger Verteilung der Makrophagen durch vorsichtiges Schütteln werden 10 µl der Kultur mit 90 µl Trypanblau (1:10 in PBS) vermischt (1:10 – Verdünnung). Dies geschieht, um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Das Deckglas wird auf der Zählkammer platziert und die Zellsuspension seitlich pipettiert. Durch die Kapillarkraft wird sie in die Zwischenräume, die das Gitter bildet, gesogen. Anschließend werden die Zellen in den vier großen Quadranten gezählt. In Abb. 3 ist das Zählprinzip in einem der Quadrate dargestellt. Tote Zellen erscheinen blau, da der Farbstoff aufgrund der zerstör-

ten Membran ins Innere gelangen kann. Diese werden nicht mitgezählt. Durch Bildung des Mittelwertes aus den Werten der vier Quadrate und Anwendung der Formel 1 wird die Zellzahl/ml errechnet.



**Abbildung 3: Darstellung des Zählprinzips in einem Quadrat der Neubauer-Zählkammer.**

Nacheinander werden in jedem einzelnen kleinen Quadrat die Zellen gezählt. Zellen, die am oberen und linken äußeren des großen Quadrats auf einer Linie liegen, werden mitgezählt. Übernommen aus: Der Experimentator: Zellkultur, S. Schmitz, Spektrum Akademischer Verlag, 2011<sup>49</sup>

$$Z_{ml} = \bar{Z} \cdot \vartheta \cdot 25 \cdot 10^4 \quad (\text{Formel 1})$$

$Z_{ml}$  = Zellzahl pro ml

$\bar{Z}$  = Mittelwert der ausgezählten Quadrate

$\vartheta$  = Verdünnungsfaktor

$25 \cdot 10^4$  = Faktor

## 3.2 *In vitro*-Infektionsexperimente

### 3.2.1 Aussäen von THP1-Zellen

Für die anschließende Auswertung mittels Durchflusszytometrie und semiquantitativer *real-time* PCR werden die THP1-Zellen in Zellkulturplatten ( $2 \times 10^7$  Zellen in 3 ml Medium pro *well*) und für die DAPI- und Immunfluoreszenzfärbung in 8-*well chamber slides* ( $2 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium pro *well*) ausgesät. Dafür wird die Zelldichte der Kultur wie unter 3.1.7 beschrieben bestimmt, das benötigte Volumen abgenommen und die Zellen sedi-

mentiert (10 Min, 400 x g, 4 °C). Für die Aussaat in die Zellkulturplatten werden zunächst 2,5 ml Medium in die *wells* vorgelegt. Das Zellpellet wird in dem berechneten Volumen (500 µl pro *well*) an RPMI<sup>+</sup> aufgenommen und PMA aus einer Stocklösung von 100 µg/ml hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 50 ng/ml ergibt. Von der Zellsuspension werden je 500 µl in die *wells* pipettiert. Nach 4 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> ist die Ausdifferenzierung der Zellen abgeschlossen.

### **3.2.2 Aussäen von Maus-Knochenmarks-Makrophagen**

Maus-Knochenmarks-Makrophagen werden wie THP1-Zellen in Zellkulturkammern (6x10<sup>6</sup> Zellen in 3 ml Medium pro *well*) und 8-*well chamber slides* (5x10<sup>5</sup> Zellen in 500 µl Medium pro *well*) ausgesät. Da die Zellen adhärent sind, müssen sie zunächst vom Flaschenboden gelöst werden. Das Medium wird abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen, um abgelöste (tote) Zellen zu entfernen. Anschließend wird so viel warmes (37 °C) Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, bis die Oberfläche gerade bedeckt ist. Die Zellen werden 5 Min bei 37 °C inkubiert. Da Trypsin/EDTA für die Makrophagen schädlich ist, muss zum Verdünnen anschließend mindestens das doppelte Volumen an IMDM<sup>+</sup> in die Flasche gegeben werden. Durch das Trypsin/EDTA können die Zellen nicht vollständig von dem Flaschenboden gelöst werden. Deshalb müssen die restlichen, noch adhären Zellen mit einem Zellschaber abgelöst werden. Um das Volumen zu verringern und das Trypsin/EDTA zu entfernen, wird die Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und die Zellen sedimentiert (10 Min, 400 x g, 4 °C). Das Zellpellet wird in 10 ml frischem Medium aufgenommen und die Zelldichte wie unter 3.1.7 beschrieben ermittelt. Das benötigte Volumen wird abgenommen und die Zellen sedimentiert (10 Min, 400 x g, 4 °C). Die Aussaat der Zellen erfolgt nun analog zu der der THP1-Zellen (siehe 3.2.1). Die eingesäten Makrophagen werden für 48 – 72 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.2.3 Infektion von THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen**

Für Infektionsexperimente werden Promastigoten in stationärer Wachstumsphase eingesetzt (> 6x10<sup>7</sup> Zellen/ml). Die Infektion erfolgt je nach Experiment mit unterschiedlichen Verhältnissen Makrophage:Parasit. Zunächst wird die Zelldichte der Leishmanienkultur

mit dem CASY Cellcounter & Analyser (siehe 3.1.6) ermittelt. Anschließend wird das benötigte Volumen der Kultur abgenommen und die Zellen sedimentiert (10 Min, 1.250 x g, 4 °C). Die Zellen in den Zellkulturplatten und 8-well chamber slides werden einmal mit PBS gewaschen. In die Zellkulturplatten wird 2,5 ml M199<sup>+</sup> vorgelegt. Das Zellpellet wird in dem berechneten Volumen (500 µl pro well) an M199<sup>+</sup> aufgenommen und je 500 µl in die wells pipettiert. In der folgenden Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> werden die Leishmanien von den Makrophagen phagozytiert. Anschließend werden die Zellen dreimal gründlich mit warmem PBS gewaschen, um nicht phagozytierte Leishmanien zu entfernen und mit IMDM<sup>+</sup> (für BMMs) bzw. RPMI<sup>+</sup> (für THP1-Zellen) aufgefüllt. Die infizierten Makrophagen werden für weitere 24 h oder 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.2.4 Behandlung der infizierten Maus-Knochenmarks-Makrophagen und THP1-Zellen mit Miltefosin**

Die infizierten Makrophagen bzw. THP1-Zellen werden nach 24 h mit dem Miltefosin behandelt. Um abgelöste Zellen und frei gewordene Leishmanien zu entfernen, werden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. In 50 ml Reaktionsgefäß wird RPMI<sup>+</sup> oder IMDM<sup>+</sup> mit der entsprechenden Konzentration an Miltefosin vorbereitet. In die Zellkulturplatten werden 3 ml und in die 8-well chamber slides 500 µl pipettiert. Auch die Zellen, die nicht behandelt werden sollen (Kontrollgruppe), werden gewaschen und bekommen frisches Medium. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h oder 48 h.

## **3.3 Mikroskopische Methoden**

### **3.3.1 Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung**

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich vorwiegend in AT-reiche Regionen der DNA einlagert. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert DAPI blaues Licht (461 nm) im sichtbaren Bereich. So können DNA-haltige Zellorganellen, wie der Zellkern und der Kinetoplast bei Leishmanien, unter dem Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal sichtbar gemacht werden.

Bei der Immunfluoreszenz werden Antikörper verwendet, um bestimmte Zellkompartimente oder -organellen sichtbar zu machen. Beispielsweise das Zytoskelett, welches durch den Nachweis von alpha-tubulin, einem Hauptbestandteil der Mikrotubuli, sichtbar

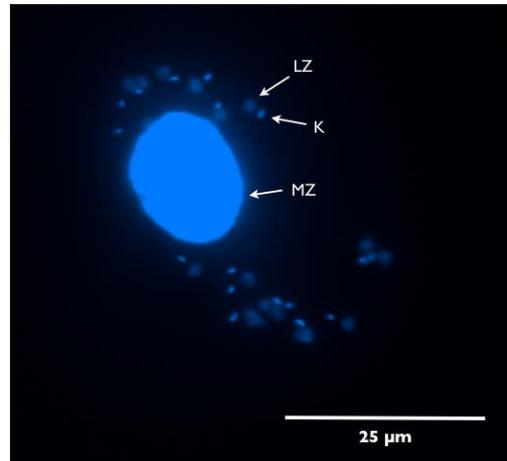
gemacht werden kann. Dabei ist der erste Antikörper (in dieser Arbeit ein monoklonaler anti-alpha-tubulin-Antikörper, produziert in der Maus) spezifisch für die Zielstruktur. Der zweite Antikörper (in dieser Arbeit der Alexa Fluor® 594 anti-Maus IgG (Immunglobulin), produziert in der Ziege) trägt einen Fluoreszenzfarbstoff und erkennt spezifisch die Fc (engl. *crystallisable fragment*)-Region des ersten Antikörpers. Das in dieser Arbeit verwendete Alexa Fluor® 594 emittiert bei Anregung rotes Licht (617 nm) im sichtbaren Bereich und kann somit unter dem Fluoreszenzmikroskop im RFP-Kanal sichtbar gemacht werden.

Die infizierten Makrophagen in den *8-well chamber slides* werden zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 3 Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert. Es folgt ein 5-minütiger Waschschrift mit dem Waschpuffer und anschließend die 20-minütige Permeabilisierung der Zellen mit der Permeabilisierungslösung. Alle anschließenden Inkubationsschritte werden in einer dunklen, feuchten Kammer durchgeführt. Zuerst erfolgt für 1 h die Inkubation mit dem anti-alpha-tubulin-Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:4000 in der Blockierungslösung eingesetzt wird. Die Zellen werden nach der Inkubation dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 und DAPI in einer Verdünnung von 1:100 in der Blockierungslösung für 1 h inkubiert. Die Zellen werden erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen, die Kammer vom Objektträger entfernt und die Präparate getrocknet. Zur Konservierung der Präparate werden diese abschließend mit mehreren Tropfen Mowiol und einem Deckgläschen versehen. Das Mowiol wird bei 4 °C fest und die Präparate können mikroskopisch ausgewertet werden.

### 3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung von Infektionsrate und Parasitenlast

Die Proben werden bei 60facher Vergrößerung am *Evos FL Auto* Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Abb. 4 zeigt einen infizierten Makrophagen in dem sowohl der Zellkern des Makrophagen (MZ) als auch die Zellkerne (LZ) und die Kinetoplasten (K) der Leishmanien durch DAPI sichtbar gemacht wurden. Die Parasiten sind um den großen Zellkern des Makrophagen angeordnet.

Da die DNA im Kinetoplasten sehr kompakt vorliegt, leuchten sie heller als die Zellkerne. Gezählt werden die Kinetoplasten, die sich um den Zellkern eines Makrophagen befinden. Durch Betrachtung im RFP-Kanal wird parallel überprüft, ob die Zellen intakt sind. Nur intakte Zellen werden in die Auswertung mit einbezogen. Für jede getestete Versuchsbedingung werden durch Auszählung von insgesamt 400 Makrophagen (in 4 *wells* jeweils 100 Makrophagen) und anschließender Mittelwertbildung sowohl die Parasitenlast als auch die Infektionsrate bestimmt.



**Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines infizierten Maus-Knochenmarks-Makrophagen.**

Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden mit promastigoten *L. donovani* infiziert, nach 24 h fixiert und mit DAPI gefärbt. MZ = Makrophagenzellkern, LZ = Leishmanienzellkern, K = Kinetoplast. 60x Vergrößerung. Größenbalken = 25 µm.

### 3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz differenzieren werden können. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) gibt Auskunft über die Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) über die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz wird je nach Emissionsmaximum in unterschiedlichen Kanälen gemessen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Zellen mit einer Fluoreszenz zu markieren. CFSE ist eine Substanz, die häufig im Rahmen der Durchflusszytometrie für die Zellfärbung eingesetzt wird. Das Ausgangsmolekül, CFDA-SE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), ist nicht fluoreszierend und kann aufgrund seiner Acetatgruppen sehr leicht durch die Zellmembran ins Innere der Zelle diffundieren. Erst dort wird es durch Esterasen, die die Ace-

tatgruppen abspalten zu dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE umgesetzt. Dies kann nun aufgrund der fehlenden Acetatgruppen deutlich schlechter durch die Zellmembran diffundieren und verbleibt daher in der Zelle. Die Intensität der Lichtemission kann im FL1-Kanal (grün) des Durchflusszytometers gemessen werden. Da üblicherweise in wissenschaftlichen Publikationen, in denen diese Methode angewandt wird, allgemein von „CFSE“ die Rede ist, und auch das verwendete Produkt der Firma eBioscience als „CFSE“ bezeichnet wird, wird auch in dieser Arbeit im Folgenden diese Bezeichnung verwendet.

Für die Markierung der Leishmanien wird zunächst die Dichte der Zellkultur mit dem CASY Cellcounter & Analyser bestimmt und das benötigte Volumen abgenommen. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen (10 Min, 1.250 x g, 4 °C) und mit PBS in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf maximal  $5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Nun wird aus einer 10 mM Stocklösung CFDA-SE hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 10  $\mu$ M ergibt. Das Reaktionsgefäß wird sofort mehrmals invertiert. Ab jetzt müssen alle Arbeiten im Dunklen erfolgen, da die entstehende Fluoreszenz bei Licht schnell ausbleicht. Die Zellsuspension wird 10 Min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dabei 3 - 4 mal durch Invertieren gemischt um eine gleichmäßige Aufnahme des CFDA-SE in alle Zellen zu ermöglichen. Anschließend werden 5 Volumen eiskaltes M199<sup>+</sup> hinzugegeben und die Zellen 5 Min auf Eis inkubiert. Dieses Vorgehen erhöht die Vitalität der Zellen. Das überschüssige CFDA-SE wird durch dreimaliges Waschen (10 Min, 1.250 x g, 4 °C) der Zellen M199<sup>+</sup> entfernt. Anschließend wird das Zellpellet wieder in Medium aufgenommen. Die so markierten Leishmanien können für Infektionsexperimente verwendet werden (siehe 3.2.3).

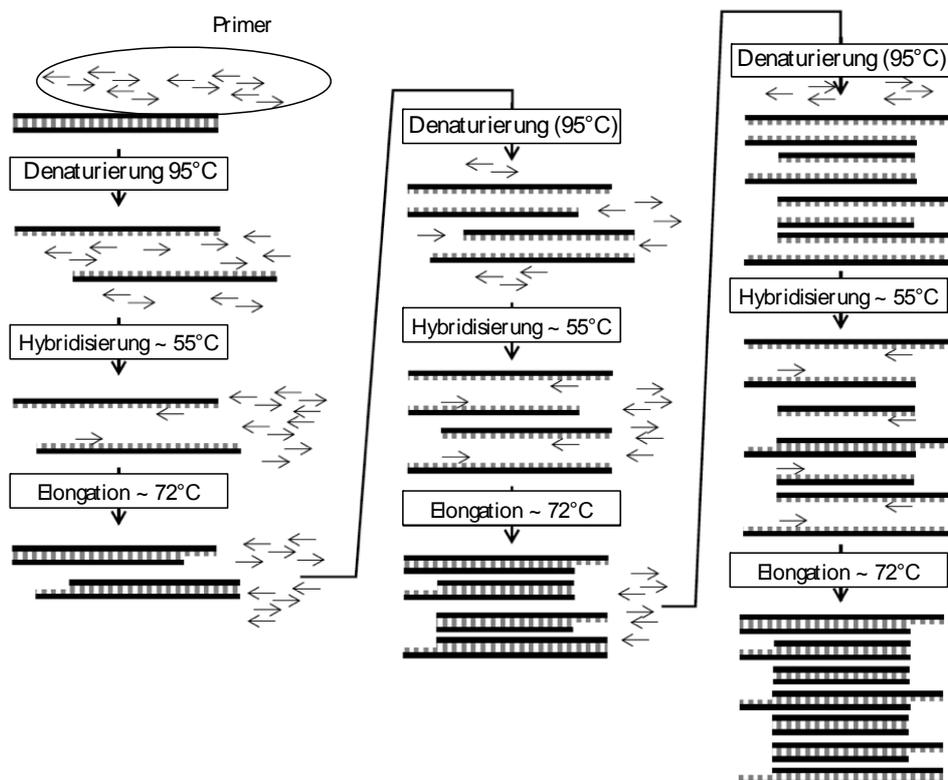
Zur Bestimmung der Infektionsraten mittels Durchflusszytometrie werden die infizierten Makrophagen einmal mit PBS gewaschen, um abgelöste Zellen und frei gewordene Leishmanien zu entfernen. Die Makrophagen werden abgelöst (siehe 3.2.2) und zweimal mit FC-Puffer gewaschen (10 Min, 400 x g, 4 °C). Das Pellet wird anschließend in 500  $\mu$ l kaltem PBS aufgenommen und in 4 ml Kulturröhrchen überführt. Durch Zugabe von 500  $\mu$ l einer 8% PFA-Lösung und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Min werden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgt die Durchflusszytometrie am *BD Accuri<sup>TM</sup> C6 Cytometer*.

