

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. Jörg Vogel

**Untersuchungen zur Autophagieinduktion in  
*Leishmania major*-infizierten Knochenmarksmakrophagen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Benjamin Frank**

aus Stimpfach

Würzburg, September 2015

**Referent:** Prof. Dr. Andreas Beilhack

**Korreferent:** Prof. Dr. Klaus Brehm

**Betreuerin:** Dr. Uta Schurig

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.06.2016

**Der Promovend ist Arzt**

Für meine Familie.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Leishmaniose.....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Lebenszyklus der Leishmanien .....	1
1.1.3 Formen der Leishmaniose .....	4
1.1.4 Derzeitige Behandlung der Leishmaniose.....	6
1.2 Autophagie.....	7
1.2.1 Allgemeines zur Autophagie .....	7
1.2.2 Autophagie in Infektionskrankheiten .....	9
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	11
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Materialien und Geräte .....	13
2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien .....	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	14
2.1.3 Geräte .....	15
2.1.4 Antikörper und siRNAs.....	16
2.1.5 Medien und Puffer.....	17
2.1.6 Verwendete Leishmanien-Stämme, Zelllinien und Versuchstiere .....	19
2.1.7 Software .....	20
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Zellkulturmethoden .....	20
2.2.1.1 Kultivierung von <i>L. m.</i> Promastigoten .....	20
2.2.1.2 Ernte und Bestimmung der Zellzahl von <i>L. m.</i> Promastigoten.....	21
2.2.1.3 Kultivierung und Gewinnung des Überstands von L929-Zellen.....	21
2.2.1.4 Generierung von BMDM aus SZ .....	22
2.2.1.5 Infektion von BMDM mit <i>L. m.</i> Promastigoten .....	23
2.2.1.6 Autophagieinduktion in nicht-infizierten BMDM.....	24
2.2.2 Lichtmikroskopie .....	24
2.2.2.1 Bestimmung der Infektionsrate in <i>L. m.</i> -infizierten BMDM.....	24
2.2.2.2 Bestimmung des Nukleus-Kinetoplast-Abstands in <i>L. m.</i> -infizierten BMDM .....	25
2.2.3 TEM .....	25
2.2.3.1 Einbettung der Proben für TEM .....	25

2.2.3.2	Erstellung eines semiquantitativen Scores zur Autophagiemessung.....	27
2.2.3.3	Elektronentomografie .....	28
2.2.4	Transkriptomanalysen .....	28
2.2.4.1	Isolation von RNA aus <i>L. m.</i> -infizierten BMDM.....	28
2.2.4.2	Hybridisierung von Affymetrix Microarrays .....	29
2.2.4.3	Bioinformatische Aufbereitung der Microarray-Daten .....	30
2.2.5	Western-Blot-Analysen .....	30
2.2.5.1	Gewinnung von Proteinlysaten.....	30
2.2.5.2	Herstellung der SDS-PAGE-Gele .....	31
2.2.5.3	Aufbau und Durchführung der Western Blots.....	32
2.2.6	Herunterregulation der Genexpression mit siRNA .....	33
2.2.7	Statistische Methoden .....	34
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Autophagieinduktion in <i>L. m.</i> -infizierten BMDM.....	36
3.1.1	TEM Untersuchungen zur Autophagieinduktion .....	36
3.1.2	Untersuchung der Autophagieinduktion mit LC3B Western-Blot-Analysen	39
3.2	Verdau von <i>L. m.</i> Parasiten in BMDM .....	43
3.3	Untersuchung weiterer autophagierelevanter Proteine .....	44
3.3.1	Untersuchungen der Expression von ATG5.....	45
3.3.2	Untersuchungen der Expression von UB .....	47
3.4	Rolle von MLS im Verdau von <i>L. m.</i> Parasiten.....	47
3.5	Identifikation infektionsspezifischer Gene .....	50
3.5.1	Erstellung eines Netzwerks aus autophagierelevanten Genen .....	50
3.5.2	Identifikation weiterer infektionsspezifischer Autophagiegene.....	53
3.6	Untersuchung von BNIP3 und CTSE als autophagierelevante Proteine .....	54
3.6.1	Untersuchungen der Expression von BNIP3.....	54
3.6.2	Untersuchungen der Expression von CTSE.....	58
3.7	Entwicklung des totalen Autophagiescores während der <i>L. m.</i> Infektion .....	59
4	Diskussion .....	61
5	Zusammenfassung .....	68
6	Abkürzungsverzeichnis .....	70
7	Literaturverzeichnis .....	74
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	79
9	Anhang .....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Leishmaniose

### 1.1.1 Allgemeines

Bei der Leishmaniose handelt es sich um eine durch Parasiten der Gattung *Leishmania* (*L.*) verursachte Infektionskrankheit [1]. Der Name *Leishmania* bzw. Leishmaniose geht auf den schottischen Tropenarzt und Pathologen William Boog Leishman zurück, welcher zusammen mit Charles Donovan im Jahr 1901 den nach beiden benannten Erreger *L. donovani* beschrieben hatte [2]. Laut Weltgesundheitsorganisation (englisch: *World Health Organization*, WHO) gehört die Leishmaniose zu den 17 wichtigsten vernachlässigten Tropenkrankheiten (englisch: *neglected tropical diseases*, NTDs) [3]. Da diese Erkrankung v. a. in den Tropen und Subtropen auftritt, sind meistens Personen in Entwicklungs- und Schwellenländern betroffen. Leishmaniose ist oftmals mit Mangelernährung, schlechten Hygiene- und Lebensbedingungen, einem beeinträchtigten Immunsystem sowie nicht ausreichenden Finanzmitteln verbunden. Die WHO schätzt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen auf ca. 1,3 Millionen. Von den bereits erkrankten Patienten versterben jedes Jahr 20 000 bis 30 000 Menschen [4].

### 1.1.2 Lebenszyklus der Leishmanien

Der Lebenszyklus der Leishmanien besteht im Wesentlichen aus zwei Stadien, nämlich Promastigoten und Amastigoten. Diese zwei Stadien sind ebenfalls durch charakteristische Erscheinungsformen der Parasiten zu unterscheiden. In der promastigoten Form sind die Parasiten länglich, lanzettförmig und beweglich mit einer Größe zwischen 10 und 20  $\mu\text{m}$ . Überdies verfügen Promastigoten an einem Pol über ein Flagellum (Abbildung 1A). Die Promastigoten werden durch eine Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* (Europa, Afrika und Asien) bzw. *Lutzomyia* (Amerika) während einer Blutmahlzeit auf den Vertebratenwirt, darunter v. a. Menschen und Hunde, übertragen. Im Vertebratenwirt werden die Promastigoten von Leukozyten, u. a. Makrophagen, dendritische Zellen (englisch: *dendritic cells*, DCs) und neutrophile Granulozyten aufgenommen. Diese Zellen bilden die erste Barriere des Wirtsimmunsystems und sind ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems. In den Wirtszellen, v. a. Makrophagen, differenzieren

sich die Promastigoten zu runden, unbeweglichen Amastigoten mit einer Größe von ungefähr 2 – 3  $\mu\text{m}$  (Abbildung 1B – D) [1, 5]. Die Differenzierung kann sowohl in parasitophoren Vakuolen als auch im Zytoplasma der Wirtszelle erfolgen [6]. Falls das Immunsystem des Wirts die Infektion nicht durch Abtötung der Parasiten kontrollieren kann, kommt es zur Vermehrung der Amastigoten in den Wirtszellen [1]. Durch Lyse der Wirtszellen werden die Parasiten dann in die Blutbahn abgegeben, wo diese neue Zellen infizieren können. Durch einen erneuten Stich einer Sandmücke werden intrazelluläre und freie Amastigoten wieder aufgenommen. Im Verdauungssystem der Sandmücke differenzieren sich die Amastigoten wieder zu mäßig beweglichen prozyklischen Promastigoten. Hier erfolgen anschließend die Replikation der prozyklischen Promastigoten und schließlich die Differenzierung zu sehr beweglichen metazyklischen Promastigoten. Diese gelangen im Anschluss zu den Mundwerkzeugen der Mücke. Von dort aus können sie bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen neuen Wirt übertragen werden (Abbildung 2) [1, 5].

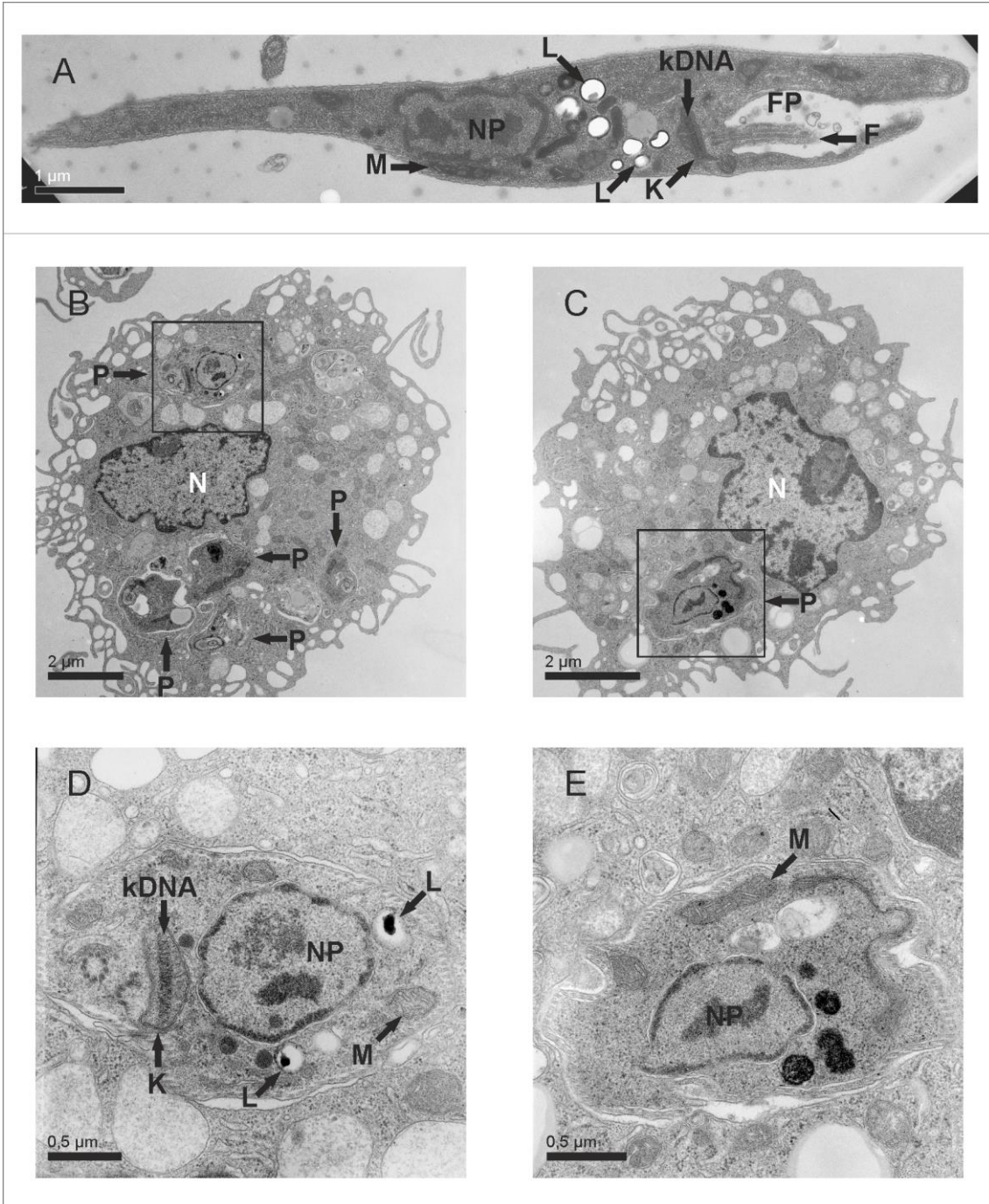


Abbildung 1: TEM-Aufnahmen von *L. m.* Promastigoten und Amastigoten.