### 3.5 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung der gDNA (genomische DNA) wird das *Invisorb® Genomic DNA Kit II* verwendet. Die infizierten Makrophagen in den Zellkulturkammern werden mehrfach gründlich mit PBS gewaschen, um abgelöste Zellen und frei gewordene Leishmanien zu entfernen, da deren DNA das Ergebnis der semiquantitativen *real-time* PCR verfälschen würde. Die Zellen werden anschließend wie unter 3.2.2 beschrieben, mit Hilfe von Trypsin/EDTA und einem Zellschaber abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen (10 Min, 400 x g, 4 °C). Anschließend wird die gDNA gemäß der Anleitung des Kits isoliert und über Nacht im Kühlschrank gelagert, damit sie sich entfalten kann.

### 3.6 Semiquantitative *real-time* PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, das die Vervielfältigung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in kurzer Zeit ermöglicht. Das Konzept, welches hinter der Polymerasekettenreaktion steht, wird in Abb. 5 veranschaulicht.



**Abbildung 5: Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion.**

1. Schritt (Denaturierung): Die Ausgangs-DNA wird auf 95 °C erhitzt, die beiden Stränge trennen sich. 2. Schritt (Hybridisierung): Die Temperatur wird gesenkt, damit die Primer an die DNA binden können. 3. Schritt (Elongation): Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, um eine optimale Synthese des komplementären Strangs zu erlauben. Am Ende eines Zyklus ist die DNA-Menge (nahezu) verdoppelt worden. Modifiziert nach Mülhardt, C. (2009)<sup>32</sup>

Die zu amplifizierende DNA wird zusammen mit einem Gemisch aus allen Nukleinsäurebestandteilen (dNTPs, Desoxyribonukleosidtriphosphate) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase in einem für die Polymerase zuträglichen Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Ein Paar an als *Primer* bezeichneten Oligonukleotiden komplementiert den Reaktionsansatz. Die *Primer* sind einzelsträngige DNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu einer Basenfolge am Ende des zu vervielfältigenden Nukleinsäureabschnitts ist. Sie bilden den Startpunkt für die während der Reaktion erfolgende Verknüpfungsreaktion und markieren jeweils das 3'- und das 5'-Ende des schließlich amplifizierten Abschnitts.

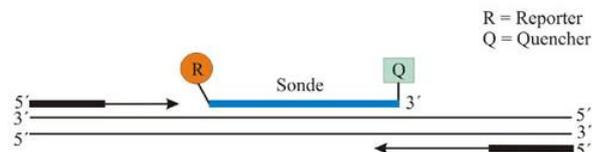
Der PCR-Prozess besteht aus ca. 20 bis 30 Zyklen, die in einem *Thermocycler* durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Temperaturschritten, in denen unterschiedliche Reaktionen ablaufen. Die einzelnen Phasen werden als Denaturierung, Hybridisierung und Elongation bezeichnet. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird der Reaktionsansatz auf ca. 95 °C erhitzt. Dadurch wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird die Temperatur für die Hybridisierung auf 40 °C bis 60 °C gesenkt. Die genaue Temperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der *Primer*. Diese lagern sich nun an die entsprechenden Sequenzen auf der einzelsträngigen Matrizen-DNA an, wobei sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die Elongation erfolgt bei 70 °C bis 75 °C. Die thermophile DNA-Polymerase verlängert nun, beginnend an den 3'-OH-Enden der *Primer*, den komplementären Strang. Da es im ersten Zyklus nur einen Startpunkt, aber keinen Stoppunkt gibt, wird die Synthese erst durch das Einsetzen des zweiten Zyklus' abgebrochen. Daher liegen im zweiten Zyklus nach der Denaturierung einzelsträngige Amplifikate mit Überlänge am 3'-Ende vor. Bei der folgenden Hybridisierung lagert sich der entsprechend entgegengesetzte *Primer* an und die Synthese bricht am 5'-Ende des Amplifikats, das im ersten Zyklus durch den *Primer* gebildet wurde, ab. Von diesem Zeitpunkt an wird nur noch der durch die *Primer* eingerahmte Bereich vervielfältigt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der Matrizen-DNA im Ansatz.

Eine spezielle Variante der herkömmlichen PCR ist die semiquantitative *real-time* PCR. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Menge eines Zielgens in einer Nukleinsäureprobe. Dabei wird durch den Nachweis von Fluoreszenz die zyklische Vervielfältigung der eingesetzten DNA-Moleküle in Echtzeit gemessen.

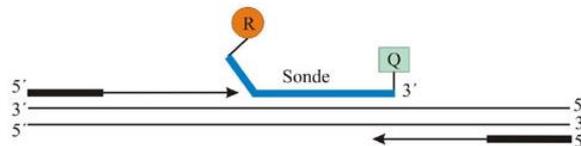
Es gibt mehrere Verfahren zur Durchführung einer *real-time* PCR. Die Verwendung von z.B. *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden erlaubt einen spezifischen Gennachweis. Das Prinzip dieser sondebasierten Methode ist in Abb. 6 dargestellt. Die Sonde ist sequenzspezifisch und trägt am 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff (FAM oder Cy5) und am 3'-Ende einen *Quencher* (BHQ1 oder BHQ3). Beruhend auf dem Förster-Resonanzenergietransfer unterdrückt der *Quencher* bei einer intakten Sonde die Fluoreszenz des Reporters.

Während der Hybridisierung der genspezifischen *fwd* (engl. *forward*)- und *rev* (engl. *reverse*)-Primer lagert sich die Sonde spezifisch an die dazwischenliegende Zielsequenz an.

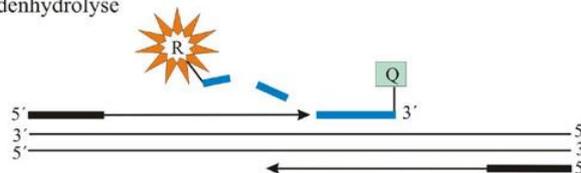
#### 1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer



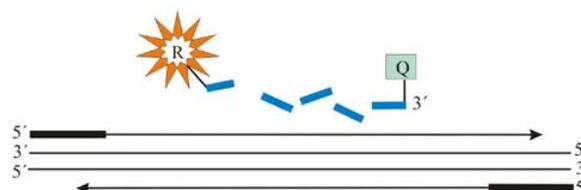
#### 2. Primer-Extension und Sondenverdrängung



#### 3. Sondenhydrolyse



#### 4. Vollständige Synthese des PCR-Produktes und Trennung der Farbstoffe



#### Abbildung 6: Darstellung des Prinzips der *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonde.

Die *TaqMan* Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert die Fluoreszenz. Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5' Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten. Übernommen aus: Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen, Dissertation, Daniela Jacob, 2003<sup>33</sup>

Bei der nachfolgenden Elongation baut die *Taq*-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde ab, sodass Reporter und *Quencher* voneinander getrennt werden. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr vom *Quencher* absorbiert. So steigt mit jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal in der Probe und ist dabei proportional zur Anzahl der entstandenen Amplifikate. Der Zeitpunkt, an dem ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen ist (CT, *cycle threshold*), erlaubt Rückschlüsse auf die Menge der eingesetzten, zu quantifizierenden Nukleinsäuren in einer Probe.

Für die Ermittlung von absoluten Mengen ist die Erstellung einer Kalibriergeraden erforderlich. Für diese Arbeit war jedoch eine relative Quantifizierung ausreichend. Dabei werden für jede Probe die CT-Werte eines Zielgens (in diesem Fall des *Leishmania*-Aktins) gegen die CT-Werte eines Referenzgens (z.B. des Maus- oder des Human- $\beta$ -Aktins) normalisiert. Die Quantifizierung des Zielgens in den Proben erfolgt anschließend mittels der delta-delta-CT-Methode, wobei der delta-delta-CT-Wert einer Probe als Kalibrator für alle anderen Proben bestimmt wird. So ergibt sich die relative Konzentration des Zielgens in der jeweiligen Probe.

Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Primer und Sonden werden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die jeweiligen Gebrauchslösungen werden so angesetzt, dass für eine Probe jeweils 1  $\mu$ l eingesetzt wird. In Tabelle 10 sind die verwendeten Primer und Sonden mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen zusammengestellt.

**Tabelle 10: Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen der Primer und Sonden**

Bezeichnung	Endkonzentration	Konzentration der Gebrauchslösung
Primer LeishAktin <i>fwd</i>	300 nM	6 $\mu$ M
Primer LeishAktin <i>rev</i>	300 nM	6 $\mu$ M
Sonde LeishAktin	200 nM	4 $\mu$ M
Primer Maus- $\beta$ -Aktin <i>fwd</i>	900 nM	18 $\mu$ M
Primer Maus- $\beta$ -Aktin <i>rev</i>	900 nM	18 $\mu$ M
Sonde Maus- $\beta$ -Aktin	200 nM	4 $\mu$ M
Primer Human- $\beta$ -Aktin <i>fwd</i>	300 nM	6 $\mu$ M
Primer Human- $\beta$ -Aktin <i>rev</i>	900 nM	18 $\mu$ M
Sonde Human- $\beta$ -Aktin	200 nM	4 $\mu$ M

Es wird der *KAPA PROBE FAST Universal qPCR Mastermix* und als *template* die zuvor isolierte genomische DNA eingesetzt. Die Proben werden als Duplex (Primer und Sonden beider Zielgene zusammen in einem Ansatz) nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

**Tabelle 11: Pipettierschema für die semiquantitative *real-time* PCR**

Volumen	Bezeichnung
10 µl	Kit Mastermix
1 µl	Primer Maus-/Human-β-Aktin <i>fwd</i>
1 µl	Primer Maus-/Human-β-Aktin <i>rev</i>
1 µl	Sonde Maus-/Human-β-Aktin
1 µl	Primer LeishAktin <i>fwd</i>
1 µl	Primer LeishAktin <i>rev</i>
1 µl	Sonde LeishAktin
2 µl	gDNA
2 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> (RNase-frei)

Die *real-time* PCR wird als 2-Schritt-PCR im *Rotor-Gene RG-3000* mit entsprechendem Programm (siehe Tab. 12) durchgeführt. Hierbei erfolgen Hybridisierung und Elongation in einem Schritt. Die initiale Denaturierung dient dazu, die „*Hot-Start-Taq* Polymerase“ zu aktivieren. Der *Touchdown* beginnt mit dem ersten Zyklus. In den ersten 14 Zyklen wird die Temperatur für Hybridisierung und Elongation um je 0,5 °C gesenkt. Mit dieser Methode wird die Bildung unspezifischer PCR-Produkte auf ein Mindestmaß reduziert. Die Daten werden anschließend mit der *Rotor-Gene Analysis Software* ausgewertet.

**Tabelle 12: Temperaturprofil für die semiquantitative *real-time* PCR**

Initiale Denaturierung	95 °C, 12 Min	1x zu Beginn
1. Denaturierung	95 °C, 15 Sek	45 Zyklen
2. Hybridisierung und Elongation	67 °C, 25 Sek	
Touchdown	- 0,5 °C pro Zyklus für 14 Zyklen	
Abkühlen	40 °C, 30 Sek	1x zum Ende

### **3.7 Datenverarbeitung**

Die Daten der Durchflusszytometrie werden mit dem Programm FlowJo® Version 10.0 ausgewertet. Alle Graphen werden mit der Software GraphPad Prism Version 5.0a erstellt.

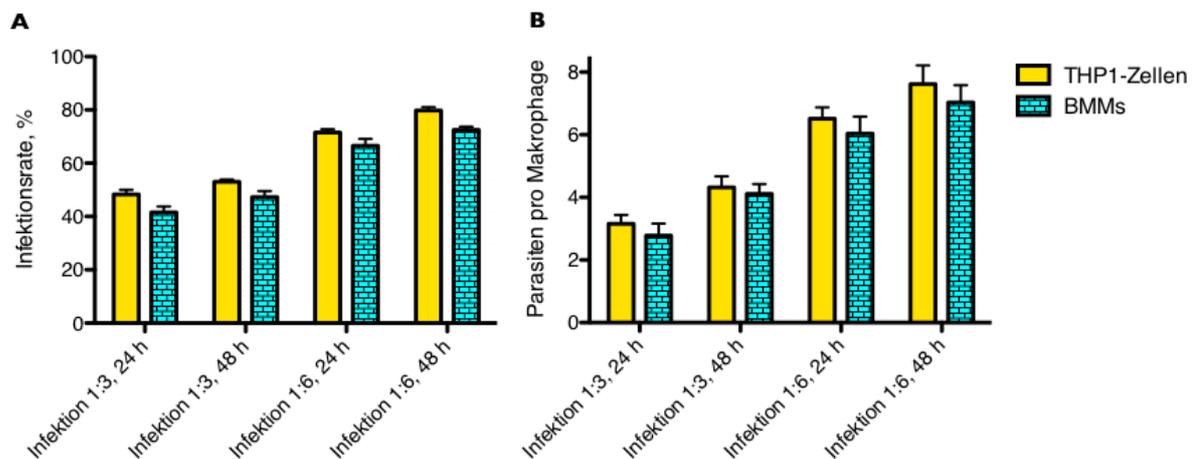
Mikroskopische Aufnahmen werden, wenn nötig, mit Adobe Photoshop® CS3® *Extended* Version 10.0.1 bearbeitet. Überlagerungen mehrerer Aufnahmen werden mit demselben Programm oder direkt mit der mikroskopinternen Software erstellt. Die bildliche Gestaltung und Beschriftung erfolgt mit dem Programm Keynote '09 Version 5.3.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich von THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen

#### 4.1.1 Infektionsrate und Parasitenlast

Es sollte untersucht werden, ob BMMs und THP1 bei Infektion mit *L. donovani* vergleichbare Parasitenlasten und Infektionsraten liefern. Dafür wurden THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen in verschiedenen Verhältnissen Makrophage zu Parasit (1:3 und 1:6) infiziert und nach 24 h und 48 h mit DAPI gefärbt. Parasitenlast und Infektionsrate wurden anschließend wie unter 3.3.2 beschrieben mikroskopisch ermittelt.