(A) lanzettenförmiger *L. m.* Promastigot mit externem Flagellum. Länge des Promastigoten ungefähr 10  $\mu\text{m}$ . (B – E) mit *L. m.* Amastigoten infizierte Makrophagen. *L. m.* Promastigoten haben sich binnen 24 h zu runden Amastigoten mit einer Größe von 2 – 3  $\mu\text{m}$  differenziert. Schwarze Quadrate in B und C markieren die vergrößerten Amastigoten in D und E.

F = Flagellum; FP = flagellare Tasche; K = Kinetoplast; kDNA = Kinetoplasten-DNA; L = lysosomähnliche Vakuole; M = Mitochondrium; N = Nucleus des Makrophagen; NP = Nucleus des Parasiten; P = Parasit.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.



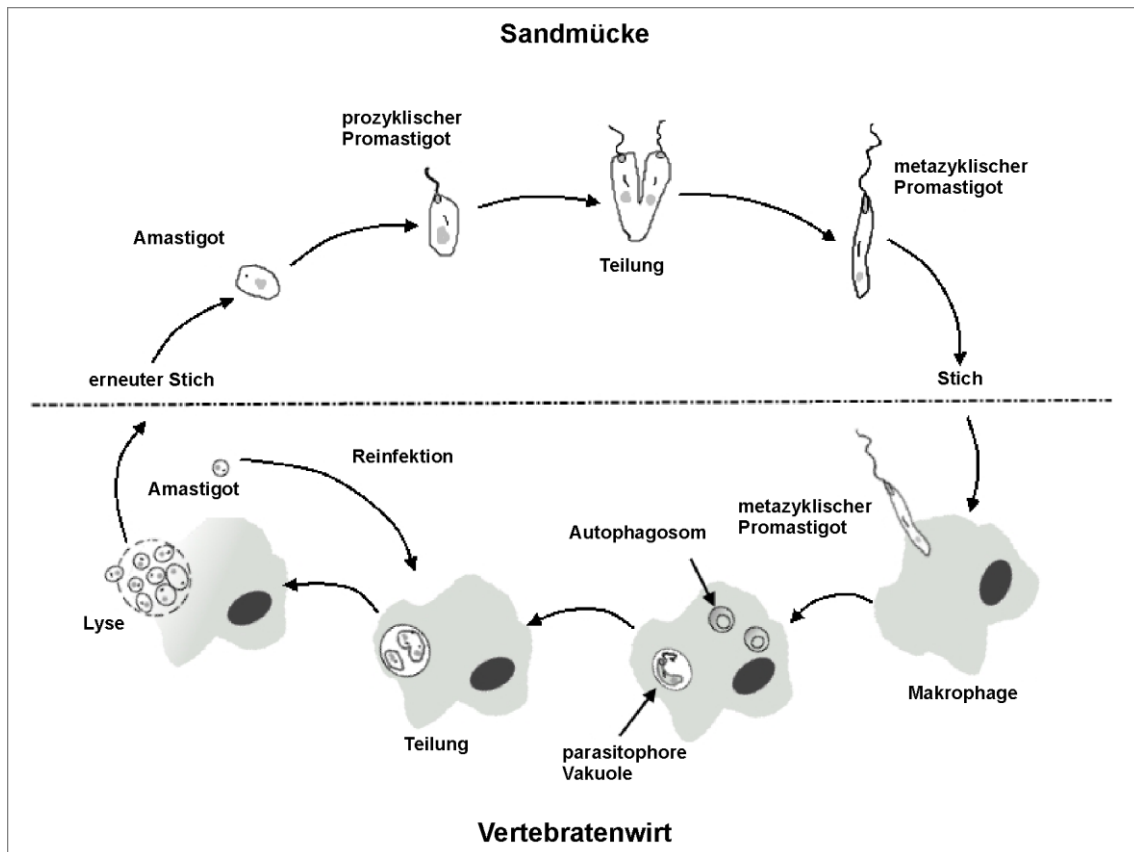


Abbildung 2: Lebenszyklus der *L. m.* Parasiten.

Der Lebenszyklus von *L. m.* besteht aus 2 Phasen. Durch einen Stich werden metazyklische Promastigoten von der Sandmücke (Vektor) in die Blutbahn des Vertebratenwirts übertragen. Promastigoten werden von Makrophagen aufgenommen. In den Wirtszellen erfolgen die Differenzierung zu Amastigoten und die anschließende Vermehrung durch Zellteilung. Durch Lyse der Wirtszellen gelangen die Amastigoten wieder in die Blutbahn, um neue Zellen zu infizieren. Mit einer erneuten Blutmahlzeit werden intra- und extrazelluläre Amastigoten wieder von der Sandmücke aufgenommen. In der Sandmücke erfolgt eine Differenzierung von Amastigoten zu prozyklischen Promastigoten. Nach Vermehrung durch Zellteilung differenzieren sich die prozyklischen Promastigoten zu metazyklischen Promastigoten.

Abbildung wurde aus [8] entnommen und anschließend modifiziert.

### 1.1.3 Formen der Leishmaniose

Man unterscheidet bei der Leishmaniose zwischen drei verschiedenen Formen: der kutanen, der mukokutanen und der viszeralen Leishmaniose. Die Schwere einer Leishmanieninfektion und die damit verbundenen Symptome hängen u. a. von der Leishmanienart und dem Immunsystem des Betroffenen ab [7].

Bei der kutanen Leishmaniose, welche auch als Hautleishmaniose bezeichnet wird, handelt es sich um die am häufigsten auftretende Form der Leishmaniose [4]. Diese Form wird v. a. durch die Arten *L. aethiops*, *L. major* (*L. m.*), *L. mexicana* und *L. tropica*

verursacht. Eine durch *L. m.* hervorgerufene kutane Leishmaniose wird in manchen Regionen auch als Orient- oder Aleppobeule bezeichnet. Nachdem der Betroffene von einer infizierten Sandmücke an einer unbedeckten Körperstelle gestochen worden ist, entsteht eine papulöse Entzündung. Dies führt zur Entstehung von trockenen oder feuchten Geschwüren, welche in vielen Fällen ulzerieren. Meistens heilt diese Form selbstlimitierend unter Narbenbildung innerhalb eines Jahrs ab. Es kann in seltenen Fällen jedoch auch zu Rezidiven kommen [1]. Über 95 % der Fälle dieser Form kommen in Amerika, dem Mittelmeerraum, dem Nahen Osten und Zentralasien vor. Es sind v. a. Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, Iran und Syrien betroffen. In diesen 6 Ländern kommen über 65 % der Neuinfektionen vor. Weltweit treten jährlich 0,7 bis 1,3 Millionen Neuinfektionen auf [4].

Die mukokutane Leishmaniose wird auch Espundia oder Uta genannt und v. a. durch *L. braziliensis* verursacht. Häufig zeigen sich hier der gleiche Verlauf und Symptome wie bei der kutanen Leishmaniose. Jedoch kommt es nach ca. zwei Jahren nach Abklingen der kutanen Symptome zu einem Rezidiv mit dem Befall mukokutaner Membranen. Es zeigen sich Ulzerationen, welche in den meisten Fällen von Nase und Nasenseptum ausgehen, wodurch diese teilweise oder sogar vollkommen zerstört werden. Im weiteren Verlauf können auch Oropharynx und Larynx mitbetroffen sein. In besonders schweren Fällen können sich folgeschwere Entstellungen bis zur vollständigen Destruktion des Gesichts zeigen. Betroffene Patienten versterben nicht durch die Infektion selbst, sondern in den meisten Fällen durch Sekundärinfektionen, z. B. in Folge einer Aspirationspneumonie, Mangelernährung oder Erstickung [1, 4]. Laut WHO treten fast 90 % der beschriebenen Fälle in Bolivien, Brasilien und Peru auf [4].

Die dritte und zugleich schwerste Form der Leishmaniose, die viszerale Leishmaniose, wird auch innere Leishmaniose oder Kala-Azar genannt. Sie ist eine unbehandelt tödlich verlaufende Form der Leishmaniose. Typische Erreger dieser Form sind *L. chagasi*, *L. donovani* und *L. infantum*. Nach Infektion durch eine weibliche Sandmücke kommt es zur Vermehrung der Parasiten in der Haut und regionalen Lymphknoten. Nachdem die Parasiten in die Blutbahn gelangt sind, erfolgt die Vermehrung in den Zellen des mononukleären Phagozytensystems. In der Regel werden die Parasiten jedoch durch Immunzellen, v. a. Makrophagen, abgetötet. Falls dies ausbleibt, kommt es zur ungehinderten

Vermehrung und es zeigen sich typische Symptome, wie Fieberschübe, deshalb auch teilweise als Dum-Dum-Fieber oder schwarzes Fieber bezeichnet, verbunden mit Hepatosplenomegalie, durch die Vermehrung in den betroffenen Organen, und starkem Gewichtsverlust [1, 4]. Bei fortschreitender Erkrankung kommt es aufgrund von Hypersplenismus und Knochenmarkssuppression zur Panzytopenie, was eine Anfälligkeit des Patienten für bakterielle Sekundärinfektionen begünstigt [1]. Laut WHO ist die viszerale Form v. a. in Indien und im östlichen Teil Afrikas endemisch. Man geht von einer jährlichen Inzidenz von 200 000 bis 400 000 weltweit aus, wobei über 90 % der neu auftretenden Fälle in Bangladesch, Brasilien, Ethiopien, Indien, Südsudan und Sudan vorkommen [4].

#### 1.1.4 Derzeitige Behandlung der Leishmaniose

Aktuell steht zur Behandlung der verschiedenen Formen der Leishmaniose lediglich eine geringe Bandbreite an Medikamenten zur Verfügung. Jedoch kann keines der aktuell eingesetzten Therapeutika als ideale Therapie angesehen werden. Zum einen zeigen die verabreichten Medikamente u. a. erhebliche Nebenwirkungen und zum anderen entstehen durch die Behandlung äußerst hohe Kosten. Da Leishmaniose hauptsächlich in Schwellen- und Entwicklungsländern auftritt, entstehen dadurch unter Umständen unüberwindbare finanzielle Hürden für die lokalen Gesundheitssysteme [9].

Ungeachtet ihrer variablen Effektivität (Therapieerfolg zwischen 35 und 95 %) und der schweren Nebenwirkungen gehören fünfwertige Antimonate, wie z. B. *N*-Methylglucamin-Antimonat, zu den Mitteln der ersten Wahl zur Behandlung der viszeralen und kutanen Leishmaniose. Aufgrund der schweren Kardio- und Nephrotoxizität sowie des Auftretens von Pankreatitiden müssen Patienten stationär behandelt werden, um eine ausreichende Überwachung zu gewährleisten. Die schweren Nebenwirkungen sind auch zu meist der Grund für einen vorzeitigen Therapieabbruch und die hohe Non-Compliance der Patienten, was z. B. zu einer Resistenzrate von über 65 % in Bihar (Indien) führte [9].

Ein weiteres Erstlinienmedikament ist Amphotericin B. Auch Amphotericin B verursacht schwere Nebenwirkungen. Die obligat intravenöse Applikation macht den Einsatz in ruralen Gebieten schwierig, außerdem zeigt sich oft während der Therapie hohes Fieber – begleitet von Myokarditis und Nephrotoxizität. Zwar konnte die Toxizität durch die

Entwicklung von liposomalem Amphotericin B reduziert werden und die Bioverfügbarkeit erhöht werden, jedoch muss diese Form gekühlt werden, da es bei hohen Temperaturen nicht stabil ist (ist bei 25 °C zu lagern). Des Weiteren ist eine Therapie mit liposomalem Amphotericin B deutlich kostenintensiver als jene mit konventionellem Amphotericin B [9].

Alternativ zu den zuvor genannten Medikamenten kann Paromomycin zur Behandlung eingesetzt werden. Paromomycin bietet den Vorteil, dass es relativ kostengünstig ist und bei kutaner Leishmaniose topisch appliziert werden kann, was mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist. Bei der viszeralen Form muss es allerdings parenteral verabreicht werden. Hier zeigt sich die Therapie als nephro-, oto- und zum Teil auch hepatotoxisch [9].