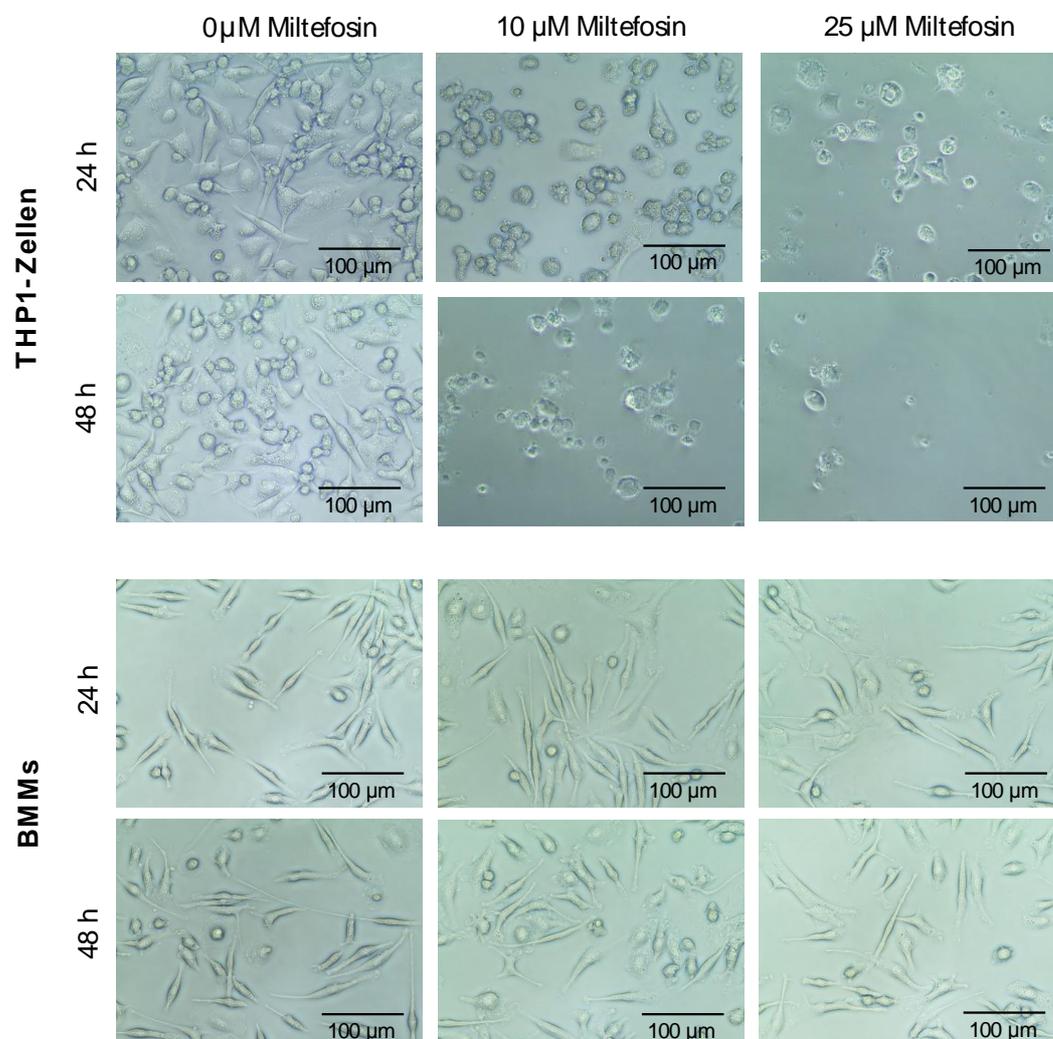
**Abbildung 7: Vergleich von THP1-Zellen und BMMs bezüglich Parasitenlast und Infektionsrate.**

THP1-Zellen und BMMs wurden in den Verhältnissen 1:3 und 1:6 (Makrophage:Parasit) mit promastigoten *L. donovani* infiziert. Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Infektionsrate (A) und Parasitenlast (B) wurden mikroskopisch ausgewertet (n = 400).

Wie Abb. 7 zeigt, ergeben sich für THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen sowohl hinsichtlich Parasitenlast als auch Infektionsrate bei allen Konditionen vergleichbare Ergebnisse. Des Weiteren ist eine Korrelation zwischen Parasitenlast und Infektionsrate erkennbar. Auffällig ist, dass die THP1-Zellen bei allen getesteten Versuchsbedingungen sowohl höhere Parasitenlasten, als auch Infektionsraten als die BMMs aufweisen.

#### 4.1.2 Verträglichkeit von Miltefosin

Es ist bekannt, dass Miltefosin ab einer bestimmten Konzentration für Maus-Knochenmarks-Makrophagen toxisch ist. Dabei liegt die halbmaximale zytotoxische Konzentration bei etwa  $90 \mu\text{M}$ .<sup>34</sup> Dies liegt deutlich über den für diesen Versuch verwendeten Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  und  $25 \mu\text{M}$ . Die Zytotoxizität für THP1-Zellen wurde bisher noch nicht bestimmt. Dieser Aspekt sollte vergleichend mit den BMMs untersucht werden. Hierfür wurden THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen für 24 h und 48 h Miltefosin in den Konzentrationen  $10 \mu\text{M}$  und  $25 \mu\text{M}$  ausgesetzt. Jeweils zu den Zeitpunkten  $t = 0$  (unmittelbar vor der Behandlung),  $t = 24 \text{ h}$  und  $t = 48 \text{ h}$  wurden die Zellen bei 60x Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.



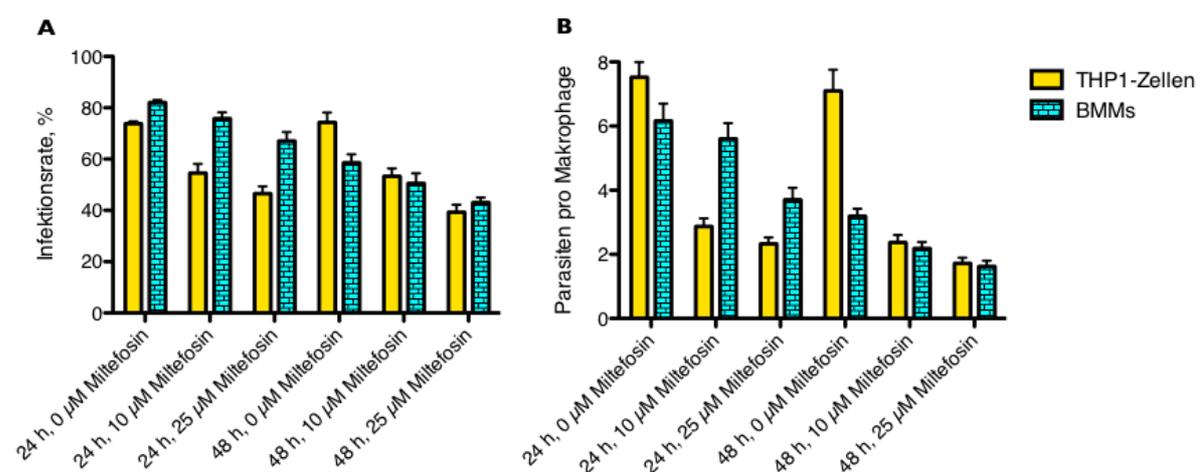
**Abbildung 8: Vergleich der Morphologie von THP1-Zellen und BMMs unter Einfluss von Miltefosin.** THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden in Zellkulturplatten ausgesät und das Medium mit  $10 \mu\text{M}$  oder  $25 \mu\text{M}$  Miltefosin versetzt. Jeweils eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt ( $0 \mu\text{M}$  Miltefosin). Nach 24 h und 48 h wurde die Morphologie der Zellen bei 60x Vergrößerung unter dem Durchlichtmikroskop überprüft. Größenbalken =  $100 \mu\text{m}$ .

In Abb. 8 ist deutlich zu erkennen, dass die THP1-Zellen im Vergleich zu den BMMs sehr empfindlich auf Miltefosin reagieren. Nach 24 h beginnen die Zellen sich abzurunden und von der Oberfläche abzulösen. Dieser Effekt tritt bereits bei 10  $\mu\text{M}$  Miltefosin nach 24 h auf, bei 25  $\mu\text{M}$  ist er noch stärker zu beobachten. Nach 48 h sind nur noch wenige Zellen übrig. Bei den Maus-Knochenmarks-Makrophagen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der Morphologie und der Anzahl der Zellen zwischen der Kontrollgruppe und den mit Miltefosin behandelten Makrophagen zu erkennen.

## 4.2 Mikroskopische Auswertung

### 4.2.1 Bestimmung von Infektionsrate und Parasitenlast nach Behandlung mit Miltefosin

THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden im Verhältnis 1:6 mit *L. donovani* infiziert und nach 24 h mit Miltefosin (10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0  $\mu\text{M}$  Miltefosin). Nach weiteren 24 h und 48 h wurden die Zellen für die mikroskopische Auswertung fixiert und mit DAPI gefärbt. Um überprüfen zu können, ob die Makrophagen, deren Zellkerne im DAPI-Kanal zu sehen sind, tatsächlich intakt sind, wird zusätzlich eine anti-alpha-tubulin Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. So kann das Zytoskelett im RFP-Kanal betrachtet werden. Die Ermittlung von Parasitenlast und Infektionsrate erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben.



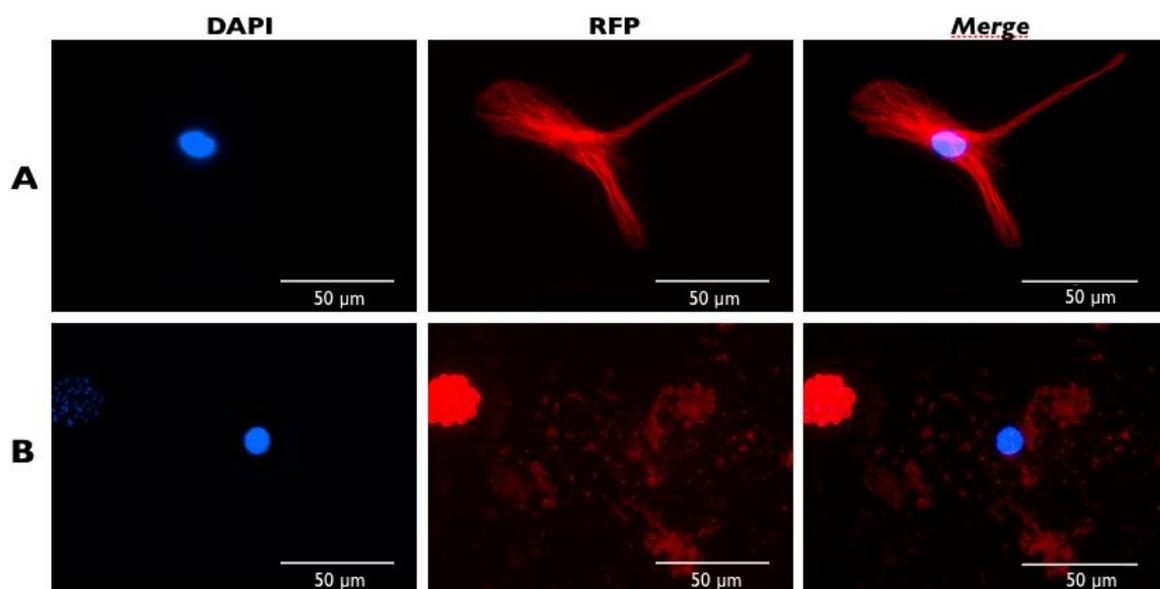
**Abbildung 9: Mikroskopische Auswertung von Infektionsraten und Parasitenlast nach Behandlung mit Miltefosin.**

THP1-Zellen und BMMs wurden im Verhältnis 1:6 (Makrophage:Parasit) mit promastigoten *L. donovani* infiziert und nach 24 h mit Miltefosin (10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb jeweils unbehandelt (0  $\mu\text{M}$  Miltefosin). Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Die Infektionsrate (A) und Parasitenlast (B) wurden mikroskopisch durch Auszählung von 400 Makrophagen bestimmt.

Sowohl bei den Maus-Knochenmarks-Makrophagen als auch bei den THP1-Zellen ist eine Reduktion der Infektionsrate und der Parasitenlast unter Behandlung mit Miltefosin sichtbar (siehe Abb. 9). Dabei ist dieser Effekt bei den THP1-Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei den Maus-Knochenmarks-Makrophagen. Auffällig ist außerdem, dass bei den BMMs nach 48 h auch ohne Behandlung mit Miltefosin eine Reduktion von Parasitenlast und Infektionsrate, verglichen mit den Werten nach 24 h erreicht wird. Dies ist bei den THP1-Zellen nicht der Fall. Hier bleiben die Werte unbehandelter Zellen nach 24 h und 48 h unverändert hoch.

#### 4.2.2 Vergleichende Betrachtung von Zellen im DAPI- und RFP-Kanal

Üblicherweise wird für die Ermittlung von Parasitenlast und Infektionsrate auf eine Kontrolle bezüglich der Integrität der Zellen verzichtet und einzig die Zellkerne und Kinetoplasten mit DAPI gefärbt. In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob diese Form der Auswertung wirklich zuverlässig ist. Dafür wurden die Proben aus dem vorangegangenen Versuch (siehe 4.2.1) verwendet. Es wurden mehrere Zellen parallel im DAPI- und im RFP-Kanal betrachtet und so überprüft, inwieweit eine zerstörte Zelle im DAPI-Kanal zu identifizieren ist. In Abb. 10 sind vergleichend eine intakte und eine zerstörte Makrophagenzelle dargestellt.



**Abbildung 10: Vergleichende Darstellung einer intakten und einer zerstörten Makrophagenzelle.**

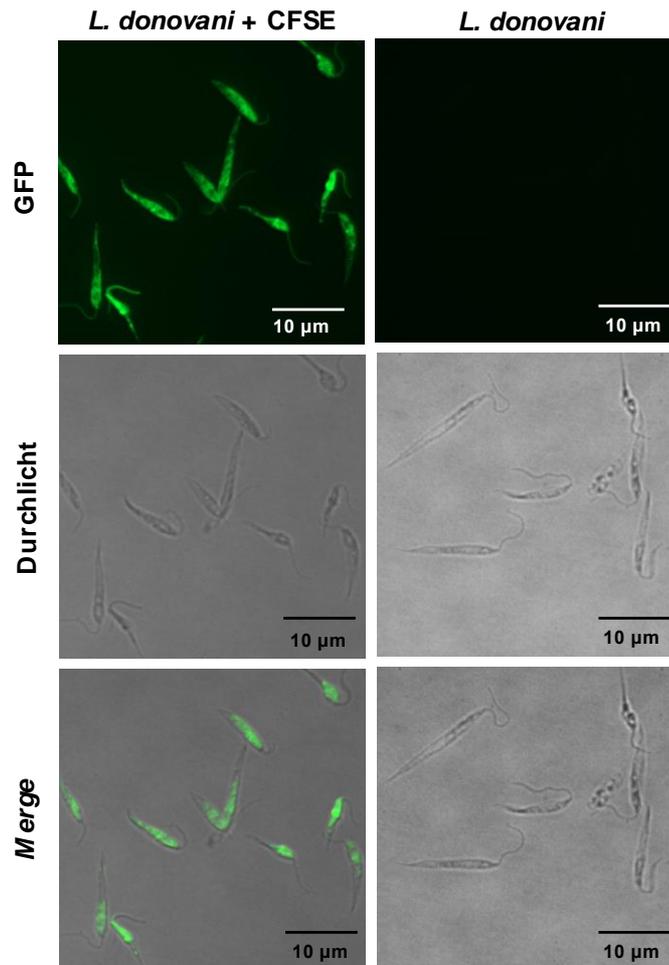
Mit *L. donovani* infizierte Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden auf einem 8-well chamber slide fixiert, mit DAPI und anti-alpha-tubulin markiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Merge zeigt die Überlagerung von DAPI- und RFP-Kanal. (A) intakte Zelle, (B) zerstörte Zelle. Fluoreszenzmikroskopie, 60x Vergrößerung. Größenbalken = 50 µm.