Ein weiteres Präparat zur Behandlung der Leishmaniose ist Miltefosin, welches ursprünglich zur Behandlung von Neoplasien entwickelt worden ist. Dieses Medikament kann als einziges oral appliziert werden. Jedoch zeigen sich auch hier diverse Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Beschwerden, Nephro- und Hepatotoxizität. Überdies darf es nicht während der Schwangerschaft eingenommen werden, da eine teratogene Wirkung nicht auszuschließen ist [9].

So zeigt sich, dass aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten ein dringender Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer antileishmanialer Medikamente besteht. Aus diesem Grund werden schon bestehende Präparate und Verbindungen auf ihre antileishmaniale Wirkung getestet. Um jedoch eine gezielte und möglichst nebenwirkungsarme Therapie entwickeln zu können, muss das komplexe Zusammenspiel zwischen Parasit und Wirtszelle untersucht werden.

## 1.2 Autophagie

### 1.2.1 Allgemeines zur Autophagie

Der Begriff Autophagie, auch als Autophagozytose bezeichnet, setzt sich aus den altgriechischen Wörtern *αὐτός* (*autós*, altgriechisch: selbst), *φαγεῖν* (*phagein*, altgriechisch: fressen) und *κύτος* (*cýtos*, altgriechisch: Zelle) zusammen und bedeutet, dass eine Zelle sich selbst bzw. eigene Bestandteile verdaut [10]. Dieser Begriff wurde vom belgischen

Biochemiker und späteren Nobelpreisträger Christian de Duve im Jahr 1963 geprägt und basierte auf seinen Untersuchungen über Lysosomen. Für seine Forschungen über Lysosomen erhielt de Duve 1974 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin [11].

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen 3 Arten von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie [11, 12]. Bei der Makroautophagie wird ein intrazelluläres Substrat durch eine aus einer Doppelmembran gebildeten Vakuole eingeschlossen. Diese doppelmembranigen Vakuolen werden Autophagosomen genannt. Sofern sich eine Doppelmembran noch nicht zu einem Autophagosom zusammengeschlossen hat, wird diese Struktur als Phagophore bezeichnet (Abbildung 3). Anschließend fusioniert die äußere Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom, woraus ein Autolysosom entsteht. Morphologisch kann ein Autolysosom von einem Autophagosom differenziert werden, da das Autolysosom keine Doppel-, sondern nur eine einfache Membran besitzt. Durch den sauren pH und die hydrolysierenden Enzyme des Lysosoms, wie z. B. Proteasen, Nukleasen und Lipasen, werden die innere Membran des früheren Autophagosoms und dessen Inhalt degradiert (Abbildung 3). Der degradierte Inhalt wird danach wieder ins Zytoplasma abgegeben. Durch diesen Prozess können überflüssige oder beschädigte Organellen recycelt werden. Aber auch bei Nahrungsmangel oder zellulärem Stress kann durch Autophagie die Homöostase der Zelle erhalten werden, um deren Überleben zu sichern [11, 13, 14].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Makroautophagie in *L. m.*-infizierten Knochenmarksmakrophagen (englisch: *bone marrow-derived macrophages*, BMDM) untersucht, weshalb auch nur auf diese Art der Autophagie näher eingegangen werden wird und Makroautophagie im Folgenden der Einfachheit halber als Autophagie bezeichnet wird.

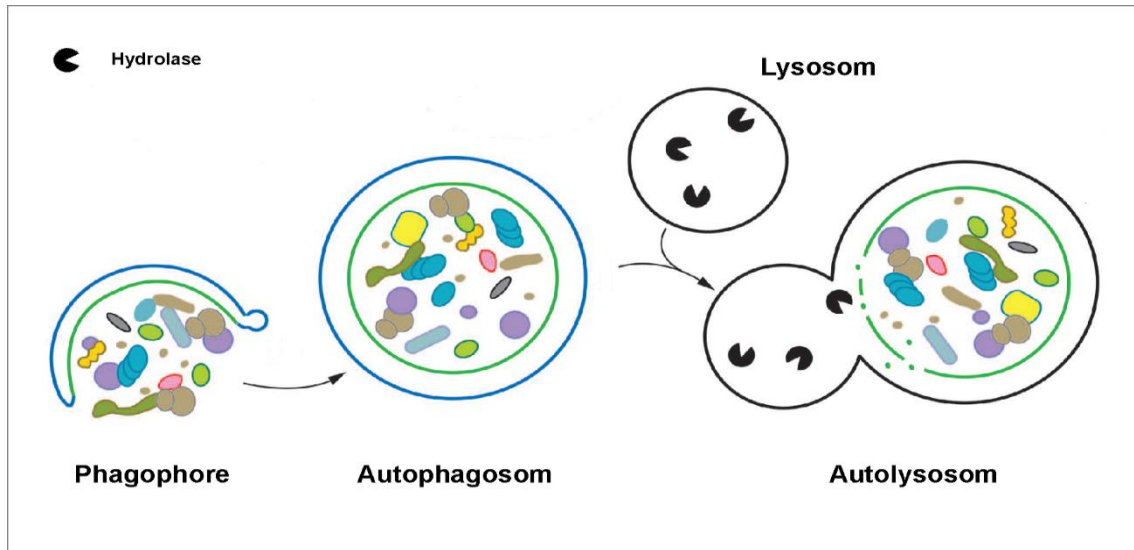


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Makroautophagie (Autophagie). Nach Induktion der Autophagie bildet sich eine Phagophore, welche intrazelluläre Substrate einhüllt. Durch einen vollständigen Schluss der Phagophore wurde ein doppelmembraniges Autophagosom gebildet. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, wodurch die äußere Membran des Autophagosoms mit der Membran des Lysosoms verschmilzt, und ein Autolysosom entsteht. Durch die Hydrolasen im Lysosom werden die Substrate im Autolysosom sowie die ehemalige innere Membran des Autophagosoms degradiert.

Abbildung wurde aus [15] entnommen und anschließend modifiziert.