Die im DAPI-Kanal zu sehenden Zellkerne erscheinen in beiden Fällen intakt. Bei Betrachtung des Zytoskeletts im RFP-Kanal wird jedoch deutlich, dass die Zelle unter B vollkommen zerstört ist. Da direkt um die Zellkerne herum keine Leishmanien vorhanden sind, würden bei alleiniger Betrachtung im DAPI-Kanal beide Zellen als nicht infiziert interpretiert werden.

### **4.3 Bestimmung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie**

#### **4.3.1 Überprüfung der Eignung von CFSE für das Versuchsmodell**

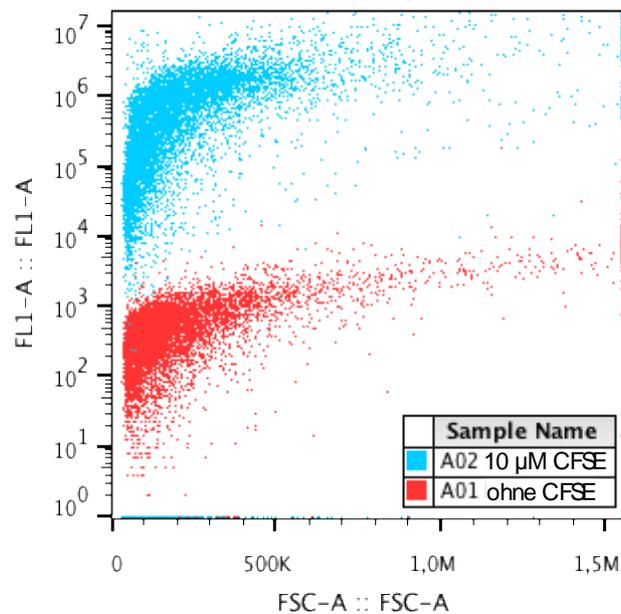
Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Markierung der Parasiten mit CFSE für die geplanten Experimente geeignet ist. Leishmania-Parasiten wurden mit CFSE markiert, anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen und fixiert. Ein weiterer Objektträger wurde entsprechend mit nicht markierten Parasiten präpariert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann CFSE im GFP-Kanal sichtbar gemacht werden. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse. Die auf das CFSE zurückzuführende Fluoreszenz der markierten Leishmanien ist deutlich höher als die bei gleichen Belichtungseinstellungen nicht wahrzunehmende Autofluoreszenz von nicht markierten Leishmanien.



**Abbildung 11: Vergleich von mit CFSE markierten und nicht markierten Leishmanien.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10 µM CFSE markiert, 3x mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger ausgestrichen und fixiert. Nicht markierte Parasiten wurden entsprechend ohne Behandlung mit CFSE präpariert. Die Fluoreszenz des CFSE ist im GFP-Kanal sichtbar. *Merge* zeigt die Überlagerung von Durchlicht- und GFP-Kanal. 100x Vergrößerung, Größenbalken = 10 µm.

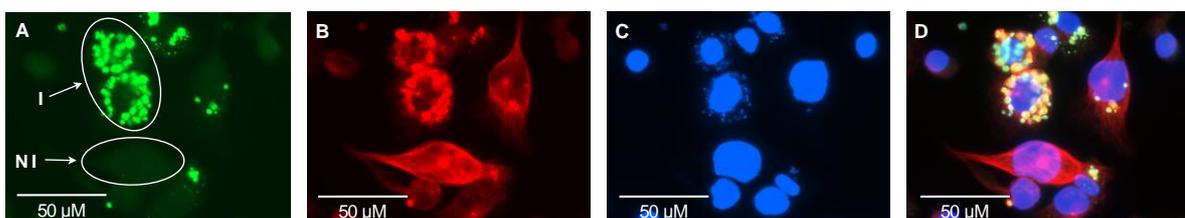
Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich das gesteigerte Fluoreszenzsignal von markierten Leishmanien auch in der Durchflusszytometrie nachweisen lässt. Hierfür wurden wiederum markierte und nicht markierte Leishmanien verwendet und mittels Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Zur Bestimmung der Zellgröße dient das Vorwärtsstreuung (FSC). Die Intensität der Fluoreszenz wird durch den FL1-Kanal angezeigt. Abb. 12 zeigt deutlich zwei getrennte Populationen, die sich in ihrer Signalintensität im FL1-Kanal unterscheiden. Es ist also möglich, markierte und nicht markierte Leishmanien mittels Durchflusszytometrie zu differenzieren.



**Abbildung 12: Unterscheidung von mit CFSE markierten und nicht markierten Parasiten mittels Durchflusszytometrie.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10 µM CFSE markiert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Signalintensität im FL1-Kanal verglichen. FSC = *forward scatter*, FL1 = Fluoreszenzintensität.

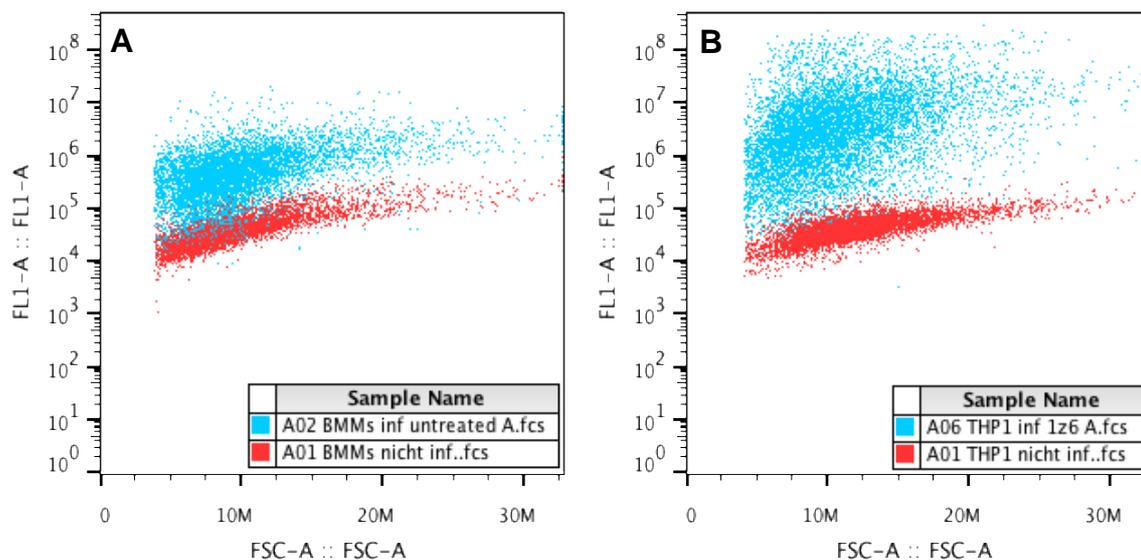
Um weiterhin die Stabilität der Fluoreszenz auch innerhalb der Makrophagen zu testen, wurden THP1-Zellen mit markierten Parasiten infiziert, nach 24 h fixiert und mit DAPI und anti-alpha-tubulin markiert. Anschließend wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, weist die Fluoreszenz der intrazellulären Amastigoten eine hohe Intensität auf. Es ist sehr deutlich zwischen infizierten und nicht infizierten THP1-Zellen zu unterscheiden.



**Abbildung 13: Differenzierung von infizierten und nicht infizierten THP1-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10 µM CFSE markiert und zur Infektion von THP1-Zellen eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, mit DAPI und anti-alpha-tubulin markiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Im GFP-Kanal (A) sind die mit CFSE markierten Parasiten, im RFP-Kanal (B) Mikrotubuli und im DAPI-Kanal (C) Zellkerne und Kinetoplasten sichtbar. D: *Merge* = Überlagerung aller Kanäle, I = infiziert, NI = nicht infiziert. Fluoreszenzmikroskopie, 60x Vergrößerung, Größenbalken = 50 µm.

Dass dies auch mittels Durchflusszytometrie möglich ist, zeigt Abb. 14. Für diesen Versuch wurden sowohl BMMs als auch THP1-Zellen im Verhältnis 1:6 mit markierten Leishmanien infiziert. Jeweils eine Kontrollgruppe blieb nicht infiziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Durchflusszytometrie. Zelltrümmer wurden durch Einrahmen (*gating*) der Leishmanien ausgeblendet. Es zeigen sich jeweils zwei voneinander getrennte Populationen, die die infizierten und nicht infizierten Zellen darstellen. Die teilweise Überlappung der Populationen indiziert, dass die Infektionsrate der Gruppe, die infiziert wurde unter 100% liegt.



**Abbildung 14: Differenzierung von infizierten und nicht infizierten Makrophagen mittels Durchflusszytometrie.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10  $\mu$ M CFSE markiert und für die Infektion von BMMs (A) sowie THP1-Zellen (B) im Verhältnis 1:6 eingesetzt. Jeweils eine Kontrollgruppe wurde nicht infiziert. Nach 24 h wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. FCS = *forward scatter*, FL1 = Fluoreszenzintensität.

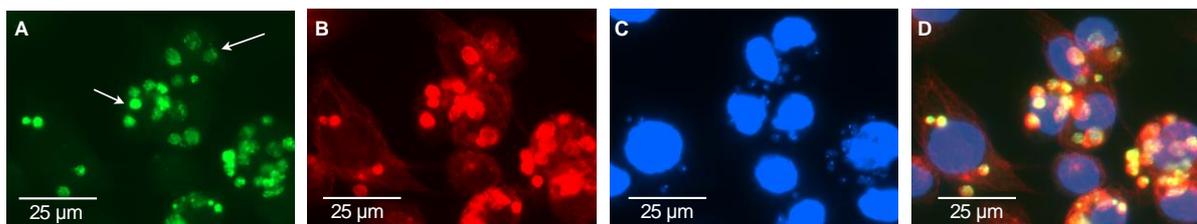
Da der geplante Versuch auf der Annahme basiert, dass die Fluoreszenz des CFSE bei einem Verdau der Parasiten durch die Makrophagen vollständig verloren geht, sollte auch dieses Modell überprüft werden.

Hierfür wurde ein rekombinanter Leishmania-Stamm (*L. donovani 1SR HSP23 -/-*) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Genaustausch-Mutante, die aufgrund des fehlenden Gens nicht in der Lage ist, das Hitzeschockprotein HSP23 zu exprimieren. Wie von Hombach *et al.* 2014 gezeigt, hat dies zur Folge, dass die Parasiten im Phago lysosom des Makrophagen nicht überleben können. Dies äußert sich in einer, verglichen mit dem Wildtyp,

stark reduzierten Parasitenlast nach 44 h. Die unveränderte Infektionsrate zeigt, dass die Fähigkeit zur Infektion unbeeinflusst bleibt.<sup>35</sup>

Die Parasiten wurden mit CFSE markiert und zur Infektion von THP1-Zellen im Verhältnis 1:6 eingesetzt. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine anti-alpha-tubulin Immunfluoreszenzfärbung, um Mikrotubuli sichtbar zu machen. Die Proben wurden bei 60x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

In Abb. 15 sind Leishmanien mit unterschiedlich intensiver Fluoreszenz zu erkennen (mit Pfeilen gekennzeichnet). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den schwächer fluoreszierenden Parasiten um solche handelt, die zum Zeitpunkt der Fixierung gerade im Phagolysosom des Makrophagen verdaut wurden.

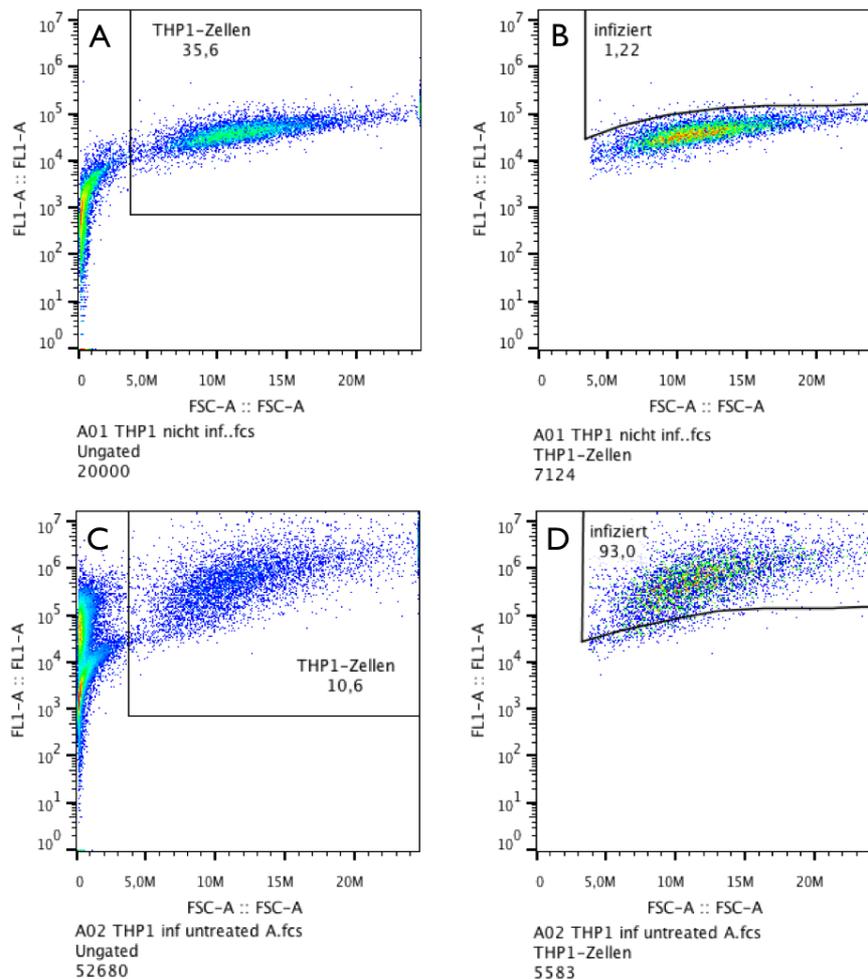


**Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen infiziert mit CFSE-markierten *L. donovani 1SR HSP23 -/-*.**

Promastigote *L. donovani 1SR HSP23 -/-* wurden mit 10 µM CFSE markiert und zur Infektion von THP1-Zellen eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, mit DAPI und anti-alpha-tubulin markiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Im GFP-Kanal (A) sind die mit CFSE markierten Parasiten, im RFP-Kanal (B) Mikrotubuli und im DAPI-Kanal (C) Zellkerne und Kinetoplasten sichtbar. D: *Merge* = Überlagerung aller Kanäle. Die Pfeile markieren beispielhaft stark und schwach fluoreszierende Amastigoten. Fluoreszenzmikroskopie, 60x Vergrößerung, Größenbalken = 25 µm.

#### 4.3.2 Ermittlung der Infektionsrate nach Behandlung mit Miltefosin

Für die folgenden Experimente wurden Leishmanien nach CFSE-Markierung zur Infektion von THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen eingesetzt. Nach Behandlung mit Miltefosin wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei eine Kontrollgruppe unbehandelt blieb (0 µM Miltefosin). Durch Auswertung der Daten mit der Software *FlowJo*<sup>®</sup> wurde für jede Probe die Infektionsrate bestimmt. Abb. 16 zeigt ein Beispiel für das Vorgehen bei der Auswertung.



**Abbildung 16: Vorgehensweise zur Auswertung der Durchflusszytometrie.**

Aufgetragen ist jeweils das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) und die Fluoreszenzintensität im FL1-Kanal. Verwendet wurden infizierte (mit CFSE-markierten *L. donovani*) und nicht infizierte THP1-Zellen 24 h nach der Infektion. A: Rohdaten für nicht infizierte THP1-Zellen. THP1-Zellen wurden eingerahmt (*Gate* „THP1-Zellen“) B: Messdaten aus dem *Gate* „THP1-Zellen“. Hier wird das *Gate* „infiziert“ erstellt. C: Rohdaten für THP1-Zellen, infiziert mit CFSE-markierten Leishmanien. Das *Gate* „THP1-Zellen“ wurde aus A übernommen. D: Anzeige der Messdaten aus dem *Gate* „THP1-Zellen“ aus C. Das *Gate* „infiziert“ aus B wird auf die Population angewendet. Analog wurde bei den Versuchen mit BMMs verfahren.

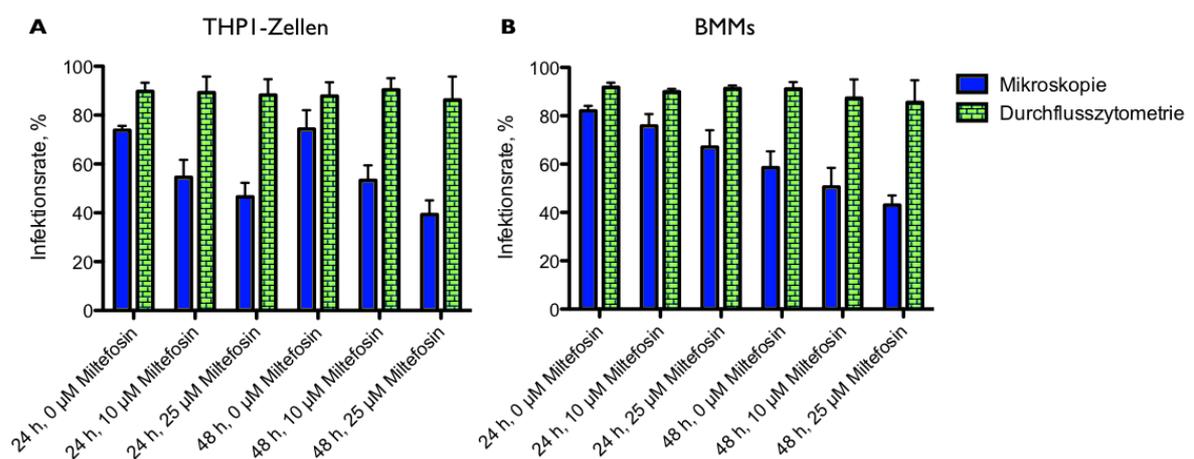
Bei jedem Experiment wurde als Referenz eine Probe mit nicht infizierten Zellen gemessen. Diese Zellen weisen eine gewisse Autofluoreszenz auf. Infizierte Zellen zeigen jedoch ein stärkeres Signal, da sie die mit CFSE markierten Leishmanien tragen. Anhand der Referenzprobe wurde ein Rahmen (*Gate*) erstellt, der Zelltrümmer und freie Leishmanien der Größe nach ausschließt. Innerhalb dieser Auswahl wurde ein weiteres *Gate* erstellt, das die infizierten Makrophagen einschließt. Es wurde so gewählt, dass nur solche Zellen erkannt werden, deren Fluoreszenz die normale Autofluoreszenz nicht infizierter Zellen überschreitet. Diese beiden *Gates* wurden auf alle gemessenen Proben übertragen. Software-basiert konnte so automatisch für jede Probe der Prozentsatz der infizierten und

der nicht infiziert Zellen ermittelt werden. Analog wurde bei allen Experimenten zur Durchflusszytometrie verfahren. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden für jede Versuchsbedingung vier Ansätze (mindestens 5000 Zellen im Gate „THP1-Zellen“ bzw. „BMMs“) gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

#### 4.3.2.1 Infektionsverhältnis 1:6

Die Infektion der THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen erfolgte im Verhältnis 1:6 mit *L. donovani*. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die infizierten Makrophagen mit Miltefosin in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb jeweils unbehandelt (0  $\mu\text{M}$  Miltefosin). Nach weiteren 24 h und 48 h wurde die Durchflusszytometrie durchgeführt. Das Ergebnis wird zur besseren Übersicht vergleichend mit den entsprechenden Werten der mikroskopischen Auswertung dargestellt (siehe Abb. 17).

Mit etwa 90% zeigen alle Proben eine wesentlich höhere Infektionsrate, als dies bei der mikroskopischen Auswertung (max. 75% bei THP1-Zellen und 80% bei BMMs) der Fall ist. Für keine der getesteten Bedingungen ist eine Reduktion nach Behandlung mit Miltefosin nachweisbar.

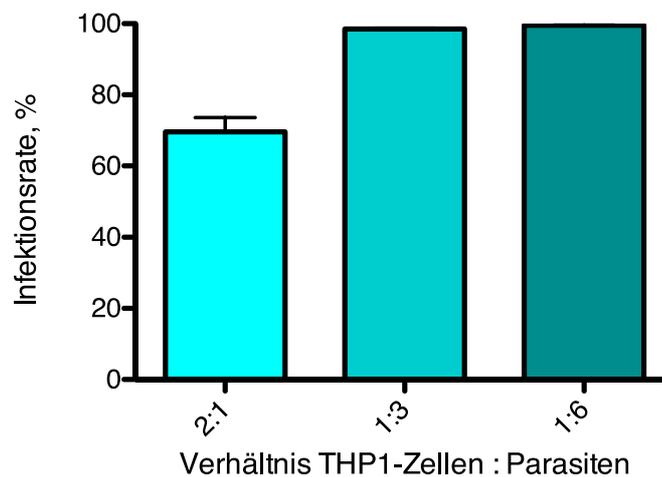


**Abbildung 17: Vergleich der Infektionsraten die mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung bei Infektionen im Verhältnis 1:6 ermittelt wurden.**

THP1-Zellen (A) und BMMs (B) wurden im Verhältnis 1:6 (Makrophage:Parasit) mit promastigoten *L. donovani* infiziert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Parasiten zuvor mit 10  $\mu\text{M}$  CFSE markiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Miltefosin (10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Eine Kontrollgruppe wurde nicht behandelt (0  $\mu\text{M}$  Miltefosin). Nach weiteren 24 h und 48 h wurde die Infektionsrate mikroskopisch ( $n = 400$ ) oder mittels Durchflusszytometrie ( $n = 4$ ) ermittelt.

#### 4.3.2.2 Testen unterschiedlicher Infektionsverhältnissen an THP1-Zellen

Nach Behandlung mit einem Wirkstoff wird die Infektionsrate erst dann beeinflusst, wenn die Parasitenlast soweit gesenkt wird, dass in einigen Makrophagen keine Parasiten mehr vorhanden sind. Bei sehr hoch infizierten Makrophagen ist eine Reduzierung der Infektionsrate daher kaum zu beobachten. In erster Linie ist in diesem Fall die Parasitenlast betroffen, die mit der Durchflusszytometrie nicht nachweisbar ist. Um diesen Fall als Ursache für die unveränderten Infektionsraten auszuschließen, wurden an THP1-Zellen unterschiedliche Infektionsverhältnisse (2:1, 1:3 und 1:6) getestet. Dabei blieben die Zellen unbehandelt und wurden nach 24 h mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie Abb. 18 zeigt, liegt die Infektionsrate bei den Infektionsverhältnissen 1:3 und 1:6 bei nahezu 100%. Das Infektionsverhältnis 2:1 zeigt nur eine Infektionsrate von etwa 70%.

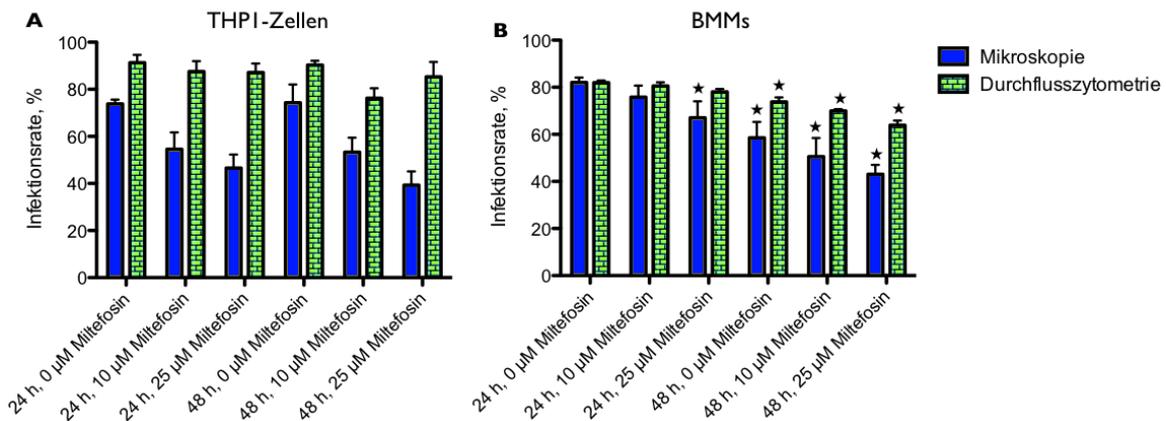


**Abbildung 18: Vergleich der Infektionsraten die mittels Durchflusszytometrie bei Infektionen in unterschiedlichen Verhältnissen ermittelt wurden.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10  $\mu$ M CFSE markiert und zur Infektion von THP1-Zellen in verschiedenen Verhältnissen Makrophage:Parasit (2:1, 1:3 und 1:6) eingesetzt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt (n = 4) und die Infektionsrate für jedes Infektionsverhältnis ermittelt.

#### 4.3.2.3 Infektionsverhältnis 1:3

Da Maus-Knochenmarks-Makrophagen, wie in 4.1.1 gezeigt, bezüglich der Aufnahme von Parasiten etwas weniger potent sind als THP1-Zellen, wurde für die Wiederholung des Experiments für die BMMs das Verhältnis 1:3 gewählt. Zum Vergleich wurde dasselbe Verhältnis auch an THP1-Zellen getestet. Beide Ergebnisse werden, erneut vergleichend mit den Werten der mikroskopischen Auswertung, in Abb. 19 gezeigt.



**Abbildung 19: Vergleich der Infektionsraten die bei Infektionen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung ermittelt wurden.**

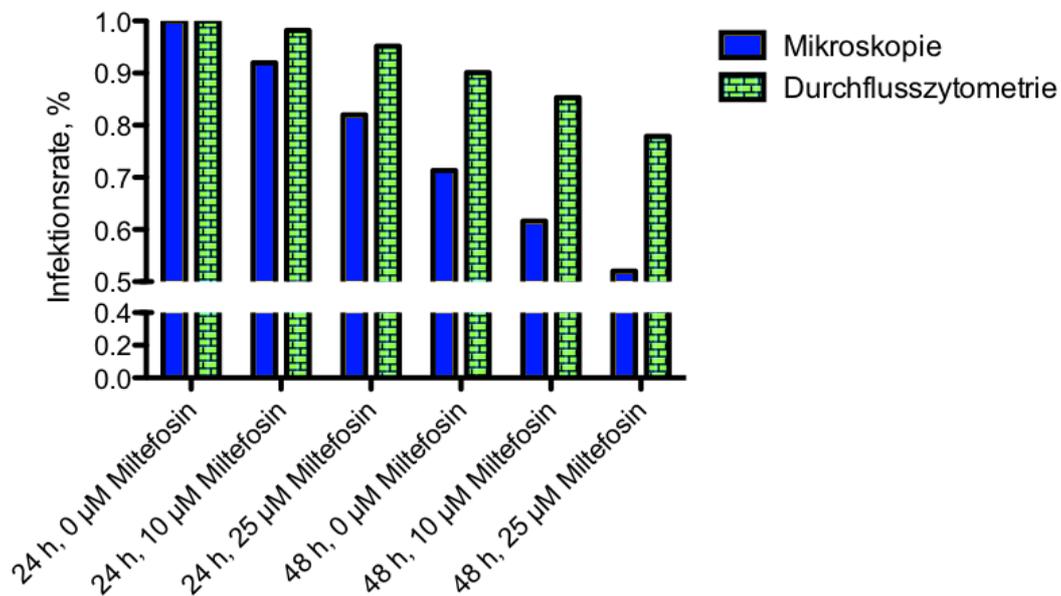
THP1-Zellen (A) und BMMs (B) wurden für die mikroskopische Auswertung im Verhältnis (Makrophage:Parasit) 1:6 und für die Durchflusszytometrie im Verhältnis 1:3 mit *L. donovani* infiziert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Parasiten zuvor mit 10 µM CFSE markiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Eine Kontrollgruppe wurde nicht behandelt (0 µM Miltefosin). Nach 24 h und 48 h wurden die Infektionsrate mikroskopisch (n = 400) oder mittels Durchflusszytometrie (n = 4) ermittelt. \* p < 0,05.

Die Infektionsraten sind erneut sehr hoch. Bei den THP1-Zellen entspricht das Ergebnis der 1:3-Infektion nahezu dem der 1:6-Infektion. Eine Reduktion nach Behandlung mit Miltefosin ist nicht zu erkennen.

Die Durchflusszytometrie der Maus-Knochenmarks-Makrophagen ergab insgesamt niedrigere Infektionsraten als bei dem Infektionsverhältnis 1:6. Bei den nicht behandelten Zellen beträgt sie etwa 80%, was dem entsprechenden Wert der mikroskopischen Auswertung (hier Infektionsverhältnis 1:6) entspricht. Außerdem ist eine leichte Reduktion nach Behandlung mit Miltefosin erkennbar. Die Tendenz entspricht der der mikroskopischen Auswertung, ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Durch eine relative Darstellung der Werte, wobei aus den Einzelwerten Mittelwerte gebildet werden und die unbehandelte Kontrollgruppe als Referenz herangezogen und gleich 1 gesetzt wird, kann dieser Sachverhalt noch anschaulicher hervorgehoben werden (siehe Abb. 20).

Um die Signifikanz der Reduktion bei beiden Auswertungsmethoden zu vergleichen, wird der „Mann-Whitney U Test“ verwendet. Bei der mikroskopischen Auswertung ist die Reduktion der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe, mit Ausnahme von den mit 10 µM Miltefosin für 24 h behandelten Zellen, in allen Fällen signifikant (p < 0,05). Bei der

Auswertung mittels Durchflusszytometrie zeigt erst die unbehandelte Gruppe nach 48 h eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

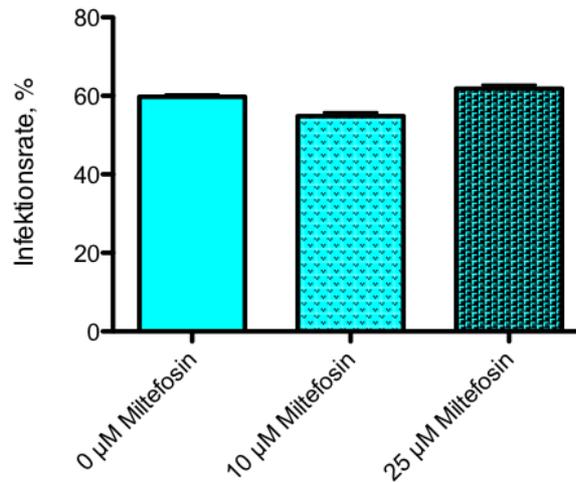


**Abbildung 20: Relative Darstellung der Infektionsraten die bei Infektionen von BMMs im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 mittels Durchflusszytometrie bzw. mikroskopischer Auswertung ermittelt wurden.** Promastigote *L. donovani* wurden mit 10 µM CFSE markiert und zur Infektion von BMMs im Verhältnis 1:3 (Makrophage:Parasit) eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0 µM Miltefosin). Nach 48 h wurde die Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie ( $n = 4$ ) ermittelt. Die Einzelwerte wurden gemittelt, für die Kontrollgruppe (0 µM Miltefosin, 24 h nach Behandlung) gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte hierzu relativiert.