### 1.2.2 Autophagie in Infektionskrankheiten

Neben den zuvor benannten Funktionen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Autophagie eine essenzielle Rolle bei Infektionen und Immunabwehr spielt. So können ins Zytoplasma eindringende Mikroben durch den zuvor beschriebenen Prozess verdaut und somit abgewehrt werden. Dies ist eine der ersten, wenn nicht sogar die ursprüngliche Funktion der Autophagie, welche bis heute erhalten geblieben ist. Man geht davon aus, dass diese ursprüngliche Rolle der Autophagie heute in Form der sogenannten Mitophagie, d. h. der autophage Verdau von Mitochondrien, konserviert wurde, um dadurch das Überleben der Zelle zu sichern. Denn Mitochondrien haben einen bakteriellen Ursprung. Diese haben sich aus einem *Rickettsia*-ähnlichen  $\alpha$ -Prokaryotium entwickelt [14].

Viele verschiedene zelluläre Aspekte sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems werden durch Autophagie reguliert. Im adaptiven Immunsystem werden u. a. T-Zellen und B-Zellen beeinflusst. So wird z. B. die T-Zell-Polarisation durch autophagiedefiziente Makrophagen verstärkt [16]. Auf der anderen Seite können Zellen des angeborenen Immunsystems eindringende Mikroorganismen direkt durch autophage

Prozesse eliminieren. Der direkte Verdau von eindringenden Mikroben wird auch als Xenophagie bezeichnet [16]. Außerdem wirkt Autophagie bei der Präsentation von endogen exprimierten Antigenen durch den Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II-Komplex mit [17].

Manche Erreger haben jedoch Strategien entwickelt, um entweder der autophagen Degradation zu entfliehen oder sogar die Autophagie zum eigenen Vorteil auszunutzen. So bewirken die Proteine Nef und Env des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) eine Hemmung der Autophagie in verschiedenen Zelltypen. Durch Nef wird die Autophagie-induktion in DCs inhibiert, wodurch auch deren Reifung und die Präsentation von HIV-Antigenen beeinträchtigt werden. Das Env Protein blockiert eine Reifung der Autophagosomen in Makrophagen, wodurch das Virus vor autophager Degradation geschützt wird [17]. Auch das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, kann in den Autophagosomen von Makrophagen überleben, indem es die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen inhibiert. Es konnte jedoch weiter gezeigt werden, dass durch eine Reinduktion der Autophagie ein Rückgang der Infektionsrate erreicht wurde [18]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das Coxsackie-Virus die Autophagie der Wirtszelle sogar für die eigene Replikation ausnutzt. Durch bisher unbekannte Mechanismen leitet das Coxsackie-Virus in infizierten Zellen Autophagie ein und benutzt die autophagosomalen Membranen, um die eigene Replikation zu verstärken. Möglicherweise benutzt das Coxsackie-Virus sogar die autophage Maschinerie, um aus der Wirtszelle auszubrechen [19].

Es zeigt sich, dass Autophagie eine protektive und essenzielle Funktion für das Immunsystem darstellt. Jedoch haben im Laufe der Evolution manche Mikroorganismen erreicht, sich diesem Prozess zu entziehen bzw. diesen auszunutzen. Dies bietet aber auch eine Chance für neue therapeutische Ansätze. So sollten die Interaktionen zwischen Pathogen und Wirtszelle zukünftig genauer untersucht werden, damit mit diesem Wissen neue therapeutische Strategien entwickelt werden können.

### 1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wie beschrieben, stellt die Behandlung der Leishmaniose ein erhebliches sozioökonomisches Problem dar. Dies hängt u. a. auch mit den aktuell vorhandenen Therapiemöglichkeiten zusammen, da diese u. a. sehr teuer sind oder teilweise nicht akzeptable Nebenwirkungen aufweisen. Aus diesem Grund haben sich verschiedene Organisationen der Entwicklung neuer Therapeutika verschrieben. So ist eines der Ziele der WHO zur Bekämpfung der NTDs die Entwicklung von Medikamenten zur Krankheitsprävention [3]. Aber auch private Organisationen haben dieses Problem erkannt. So hat z. B. die Bill & Melinda Gates Foundation bisher über 1 Milliarde US-Dollar in Form von Fördergeldern zur Bekämpfung der NTDs gespendet [20]. Außerdem gibt es auch vereinzelt Bemühungen der Pharmaindustrie. Diese fokussiert ihre Anstrengungen v. a. auf die Testung bekannter Substanzen gegen verschiedene NTDs [21]. Das Hauptinteresse an der Erforschung von möglichen neuen Therapieoptionen gegen NTDs bleibt jedoch v. a. bei universitären Einrichtungen. So wurden im Teilprojekt B3 (Projektteil Schurig) des Sonderforschungsbereichs (SFB) 630 „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“ diverse Substanzen auf ihre antileishmaniale Wirkung mittels eines neu entwickelten Amastigoten-Assays getestet [22]. Die Bemühungen des Teilprojekts B3 (Projektteil Schurig) des SFB 630 beschränkten sich jedoch nicht nur auf die Testung von Substanzen, sondern es wurde unter wissenschaftlicher Leitung von Frau Dr. Schurig die autophagiespezifischen Wechselwirkungen zwischen *L. m.* Parasit und Wirtsmakrophage untersucht, um hierdurch neue Erkenntnisse zu gewinnen, welche in Zukunft zur Herstellung neuer Therapeutika genutzt werden könnten [7].