#### 4.3.2.4 Infektionsverhältnis 2:1 für THP1-Zellen

Da sich die Infektionsraten für die THP1-Zellen bei den Infektionsverhältnissen 1:3 und 1:6 nicht unterschieden haben, wurde in einem weiteren Versuch das Verhältnis 2:1 eingesetzt, bei dem die Infektionsrate, wie in 4.3.2.2 nachgewiesen, nicht in die Sättigung geht. Wieder wurden die Zellen 24 h nach der Infektion mit 10 µM und 25 µM behandelt. Jedoch wurde in diesem Versuch auf die Durchflusszytometrie nach 24 h verzichtet und nur nach 48 h durchgeführt.

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass die Infektionsrate bei allen Versuchsbedingungen deutlich geringer (ca. 60%) ausfällt, als bei den Infektionsverhältnissen 1:3 und 1:6 (ca. 90%). Allerdings ist keine Reduktion bei den mit Miltefosin behandelten Zellen sichtbar.

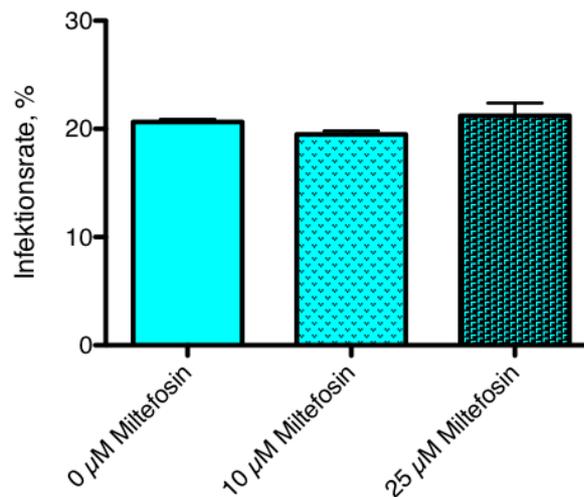


**Abbildung 21: Infektionsraten die bei der Infektion von THP1-Zellen im Verhältnis 2:1 mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 10 µM CFSE markiert und zur Infektion von THP1-Zellen im Verhältnis 2:1 (Makrophage:Parasit) eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0 µM Miltefosin). Nach 48 h wurden die Infektionsraten mittels Durchflusszytometrie ermittelt (n = 4).

#### **4.3.2.5 Reduktion der CFSE-Konzentration**

Da der Nachweis einer Reduktion der Parasitenlast durch Behandlung mit Miltefosin bei den BMMs nur bedingt und bei den THP1-Zellen überhaupt nicht erfolgreich war, wird ein weiterer Parameter, der bei diesem Versuch eine Rolle spielen könnte, untersucht. Hierbei handelt es sich um die Intensität der Fluoreszenz. In allen vorangegangenen Experimenten wurde für die Markierung der Leishmanien CFSE 10 µM eingesetzt. Für den folgenden Versuch, der mit Maus-Knochenmarks-Makrophagen und einem Infektionsverhältnis von 1:3 durchgeführt wurde, erfolgte die Markierung der Leishmanien mit CFSE 5 µM. Die Makrophagen wurden 24 h nach der Infektion mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Die Durchflusszytometrie wurde nach 48 h Inkubationszeit durchgeführt. Um der erwarteten verringerten Signalintensität Rechnung zu tragen, wurde das *gating* leicht verändert. Der Schwellenwert für infizierte Makrophagen wurde dafür im Vergleich zu den vorherigen Versuchen etwas herunter gesetzt. Es resultieren für alle Proben dennoch sehr geringe Infektionsraten von rund 20% (siehe Abb. 22). Eine Reduktion infolge der Behandlung mit Miltefosin ist nicht erkennbar.



**Abbildung 22: Infektionsraten die bei der Infektion von BMMs im Verhältnis 1:3 und mit reduzierter CFSE-Konzentration mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden.**

Promastigote *L. donovani* wurden mit 5 µM CFSE markiert und für die Infektion von BMMs im Verhältnis 1:3 (Makrophage:Parasit) eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0 µM Miltefosin). Nach 48 h wurde die Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie ermittelt (n = 4).

#### 4.4 Bestimmung der Parasitenlast mittels semiquantitativer *real-time* PCR

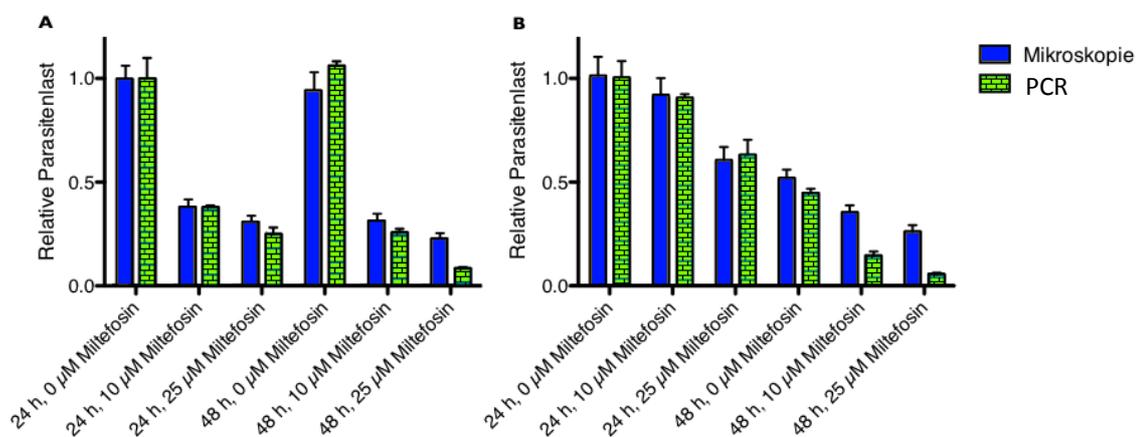
Für jede Versuchsbedingung wurden zwei Proben vorbereitet. Die semiquantitative *real-time* PCR wurde jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt, so dass die Ergebnisse auf insgesamt 4 Messwerten basieren.

THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden im Verhältnis 1:6 mit *L. donovani* infiziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Behandlung mit Miltefosin (10 µM und 25 µM). Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0 µM Miltefosin). Die genomische DNA wurde nach 24 h und 48 h isoliert. Anschließend wurde eine semiquantitative *real-time* PCR durchgeführt. Diese liefert als Ergebnis die relative Aktin-DNA-Konzentration, die sich auf die Aktin-DNA-Konzentration einer Referenzprobe (0 µM Miltefosin, 24 h nach Behandlung) bezieht.

Um die Werte mit denen der mikroskopischen Auswertung vergleichbar zu machen, wurden für jede Bedingung Mittelwerte gebildet und relativ auf die Referenzprobe (Wert = 1) bezogen. Auf dieselbe Weise wurde mit den Werten der mikroskopischen Auswertung verfahren. Abb. 23 zeigt die so ermittelten relativen Parasitenlasten vergleichend für die semiquantitative *real-time* PCR und die mikroskopische Auswertung. Die Fehlerbalken,

die bei dieser Form der Auswertung nicht dargestellt werden können wurden grafisch aus Abb. 9B (für die Mikroskopie) bzw. aus der Auswertung der relativen Aktin-DNA-Mengen (nicht gezeigt) eingefügt.

Sowohl für die THP1-Zellen als auch für die Maus-Knochenmarks-Makrophagen sind die Ergebnisse der semiquantitativen *real-time* PCR mit denen der mikroskopischen Auswertung sehr gut vergleichbar. Es fällt lediglich auf, dass die Reduktion der Parasitenlast bei der Auswertung mittels semiquantitativer *real-time* PCR allgemein deutlicher ausgeprägt ist als bei der mikroskopischen Auswertung.



**Abbildung 23: Vergleich der relativen Parasitenlasten die bei Infektionen von THP1-Zellen und BMMs mittels mikroskopischer Auswertung und semiquantitativer *real-time* PCR ermittelt wurden.**

THP1-Zellen (A) und BMMs (B) wurden im Verhältnis 1:6 (Makrophage:Parasit) mit promastigoten *L. donovani* infiziert und nach 24 h Inkubationszeit mit Miltefosin (10 µM und 25 µM) behandelt. Jeweils eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (0 µM Miltefosin). Nach weiteren 24 h und 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und deren Parasitenlast mikroskopisch ausgewertet (n = 400). Alternativ wurde eine semiquantitative *real-time* PCR durchgeführt (n = 4). Die relative Aktin-DNA-Konzentration wurde durch Normierung auf eine Referenzprobe (0 µM Miltefosin, 24 h nach Behandlung) ermittelt. Relative Parasitenlast: Mittelung der relativen Aktin-DNA-Konzentration der einzelnen Proben und Normierung auf die Kontrollgruppe (0 µM Miltefosin, 24 h nach Behandlung, Wert = 1).

## 5 Diskussion

### 5.1 THP1-Zellen vs. Maus-Knochenmarks-Makrophagen

Es konnte gezeigt werden, dass THP1-Zellen und Maus-Knochenmarks-Makrophagen bei gleichen Bedingungen und ohne Behandlung mit Miltefosin vergleichbare Ergebnisse bzgl. Parasitenlast und Infektionsrate liefern. Es fiel lediglich auf, dass die THP1-Zellen insgesamt geringfügig potenter waren, also mehr Leishmanien aufgenommen haben als Maus-Knochenmarks-Makrophagen. Dieser Unterschied war jedoch marginal.

Bezüglich der Kultivierung und Handhabung zeigten sich sowohl Vor- als auch Nachteile der THP1-Zellen gegenüber den BMMs. Der relevanteste Vorteil ist zweifellos die Tatsache, dass es sich um eine immortalisierte Zelllinie handelt, die dauerhaft in Kultur gehalten werden kann. Die Maus-Knochenmarks-Makrophagen müssen regelmäßig frisch aus der Maus isoliert werden. Sie können nur 1-2 mal vom Flaschenboden gelöst werden. Auch nicht verwendete Zellen müssen dann entsorgt werden, da ihre Vitalität zu stark beeinträchtigt ist. Für regelmäßige Arbeiten muss daher wöchentlich Knochenmark gewonnen werden. Sowohl aus ethischen als auch aus organisatorischen Gründen ist daher die Verwendung von THP1-Zellen vorzuziehen. Diese wachsen in Suspension und sind, wie schon von Paulimo B. Aldo *et al.* gezeigt, sehr robust und brauchen nur alle 5-7 Tage einen Mediumwechsel.<sup>31</sup> Wie sich gezeigt hat, können sie im Extremfall auch bis zu 2 Wochen ohne Mediumwechsel überleben, ohne dass eine relevante Schädigung der Morphologie und Vitalität zu beobachten ist. Des Weiteren lassen sie sich sehr einfach durch Zugabe von geringen Mengen an PMA ausdifferenzieren. Dieser Prozess ist nach spätestens 4 Tagen abgeschlossen, ohne dass ein Mediumwechsel erforderlich ist. In vielen Studien wurde sogar schon nach zwei oder drei Tagen eine gute Ausdifferenzierung beobachtet.<sup>27,36,37</sup> Die Maus-Knochenmarks-Makrophagen sind nach der Isolierung aus der Maus erst nach 10 Tagen vollständig ausgereift, wobei zwischendurch mehrfach das Medium gewechselt werden muss.

Als Nachteil hat sich bei der Arbeit mit den THP1-Zellen erwiesen, dass sie zur Ausdifferenzierung auf eine hohe Zelldichte angewiesen waren. So mussten sie fast 4 Mal dichter ausgesät werden als die BMMs. Dies ist an sich noch nicht problematisch, da im Voraus gut geplant werden kann, wie viele Zellen benötigt werden. Da jedoch die Infektion der Zellen in dieser Arbeit in den meisten Fällen im Verhältnis 1:6 erfolgte und allgemein für

Infektionsexperimente oft sogar Infektionsverhältnisse bis zu 1:10 eingesetzt werden<sup>35,38</sup>, wird für die Infektion eine große Menge an Leishmanien benötigt. Bei kleinen Ansätzen ist dies noch vertretbar. Für ein Wirkstoff-*screening* in größerem Umfang ist dies im Labormaßstab kaum zu bewerkstelligen. Es muss jedoch bemerkt werden, dass dieses Problem in anderen Publikationen nicht thematisiert wird. In der Regel werden die THP1-Zellen in deutlich geringeren Dichten ausgesät, die denen der BMMs entsprechen.<sup>39,27,40</sup> Die in dieser Arbeit für die THP1-Zellen verwendeten Kultivierungsbedingungen unterscheiden sich nicht oder nur unwesentlich von denen anderer Studien. Insofern ist die verringerte Differenzierungsfähigkeit möglicherweise auf die Qualität des Mediums bzw. der Medienzusätze, auf das die Differenzierung einleitende PMA oder auf die verwendeten Zellen selbst zurückzuführen. Nicht auszuschließen ist außerdem eine Kontamination der Kultur mit prokaryotischen Mikroorganismen wie z.B. Mycoplasmen. Eine Mycoplasmakontamination bleibt häufig unbemerkt, bewirkt aber eine Veränderung des Metabolismus der Wirtszelle.<sup>41</sup> Dies kann auch die Fähigkeit der THP1-Zellen zur Ausdifferenzierung betreffen.

In der Verträglichkeit gegenüber Miltefosin zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen THP1-Zellen und BMMs. Während Miltefosin in den verwendeten Konzentrationen von 10 µM und 25 µM keine toxische Wirkung auf die BMMs zeigte, was sich mit den Erkenntnissen von Morais-Teixeira *et al.* sowie diversen anderen Publikationen deckt<sup>34</sup>, erwiesen die THP1-Zellen sich als sehr empfindlich. Vermutlich ist dies auf den Ursprung der THP1-Zellen zurückzuführen. Sie wurden aus dem Blut eines leukämiekranken Jungen isoliert, sind also faktisch Krebszellen.<sup>30</sup> Da Miltefosin ursprünglich als Antikrebsmittel entwickelt wurde, ist die Toxizität für THP1-Zellen nachvollziehbar. Die zytotoxische Wirkung von Miltefosin sowie weiterer Antileishmaniwirkstoffe wie Imipramin und Pentamidin wurde auch durch Van de Bogaart *et al.* sowie Grebe-Hiwot *et al.* bestätigt.<sup>27,38</sup> Außerdem zeigten weitere neu synthetisierte Stoffe, deren Wirksamkeit gegen Leishmanien getestet werden sollte ebenfalls eine hohe zytotoxische Wirkung auf die THP1-Zellen.<sup>27</sup>

Der signifikante Verlust von Zellen während der von mir durchgeführten Experimente war wenig problematisch, da für die semiquantitative *real-time* PCR aufgrund der hohen Sensitivität schon sehr geringe Mengen an DNA für eine ausreichende Replikation genügen und für die Durchflusszytometrie bereits 5.000 Zellen ein repräsentatives Ergebnis liefern. Bei der mikroskopischen Auswertung bedeutete eine stark reduzierte Zahl an Zellen

jedoch einen erheblich gesteigerten Zeitaufwand, da es nicht einfach ist, vereinzelte Zellen auf dem Objektträger zu finden.

Hinzu kommt, dass die Richtigkeit der Ergebnisse sehr fraglich ist. Es ist auffällig, dass die Reduktion der Parasitenlast nach Behandlung mit Miltefosin bei den THP1-Zellen deutlich stärker war als bei den Versuchen mit BMMs. Eine Leishmania-Infektion ist ein Stress für die Wirtszelle. Zusätzlich waren die THP1-Zellen dem Stress durch Miltefosin ausgesetzt. Möglicherweise konnten sich aus diesem Grund nur gering oder nicht infizierte Zellen behaupten, während sich stärker infizierte Zellen abgelöst haben und durch die Waschschriffe mit PBS entfernt wurden. Dies könnte zu der scheinbar starken Reduktion der Parasitenlast geführt haben.