In der vorliegenden Arbeit wurde nun in einem ersten Schritt die Interaktion zwischen den *L. m.* Parasiten und den Wirtsmakrophagen untersucht. Hier lag das Hauptaugenmerk auf der Induktion von Autophagie in den infizierten BMDM. Um die Autophagie in den Makrophagen messen und um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurde ein semiquantitativer Score neu entwickelt. Da die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bis heute den Goldstandard in der Beurteilung autophager Aktivität darstellt [11], stützte sich dieser Score auf morphologische Charakteristika der Autophagie. Mithilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen sollte dann die Auswirkungen der Autophagie auf die Infektionsrate der *L. m.*-infizierten BMDM untersucht werden. In einem



zweiten Schritt wurde nachfolgend mittels biomolekularer Methoden überprüft, ob die Ergebnisse aus dem entwickelten Score verifiziert werden können. Hierfür eignete sich die Untersuchung von autophagierelevanten Proteinen mithilfe von Western-Blot-Analysen. Geeignete Kandidaten waren die Proteine Autophagy-related 5 (ATG5), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B = LC3B) und Ubiquitin (UB) [12]. Zudem sollten die Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszellen morphologisch durch Elektronentomogramme untersucht werden. In einem weiteren Schritt wurde nun durch Affymetrix-Microarray-Analysen untersucht, ob es noch weitere Gene, bzw. Proteine gibt, welche bei der Autophagie in *L. m.*-infizierten BMDM eine Rolle spielen könnten. Im besten Fall könnten mittels dieser Analysen Proteine identifiziert werden, die spezifisch für die Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM sind. Der Einfluss derartiger Proteine auf die Parasit-Wirt-Interaktion sollte dann durch die Herunterregulation des entsprechenden Proteins mittels kleiner eingreifender RNA (englisch: *small interfering RNA*, siRNA) untersucht werden.

Somit können möglicherweise neue Ziele für eine gezielte antileishmaniale Therapie gefunden werden, was eine kosteneffiziente und nebenwirkungsarme Behandlung ermöglichen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Life Technologies
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Serva
Bafilomycin A1 (Baf A1)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth
Cacodylatsalz	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Entionisiertes Wasser (lateinisch: <i>aqua destillata</i> , <i>aqua dest.</i> )	Fresenius Kabi
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Scientific
Fötales Kälberserum (englisch: <i>fetal calf serum</i> , FCS)	PAA
Gentamycin	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Sigma-Aldrich
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies
L-Glutamin	Biochrom
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Carl Roth
Nichtessenzielle Aminosäurelösung	Life Technologies
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich
Penicillin G	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Life Technologies
Pferdeserum	Life Technologies
Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Life Technologies
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Propylenoxid	Sigma-Aldrich
Rapamycin	Calbiochem
RIPA-Puffer	Cell Signaling
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Rotiphorese gel 30	Carl Roth
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)-Medium	Life Technologies

Salzsäure	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth
Trichloressigsäure (englisch: <i>trichloroacetic acid</i> , TCA)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth
TRIS Base	Carl Roth
Trypanblau	Life Technologies
Tween 20	Sigma-Aldrich
Uranylacetat	Sigma-Aldrich

Tabelle 1: Liste der verwendeten allgemeinen Chemikalien und Reagenzien.

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Name	Hersteller
3 mm Chr Blotting Papier	Whatman
96-Loch-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One
Amaxa Mouse Macrophage Nucleofector Transfection Kit	Lonza
Bechergläser	Schott
Chirurgische Einmalskalpelle	B. Braun
Diff-Quik Kit	Medion Diagnostics
Einbettungsformen für TEM	Baltic Präparation
Epoxy-Embedding Kit	Sigma-Aldrich
Filterpapier für Cytospin3	Thermo Scientific
GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Microarrays	Affymetrix
Glasflaschen	Schott
Größenmarker Page ruler prestained protein ladder	Thermo Scientific
Halt Proteaseinhibitor-Cocktail	Thermo Scientific
Immobilon Western HRP Substrat	Merck Millipore
IVT-Express Kit	Affymetrix
Magnetstäbchen	Heidolph Instruments
Neubauer Zählkammer (Kammertiefe: 0,02 mm)	Glaswarenfabrik
Neubauer Zählkammer (Kammertiefe: 0,1 mm)	Karl Hecht
Nitrocellulosemembran	Whatman
Objektträger	Thermo Scientific
Petrischalen (100/20)	Greiner Bio-One
QIAshredder Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
Sterile Einmalpipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One
Sterile Filter (0,2 µm)	Sarstedt
Sterile Injektionskanülen (23 G; 27 ¾ G)	B. Braun
Sterile Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Greiner Bio-One
Sterile Spritzen (1 ml; 25 ml)	B. Braun
Suspensionsplatten (hydrophob, 100/20; 60/15; 35/10)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One
Zellschaber	Greiner Bio-One

Zellsieb (70 µm)	BD
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits.

### 2.1.3 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
8-Kanal-Pipette	Eppendorf
Bioanalyzer 2100	Agilent
Brutschrank INC 153	Memmert
Durchlichtmikroskop Axiolab	Carl Zeiss
Durchlichtmikroskop Eclipse 50i	Nikon
GeneChip Scanner 3000 7G	Affymetrix
Heizblock AccuBlock	Labnet
ImageQuant LAS 4000	General Electrics
Inverses Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph Instruments
Mikropipetten (10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Eppendorf
Western Blot System Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories
Nucleofector 2b Device	Lonza
pH-Meter inoLab	WTW
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific
Sterilbank safe 2020	Thermo Scientific
Transmissionselektronenmikroskop EM900	Carl Zeiss
Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100	JEOL
Waage	Kern & Sohn
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf
Zentrifuge Shandon Cytospin3	Thermo Scientific

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte.

## 2.1.4 Antikörper und siRNAs

### Primärantikörper:

Zielprotein	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin (ACTB)	Cell Signaling	1 : 1 000
ATG5	Cell Signaling	1 : 1 000
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)	Cell Signaling	1 : 1 000
Cathepsin E (CTSE)	Santa Cruz Biotechnology	1 : 100
LC3B	Cell Signaling	1 : 1 000
UB	Cell Signaling	1 : 1 000

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper.

### Sekundärantikörper:

Zielprotein	Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
ACTB	Meerrettichperoxidase (englisch: <i>horseradish peroxidase</i> , HRP)-konjugiert anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000
ATG5	HRP-konjugiert anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000
BNIP3	HRP-konjugiert anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000
CTSE	HRP-konjugiert anti-Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology	1 : 2 000
LC3B	HRP-konjugiert anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000
UB	HRP-konjugiert anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000

Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

### siRNAs:

Name	Hersteller
<i>Atg5</i> siRNA	Santa Cruz Biotechnology
<i>Bnip3</i> siRNA	Santa Cruz Biotechnology
<i>Ctse</i> siRNA	Santa Cruz Biotechnology
Negativkontrolle	Santa Cruz Biotechnology
<i>Ub</i> siRNA	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 6: Liste der verwendeten siRNAs.