Unabhängig von der Richtigkeit dieser These scheint es grundsätzlich nicht ratsam, Zellen für ein Wirkstoff-*screening* zu verwenden, wenn diese selbst empfindlich gegen die zu testenden Wirkstoffe sind. Da Miltefosin einer der wirksamsten Antileishmaniwirkstoffe ist, wird es beim Testen neuer Wirkstoffe oft als Vergleich herangezogen.<sup>27,42</sup> Aktuell wird, unter anderem auch in der AG Clos des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg, in der diese Arbeit erstellt wurde, an Miltefosinderivaten geforscht. Zum einen ist anzunehmen, dass die THP1-Zellen auch auf diese empfindlich reagieren, zum anderen ist Miltefosin beim Testen seiner Derivate als internen Standard unverzichtbar, was den Einsatz von THP1-Zellen in diesen Tests ausschließt.

Die THP1-Zellen sind jedoch nicht allgemein empfindlich gegen Antileishmaniwirkstoffe. Für Aminosidinsulfat und Natriumstibogluconat wurde eine relativ hohe Toxizitätsgrenze von rund 300  $\mu\text{M}$  festgestellt.<sup>38</sup> Insofern sind THP1-Zellen nicht grundsätzlich für ein Wirkstoff-*screening* ungeeignet.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass die THP1-Zellen grundsätzlich eine gute Alternative zu Maus-Knochenmarks-Makrophagen darstellen. Aufgrund ihrer Sensitivität gegen viele Wirkstoffe, vor allem gegen das oft als Standard verwendete Miltefosin, sind sie für ein Wirkstoff-*screening* jedoch nur bedingt geeignet. Daher sind echte *ex vivo* Makrophagen hierfür das bessere Modell.

## 5.2 Semiquantitative *real-time* PCR

### 5.2.1 Semiquantitative *real-time* PCR vs. Mikroskopie

Sowohl für die THP1-Zellen, als auch für die Maus-Knochenmarks-Makrophagen wurden mit der semiquantitativen *real-time* PCR Ergebnisse erzielt, die eine sehr gute Korrelation zu denen der mikroskopischen Auswertung aufwiesen. In dieser Hinsicht erscheinen die beiden Methoden somit gleichwertig.

Bei der weiteren vergleichenden Bewertung liegt das Augenmerk besonders auf dem Fehlerpotenzial, der Objektivität, dem Zeit- und Arbeitsaufwand sowie dem hierdurch implizierten Kostenfaktor.

Bei der mikroskopischen Betrachtung von Zellen im DAPI- und im RFP-Kanal wurde deutlich, wie subjektiv und damit fehleranfällig die händische Auszählung von Leishmanien ist. Üblicherweise werden für die Auswertung von Infektionsrate und Parasitenlast nur die Zellkerne und Kinetoplasten mit DAPI gefärbt und auf eine Immunfluoreszenzfärbung oder eine andere Gegenfärbung, mit der eine Beurteilung der Morphologie der Zellen möglich wäre, verzichtet. Dies kann fehlerhaft Ergebnisse zur Folge haben. Wie unter 4.2.2 gezeigt wurde, kann der Zellkern eines Makrophagen dessen Membran bereits zerstört ist, im DAPI-Kanal noch völlig intakt aussehen. Bei alleiniger Betrachtung der Zellen im DAPI-Kanal, werden daher fälschlicherweise auch zerstörte Zellen mit in die Auswertung mit einbezogen. Zudem können trotz gründlichen Waschens mit PBS freie Parasiten auf dem Objektträger verbleiben. Wenn diese sich in der Nähe von Makrophagen befinden, ist es für den Betrachter ohne eine Gegenfärbung teils sehr schwierig zwischen intra- und extrazellulären Parasiten zu unterscheiden. Die bisher beschriebenen Fehlerquellen kommen genauso bei der quantitativen *real-time* PCR zum Tragen. Extrazelluläre Parasiten sowie DNA von bereits zerstörten Makrophagen gehen auch hier in die Auswertung mit ein. Eine weitere Fehlerquelle, die sich auch auf die Zuordnung von Parasiten zu einem Makrophagen bezieht, ist jedoch nur bei der mikroskopischen Auswertung relevant. Es konnte beobachtet werden, dass die Makrophagen sich zum Teil sehr weit ausbreiten und die in deren Peripherie befindlichen Parasiten aufgrund ihrer Entfernung zum Zellkern, dem Makrophagen bei alleiniger Betrachtung des DAPI-Kanals nicht zugeordnet werden können. Bei der semiquantitativen *real-time* PCR werden dagegen alle intrazellulären Parasiten berücksichtigt. Eine weitere Fehlerquelle, die einzig mit der Mikroskopie assoziiert ist, ist die Gefahr, dass im DAPI-Kanal Leishmania-Kinetoplasten, die sehr nah

am Makrophagenzellkern liegen, von diesem überstrahlt und so übersehen werden. Hierbei handelt es sich um eine grundsätzliche Problematik der DAPI-Färbung. Je mehr DNA vorhanden ist, umso stärker ist das Fluoreszenzsignal. Insofern leuchtet der verhältnismäßig große Makrophagenzellkern immer stärker als die sehr kleinen Zellkerne oder Kinetoplasten eines Parasiten.

Ein weiterer Aspekt, der nicht unterschätzt werden darf, ist die Subjektivität der mikroskopischen Auswertung, die unter anderem durch eine bestimmte Erwartungshaltung des Betrachters begründet ist. Oft ist es Ermessenssache, ob Parasiten einem Makrophagen zugeordnet werden oder nicht. Im Zweifelsfall wird ein Betrachter Parasiten seiner Erwartung entsprechend einem Makrophagen zuordnen oder nicht. Die Ergebnisse der semi-quantitativen *real-time* PCR hingegen lassen keinen Ermessensspielraum zu. Bezüglich des Fehlerpotentials und der Objektivität hat die semiquantitative *real-time* PCR somit Vorteile gegenüber der Mikroskopie.

Deutliche Vorteile weist die evaluierte PCR-Methode außerdem bezüglich des Zeit- und Arbeitsaufwandes und damit der Wirtschaftlichkeit auf. Hinsichtlich der vorbereitenden Arbeiten, sprich DAPI-Färbung und Isolierung genomischer DNA, ergibt sich kein relevanter Unterschied. Bei der eigentlichen Auswertung jedoch gibt es große Unterschiede. Die folgenden Schätzungen basieren auf den während der durchgeführten Arbeiten gesammelten Erfahrungen. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden pro Versuchsansatz 400 Makrophagen ausgezählt. Dafür wurden durchschnittlich 2 Stunden benötigt. Da diese Arbeit sehr aufwendig und anstrengend ist, müssen Pausen eingeplant werden. Bestenfalls kann also mit 2,5 Stunden für einen Ansatz gerechnet werden. In dieser Arbeit waren insgesamt 6 Ansätze auszuwerten. Somit wurden 18 Arbeitsstunden benötigt. Für das Pipettieren aller 6 Ansätze bei der semiquantitativen *real-time* PCR wird dagegen nur 1 Stunde benötigt. Dies ergibt eine Arbeitszeit-Ersparnis von 17 Stunden. Es können mit dieser Methode also enorme Personalkosten gespart werden, besonders wenn man berücksichtigt, dass diese Versuche nicht nur einmalig, sondern in vielfacher Ausführung durchgeführt werden. Die Materialkosten sind aufgrund der kostenintensiven Sonden bei der semiquantitativen *real-time* PCR etwas höher, fallen aber vergleichsweise kaum ins Gewicht.

Die semiquantitative *real-time* PCR kann des Weiteren in einem gewissen Rahmen Auskunft über die Zytotoxizität der getesteten Wirkstoffe geben. Eine signifikante Erhöhung

des CT-Wertes der Wirtszell-DNA im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollgruppe kann eine Zytotoxizität des getesteten Wirkstoffs andeuten. Bei der mikroskopischen Auswertung kann durch Bewertung der Integrität der Zellkerne ebenfalls nur eine grobe Einschätzung der Zytotoxizität gemacht werden. Insofern sind die beiden Methoden in dieser Hinsicht als gleichwertig zu betrachten.

Als Fazit kann insgesamt geschlussfolgert werden, dass es sich bei der semiquantitativen *real-time* PCR um eine sehr gut geeignete Methode im Rahmen eines Niedrig-Durchsatz-Wirkstoff-*screenings* handelt, die hinsichtlich der Parasitenlast mit der mikroskopischen Auswertung vergleichbare Ergebnisse liefert, dieser jedoch in Hinsicht auf Objektivität, Zeitaufwand und Arbeitsaufwand – und damit Wirtschaftlichkeit – weit überlegen ist.

### 5.2.2 Vergleich mit anderen PCR-Verfahren

Wie bereits erwähnt, wurden zur Ermittlung von Parasitenlasten verschiedener Wirtszellen nach *in vitro* Infektionen mit *Leishmania spp.* bereits einige (semi)quantitative *real-time* PCR-Methoden entwickelt.<sup>25,26,27,28</sup> Einen Vergleich der Ergebnisse mit denen der mikroskopischen Auswertung haben lediglich Ordóñez-Gutiérrez *et al.* angestellt. Hierfür wurden J774-Zellen mit *L. infantum* infiziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem Gerstencystatin, einem Protein, dessen Antileishmaniaaktivität in dieser Studie nachgewiesen wurde, behandelt. Anschließend wurde eine Färbung nach Giemsa durchgeführt oder die genomische DNA isoliert. Die Parasitenlasten wurden mikroskopisch und durch quantitative *real-time* PCR (absolute Quantifizierung) ermittelt, wobei SYBR® Green eingesetzt wurde. Die absoluten Parasitenlasten wichen zwar zum Teil deutlich voneinander ab, die abnehmende Tendenz bei Behandlung mit dem Gerstencystatin war jedoch bei beiden Auswertungsmethoden deutlich zu erkennen. Wie auch in dieser Arbeit wurde geschlussfolgert, dass die quantitative *real-time* PCR eine zeit- und arbeitssparende Alternative zu der händischen Auszählung ist.<sup>26</sup>

Der Einsatz von *TaqMan*®-Sonden macht die in dieser Arbeit etablierte Methode jedoch deutlich spezifischer als solche bei denen SYBR® Green verwendet wird.<sup>25,26</sup> Während der Cyanin-Farbstoff in alle doppelsträngigen DNA-Moleküle interkaliert, also auch in unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere, die sich kaum vermeiden lassen, binden *TaqMan*®-Sonden hoch spezifisch an eine Sequenz auf dem Amplifikat. Außerdem erlaubt die sondenbasierte PCR das Pipettieren der Proben als Duplex, was Material, Zeit und

Arbeit spart sowie die Proben-Kapazitäten erhöht. Da im Rahmen des Wirkstoff-*screening* keine absolute Quantifizierung notwendig ist, sondern nur die Reduktion der Leishmanien-DNA im Verhältnis zur DNA der Wirtszelle relevant ist, ist die semiquantitative *real-time* PCR gut geeignet. Bei dieser Form der PCR muss nicht, wie bei der immer noch oft durchgeführten absoluten Quantifizierung<sup>25,27,28</sup> eine definierte Menge an DNA eingesetzt werden, was eine mögliche Fehlerquelle (Bestimmung der DNA-Konzentration) ausschließt. Außerdem kann auf die Erstellung von Kalibriergeraden verzichtet werden.

Die Frage, ob sich DNA oder RNA besser für die Quantifizierung von Parasitenlasten eignet wird viel diskutiert. Der Einsatz von genomischer DNA, wie in dieser Arbeit erfolgt, ist zum einen sehr komfortabel, da die Isolierung sehr schnell und einfach durchzuführen ist. Zum anderen stellt sie im Gegensatz zu RNA ein direktes Maß für die Zahl der vorhandenen Parasiten und Wirtszellen in einer Probe dar und ist nicht von der Expression der *template*-Gene abhängig. Aufgrund der Langlebigkeit von DNA werden jedoch auch tote Leishmanien mit in die Auswertung mit einbezogen, was bei dem Einsatz von RNA nicht der Fall ist, da diese beim Zelltod sehr schnell abgebaut wird.<sup>43</sup> In dieser Hinsicht weist die verwendete Methode sowohl Vor- als auch Nachteile im Vergleich mit solchen, bei denen RNA<sup>44</sup> bzw. rRNA<sup>27</sup> verwendet wird, auf. Allerdings konnte unter Miltefosin-Behandlung eine Reduktion der Parasiten-DNA bis zur Nachweisgrenze erzielt werden, was auf eine rasche Beseitigung der Parasiten-DNA im Wirt hindeutet.

Die in dieser Arbeit etablierte semiquantitative *real-time* PCR zeichnet sich gegenüber anderen, bereits getesteten PCR-Methoden zur Ermittlung von Parasitenlasten besonders durch die Kombination von genomischer DNA als *template*, die Nutzung von *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden und die relative Quantifizierung aus. Sie weist eine hohe Spezifität auf und reduziert gleichzeitig den Zeit- und Arbeitsaufwand auf ein Minimum.

### 5.3 Durchflusszytometrie

Die vor Beginn der eigentlichen Versuche zur Ermittlung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Vorversuche zeigten, dass sich mit CFSE markierte Leishmanien mit dieser Methode von nicht markierten unterscheiden lassen. Dasselbe gilt für Makrophagen, die mit markierten Leishmanien infiziert wurden und für nicht infizierte Makrophagen. Der letzte Vorversuch sollte zeigen, inwieweit ein Verblässen der Fluoreszenz bei Verdau der Leishmanien durch die Makrophagen eintritt. Durch die Verwendung

von *L. donovani* 1SR HSP23 -/-, einem rekombinanten Leishmania-Stamm, der nicht in der Lage ist, im Phagolysosom eines Makrophagen zu überleben<sup>35</sup>, sollte sichergestellt werden, dass die infizierten Makrophagen in der Lage sind, zumindest einen Teil der Parasiten zu verdauen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten tatsächlich unterschiedlich stark fluoreszierende intrazelluläre Amastigoten beobachtet werden. Allerdings kann lediglich vermutet werden, dass es sich hierbei um Parasiten handelt, die zum Zeitpunkt der Fixierung im Phagolysosom verdaut wurden. Sowohl Mikrotubuli als auch Zellkern und Kinetoplast werden bei einem Verdau vollständig degradiert. Es gibt daher keine Möglichkeit, die ehemalige Anwesenheit eines Parasiten nachzuweisen. Wären jedoch CFSE-markierte Parasiten aufgrund ihrer Fluoreszenz im GFP-Kanal sichtbar, aber im DAPI- und RFP-Kanal nicht sichtbar gewesen, hätte dies ein unvollständiges Verblässen des Farbstoffes bewiesen. Dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass keine systematische, sondern nur eine stichprobenartige Untersuchung durchgeführt wurde. Die beobachtete verblassende Fluoreszenz einiger Amastigoten könnte des Weiteren auch auf die Proliferation der Zellen zurückzuführen zu sein. Da sich bei jeder Zellteilung auch der Farbstoff auf die Zellen aufteilt, nimmt die Fluoreszenzintensität immer mehr ab.<sup>45</sup>

Die nachfolgenden Versuche zeigten, dass sich die in dieser Arbeit getestete durchflusszytometrische Methode nicht bzw. nur sehr bedingt für die Ermittlung von Infektionsraten eignet. Es wurden verschiedene Infektionsverhältnisse getestet, wobei auffiel, dass die Infektionsraten insgesamt, auch bei den Kontrollgruppen, deutlich höher erschienen, als dies bei der mikroskopischen Auswertung der Fall war. Hierfür kann es mehrere Erklärungen geben. Zum einen werden bei der Durchflusszytometrie nur intakte Zellen in die Auswertung mit einbezogen. Durch die Vorbereitung der Zellen, welche das Abschaben und mehrmaliges Zentrifugieren beinhaltet, verlieren Zellen mit zerstörter oder beschädigter Zellwand ihre Form. Die Zelltrümmer werden bei der Durchflusszytometrie durch *gating* der Größe nach ausgeschlossen. So werden z.B. Zellen, die die zuvor enthaltenen Parasiten freigesetzt haben und in der mikroskopischen Auswertung als nicht infiziert gewertet werden würden bei der Durchflusszytometrie nicht berücksichtigt. Zum anderen ist die Durchflusszytometrie eine sehr sensitive Methode. Da die Fluoreszenz des CFSE sehr intensiv ist, reicht vermutlich ein einziger Parasit aus, um einen Makrophagen als infiziert zu identifizieren. Wie bereits unter 5.2.1 diskutiert, kann es im Rahmen der Mik-

roskopie durchaus passieren, dass Parasiten übersehen oder fälschlicherweise dem Makrophagen nicht zugeordnet werden. Eine weitere Ursache könnte die Hauptproblematik der vorgestellten durchflusszytometrischen Methode sein. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, erscheinen selbst überwundene Infektionen hierbei positiv, so dass die Infektionsrate höher erscheint, als sie tatsächlich ist.

Die Reduktion der Parasitenlast unter Miltefosin-Behandlung konnte bei den THP1-Zellen unter keiner der getesteten Bedingungen nachgewiesen werden. Bei den BMMs war mit dem Infektionsverhältnis 1:3 eine geringfügige Reduktion der Infektionsrate nach 24 h und 48 h zu beobachten. Die Tendenz entsprach der bei der mikroskopischen Auswertung beobachteten, war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Eine Signifikanz konnte nur für die Proben nach 48 h festgestellt werden, wogegen dies bei der mikroskopischen Auswertung schon bei Behandlung mit 25  $\mu$ M Miltefosin nach 24 h der Fall war. Für ein Wirkstoff-*screening* reicht diese geringe Sensitivität nicht aus.

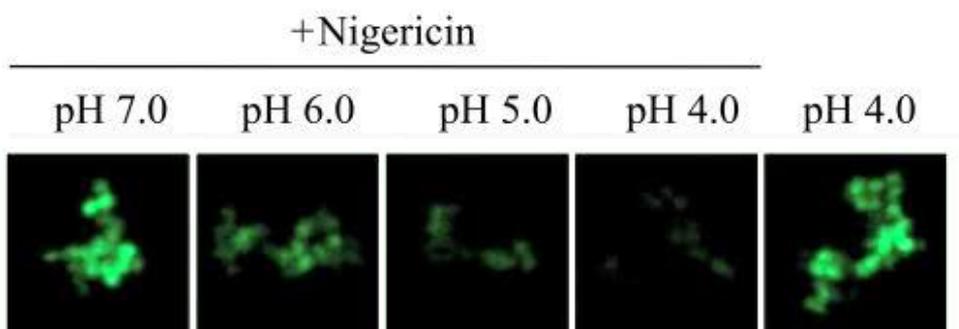
Die Vermutung, dass möglicherweise die Fluoreszenzintensität des CFSE zu hoch ist, und dadurch kein vollständiges Verblässen der Fluoreszenz eintritt, wurde durch einen Versuch, bei dem BMMs im Verhältnis 1:3 infiziert und für die Markierung der Leishmanien eine reduzierte CFSE-Konzentration verwendet wurde, widerlegt. Es konnten hierdurch lediglich insgesamt niedrigere Infektionsraten erreicht werden. Diese veränderten sich bei Behandlung mit Miltefosin nach 48 h jedoch nicht, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die Signalintensität bei Markierung der Leishmanien mit geringerer CFSE-Konzentration kaum über die Autofluoreszenz von Makrophagen hinausgeht.

Da in den Vorversuchen gezeigt wurde, dass infizierte Makrophagen von nicht infizierten unterschieden werden können, kann der Grund für den fehlgeschlagenen Hauptversuch nur darin zu suchen sein, dass die Fluoreszenz des CFSE beim Verdau der Leishmanien nicht vollständig verloren geht. Wie bereits erwähnt, konnte das vollständige Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes auch in den Vorversuchen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Dass CFSE pH-sensitiv ist und die Fluoreszenz bei pH-Werten unter 5 stark verblasst, wurde bereits 1995 durch Breeuwer *et al.* nachgewiesen.<sup>46</sup> Allerdings kann der Effekt erst dann ein eintreten, wenn der Farbstoff mit der sauren Umgebung des Phagolysosoms in Berührung kommt. Nach der Phagozytose der Leishmanien muss das entstandene Phagosom mit einem Lysosom fusionieren, um ein Phagolysosom zu bilden. Erst dieses weist ein

saures Milieu auf. Es wurde gezeigt, dass Leishmanien diesen Vorgang, der in Makrophagen normalerweise innerhalb einer Stunde erfolgt, bis zu 24 h verzögern können.<sup>47</sup> Das bedeutet, dass die Promastigoten bis zu diesem Zeitpunkt keiner sauren Umgebung ausgesetzt sind. Innerhalb dieser Zeit können sie sich zu Amastigoten umwandeln. In dieser Arbeit erfolgte zu diesem Zeitpunkt (24 h nach Infektion) die Behandlung der infizierten Makrophagen mit Miltefosin. Das bedeutet, dass die Parasiten der sauren Umgebung für etwa 24 h bzw. 48 h ausgesetzt waren. Über den Zeitraum in dem ein Ausbleichen von CFSE bei saurem pH einsetzt, gibt es keine klaren Aussagen. Jedoch ist einigen Veröffentlichungen zu entnehmen, dass es sich nur um Minuten handeln kann.<sup>46,48</sup> Insofern sollte eine Exposition mit dem sauren Milieu von 24 h bzw. 48 h ausreichend gewesen sein.

Inwieweit jedoch eine Restfluoreszenz stabil bleibt ist fraglich. In einer von Wolf *et al.* veröffentlichten Studie wurden mit CFSE markierte Bakterien, deren Zellwand mithilfe von Nigericin durchlässig gemacht wurde, Puffern mit verschiedenen pH-Werten ausgesetzt. Anschließend wurde mikroskopisch die Intensität der Fluoreszenz überprüft. Bei pH 4 war sie stark verblasst, aber noch sichtbar.<sup>48</sup> Die in Abb. 24 dargestellte Fluoreszenz bei pH 4 könnte noch ausreichen, um die Autofluoreszenz von Makrophagen zu überstrahlen und diese als infiziert erscheinen zu lassen. Da aus der Versuchsbeschreibung nicht hervorgeht, für welchen Zeitraum die Bakterien den entsprechenden Puffern ausgesetzt waren, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob bzw. wie lange der Farbstoff diese Restfluoreszenz behält.



**Abbildung 24: : pH-abhängige Fluoreszenzintensität von CFSE.**

*Staphylococcus aureus* wurde mit CFSE markiert und die Membran durch den Einsatz von Nigericin durchlässig gemacht. Die Bakterien wurden Puffern mit verschiedenen pH-Werten ausgesetzt. Übernommen aus: Wolf, A. J. Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J Immunol* 187, 6002–6010 (2011).<sup>48</sup>

Insgesamt ist festzustellen, dass sich die Durchflusszytometrie in Verbindung mit CFSE-markierten Leishmanien zum Nachweis einer Reduktion der Infektionsrate von Makrophagen nach Behandlung mit einem Wirkstoff nicht geeignet ist.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich mit dieser Methode durchaus der Erfolg einer Infektion bewerten lässt, was sie für andere Zwecke, wie zum Beispiel das schnelle Testen der Infektiosität von Leishmanien oder der Aufnahmefähigkeit von Wirtszellen nutzbar macht.

## 6 Zusammenfassung

Leishmaniose ist eine weltweit verbreitete parasitische Infektionskrankheit, die von obligat intrazellulären Protozoen der Gattung *Leishmania* (*L.*) verursacht und von weiblichen Sandmücken auf Menschen und Tiere übertragen wird. Im Verlauf ihres Lebenszyklus existieren sie als Pro- und Amastigoten. Im Menschen kommen die Parasiten fast ausschließlich innerhalb von Makrophagen als Amastigoten vor. Es gibt nur wenige zuverlässige Therapieoptionen und die vorhandenen Medikamente haben zum Teil starke Nebenwirkungen. Zusätzlich kam es in den letzten Jahrzehnten verstärkt zu Resistenzentwicklungen gegen einige Wirkstoffe. Die Entwicklung neuer Medikamente steht daher im Fokus der *Leishmania*-Forschung. Um potentielle Wirkstoffe in großem Maßstab testen zu können, bedarf es Methoden, die möglichst wenig zeit-, arbeits- und kostenintensiv sind. Standardmäßig erfolgt das Wirkstoff-*screening* durch Infektion von Maus-Knochenmarks-Makrophagen *in vitro* mit Parasiten und anschließende Behandlung mit den zu testenden Wirkstoffen. Durch mikroskopische Auswertung von Parasitenlast und Infektionsrate wird dann die Effektivität der Wirkstoffe beurteilt. Die händische mikroskopische Auswertung von *in vitro* Infektionen ist durch einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand gekennzeichnet und ist zudem sehr subjektiv. In dieser Arbeit wurden zwei alternative Methoden zur Ermittlung der Parasitenlast und Infektionsrate vergleichend mit der herkömmlichen mikroskopischen Methode evaluiert. Neben Maus-Knochenmarks-Makrophagen, die regelmäßig frisch aus Mäusen isoliert werden müssen, wurde auch die bisher wenig verwendete immortalisierte Zelllinie „THP1“ eingesetzt. Die Wirtszellen wurden mit *L. donovani* infiziert und anschließend mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen behandelt, einem zugelassenen Medikament gegen Leishmaniose. Mit einer semiquantitativen *real-time* PCR-Methode konnten für die Parasitenlast Ergebnisse erzielt werden, die mit denen der mikroskopischen Auswertung sehr gut korrelieren. Mithilfe der durchflusszytometrischen Methode, bei der die für die Infektion verwendeten Parasiten zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) markiert wurden, war es möglich, zwischen infizierten und nicht infizierten Makrophagen zu differenzieren. Die mikroskopisch nachgewiesene Reduktion der Infektionsrate infolge der Behandlung mit Miltefosin konnte mit dieser Methode jedoch nicht gezeigt werden. Die THP1-Zellen zeigten sich grundsätzlich als eine gute Alternative zu den Maus-Knochenmarks-Makrophagen, wiesen aber eine sehr geringe Miltefosintoleranz auf.

## 7 Quellenverzeichnis

1. Young, D. *et al.* Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 24(5), 587–589 (1987).
2. Mathers, C. D., Ezzati, M. & Lopez, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e114 (2007).
3. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *WHO Tech. Rep. Ser. No.* 949, (2010).
4. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–82 (2007).
5. Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191–1199 (1999).
6. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–77 (2005).
7. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671 (2012).
8. Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–15 (2011).
9. Matlashewski, G. *Leishmania* infection and virulence. *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 37–42 (2001).
10. Dillon, R. J. & Lane, R. P. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. *Parasitology* 118, 27–32 (1999).
11. Nühs, A. *et al.* A novel marker, ARM58, confers antimony resistance to *Leishmania* spp. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* 4, 37–47 (2014).
12. Sundar, S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 89–92 (2001).
13. Croft, S. L., Sundar, S. & Fairlamb, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–26 (2006).
14. Soto, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 38, 1266–72 (2004).
15. Guerin, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis : current status of control , diagnosis , and treatment , and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2, 494–501 (2002).

16. Sundar, S. *et al.* Oral Miltefosine for Indian visceral Leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1739–1746 (2002).
17. Sundar, S. *et al.* Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. *Clin. Infect. Dis.* 38, 377–383 (2004).
18. Murray, H. W. Progress in treatment of a neglected disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti-infect Ther* 2, 279–292 (2004).
19. Croft, S. L., Seifert, K. & Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 399–410 (2006).
20. Gupta, S. *et al.* Visceral leishmaniasis : Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* 133, 27–39 (2011).
21. Seifert, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med. Chem. J.* 5, 31–9 (2011).
22. Sereno, D., Cordeiro da Silva, a, Mathieu-Daude, F. & Ouaisi, a. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol. Int.* 56, 3–7 (2007).
23. Rocha, M. N. *et al.* An alternative in vitro drug screening test using Leishmania amazonensis transfected with red fluorescent protein. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 282–291 (2013).
24. Buckner, F. S. & Wilson, A. J. COLORIMETRIC ASSAY FOR SCREENING COMPOUNDS AGAINST LEISHMANIA AMASTIGOTES GROWN IN MACROPHAGES. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 600–605 (2005).
25. Dabirian, S. *et al.* Human neutrophil peptide-1 (HNP-1): a new anti-leishmanial drug candidate. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2491 (2013).
26. Ordóñez-Gutiérrez, L. *et al.* Leishmania infantum: antiproliferative effect of recombinant plant cystatins on promastigotes and intracellular amastigotes estimated by direct counting and real-time PCR. *Exp. Parasitol.* 123, 341–6 (2009).
27. Van den Bogaart, E., Schoone, G. J., Adams, E. R. & Schallig, H. D. F. H. Duplex quantitative Reverse-Transcriptase PCR for simultaneous assessment of drug activity against Leishmania intracellular amastigotes and their host cells. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* 4, 14–9 (2014).
28. Tellevik, M. G., Muller, K. E., Løkken, K. R. & Nerland, A. H. Detection of a broad range of Leishmania species and determination of parasite load of infected mouse by real-time PCR targeting the arginine permease gene AAP3. *Acta Trop.* 137, 99–104 (2014).

29. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47(1), 22–31 (1991).
30. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–6 (1980).
31. Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S. & Mor, G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, 80–86 (2013).
32. Mülhard, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
33. Jacob, D. Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen. (2003).
34. Morais-teixeira, E. D. *et al.* The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine ( miltefosine ) against four medically relevant Leishmania species of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 475–478 (2011).
35. Hombach, A., Ommen, G., MacDonald, A. & Clos, J. A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of Leishmania donovani. *J. Cell Sci.* 4762–4773 (2014). doi:10.1242/jcs.157297
36. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. & Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* 59, 555–561 (1996).
37. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 1–9 (2013). doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
38. Grebe-Hiwot, A. *et al.* An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP1. *Acta Trop.* 51, 237–245 (1992).
39. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y. & Diester, P. Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by. *Cancer Res.* 42, 1530–1536 (1982).
40. Bremer, T. A. *et al.* THP-1 monocytic leukemia cells express Fas ligand constitutively and kill Fas-positive Jurkat cells. *Leuk. Res.* 23, 865–70 (1999).
41. Rottem, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 83, 417–432 (2003).
42. Fortin, A. *et al.* Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OLPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2707–2712 (2012).

43. Colombo, F. *et al.* Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 109, 267–274 (2011).
44. Reimão, J. Q., Colombo, F. a., Pereira-Chioccola, V. L. & Tempone, A. G. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of Leishmania (L.) infantum chagasi. *Exp. Parasitol.* 130, 195–199 (2012).
45. Lyons, A. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods* 243, 147–54 (2000).
46. Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Rombouts, F. M. & Abee, T. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 178–183 (1996).
47. Rodríguez, N. E., Gaur Dixit, U., Allen, L.-A. H. & Wilson, M. E. Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS One* 6, e19000 (2011).
48. Wolf, A. J. *et al.* Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J. Immunol.* 187, 6002–10 (2011).
49. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur.* (Spektrum Akademischer Verlag, 2011).