## 2.1.5 Medien und Puffer

### DMEM für L929-Zellen:

- 500,0 ml DMEM
- 2,5 ml 2-ME (Stammlösung: 10 mM)
- 5,0 ml Nichtessenzielle Aminosäurelösung
- 25,0 ml Hitzeinaktiviertes FCS
- 5,0 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
- 5,0 ml HEPES
- 10,0 ml L-Glutamin

### Konditioniertes DMEM:

- 500,0 ml DMEM
- 2,5 ml 2-ME (Stammlösung: 10 mM)
- 5,0 ml Nichtessenzielle Aminosäurelösung
- 50,0 ml Hitzeinaktiviertes FCS
- 25,0 ml Pferdeserum
- 0,5 ml HEPES
- 10,0 ml L-Glutamin
- 75,0 ml L929 Überstand

### Komplettes RPMI-Medium:

- 500,0 ml RPMI-Medium
- 50,0 ml Hitzeinaktiviertes FCS
- 5,0 ml L-Glutamin
- 5,0 ml HEPES
- 2,5 ml 2-ME (Stammlösung: 10 mM)
- 1,0 ml Penicillin
- 2,5 ml Gentamicin

### Cacodylatpuffer (0,2 M):

- 0,856 g Cacodylatsalz
- ad 20,0 ml Aqua dest.; mit 1 M Salzsäure auf 0,2 M einstellen

### 2,5 % gepuffertes Glutaraldehyd:

- 9,0 ml 0,2 M Cacodylatpuffer
- 1,0 ml 25 % Glutaraldehyd

### 2 % gepuffertes Osmiumtetroxid:

- 1,0 ml 4 % Osmiumtetroxid
- 0,5 ml Aqua dest.
- 0,5 ml 0,2 M Cacodylatpuffer

Epon (Epoxy-Embedding Kit):

- 30,0 ml Epoxy Embedding Medium
- 24,0 ml Dodecylbernsteinsäureanhydrid
- 21,0 ml Methyl-5-norbornen-2,3-dicarboxylanhydride
- 1,5 ml 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol

10x TRIS-gepufferter Salzlösung/Tween 20 (englisch: tris buffered saline/tween20, TBS-T) Puffer:

- 24,23 g TRIS Base
- 80,06 g Natriumchlorid
- ad 1,0 l Aqua dest.; pH mit 1 M Salzsäure auf 7,6 einstellen
- 1,0 ml Tween 20

Western-Blot-Transferpuffer:

- 15,14 g TRIS Base
- 71,31 g Glycin
- 1,0 l Methanol
- ad 5,0 l Aqua dest.

10x SDS-Laufpuffer:

- 151,4 g TRIS Base
- 713,2 g Glycin
- 50,0 g SDS
- ad 5,0 l Aqua dest.

5x SDS-Probenpuffer:

- 2,5 ml TRIS Base, pH 6,8
- 10,0 ml Glycerin
- 1,0 g SDS
- 5,0 ml DTT (5 M)
- 1,5 ml Aqua dest.
- 1,0 ml 1% Bromphenolblau

Trenngel (12 %):

- 3,4 ml Aqua dest.
- 2,5 ml 1,5 M TRIS Base (pH 8,8)
- 0,2 ml 10 % SDS
- 4,0 ml Rotiphorese gel 30
- 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,02 ml Tetramethylethylendiamin

#### Sammelgel (4 %):

- 3,0 ml Aqua dest.
- 1,25 ml 0,5 M TRIS Base (pH 6,8)
- 0,2 ml 10 % SDS
- 0,65 ml Rotiphorese gel 30
- 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,02 ml Tetramethylethyldiamin

#### Ponceau S:

- 1,0 g 0,5 % Ponceau S
- 30,0 ml 3 % TCA
- ad 200,0 ml Aqua dest.

#### RIPA-Lysepuffer:

- 150,0 µl RIPA-Puffer
- 1,5 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail
- 1,5 µl 0,5 M EDTA

#### Lämmli-Puffer:

- 4,4 ml 0,5 M TRIS (pH 6,8)
- 4,4 ml Glycerol
- 2,2 ml 20 % SDS
- 0,5 ml 1 % Bromphenolblau
- 34,5 ml PBS
- 2,3 ml 2-ME

### 2.1.6 Verwendete Leishmanien-Stämme, Zelllinien und Versuchstiere

Zur Infektion der BMDM wurde der virulente *L. m.* Stamm (MHOM/IL/81/FE/BNI) verwendet. Ebendieser wurde ursprünglich von einem israelischen Patienten isoliert, welcher an kutaner Leishmaniose erkrankt war [23].

Der L929-Überstand wurde mit L929-Fibroblasten gewonnen, welche bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als murine Bindegewebsfibroblasten L929 katalogisiert sind (DSMZ-Nummer: ACC 2).

Für die Generierung von BMDM wurden Stammzellen (SZ) aus den Ober- und Unterschenkelknochen 7 bis 10 Wochen alter weiblicher BALB/c-Mäuse gewonnen. Die BALB/c-Mäuse wurden von Charles River Laboratories erworben.



## 2.1.7 Software

Name	Anbieter
ETomo/IMOD	Boulder Laboratory
Excel 2013	Microsoft
ImageJ 1.49g	NIH
IrfanView 4.33	Irfan Skiljan
NIS Elements 3.22.11	Nikon
SerialEM	Boulder Laboratory
SPSS 20.0.0	IBM
Word 2013	Microsoft

Tabelle 7: Liste der verwendeten Programme.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *L. m.* Promastigoten

Der zuvor beschriebene virulente *L. m.* Stamm (MHOM/IL/81/FE/BNI) wurde zur Infektion der BMDM verwendet. Zur Passage dieses *L. m.* Stamms wurden  $5 \times 10^6$  *L. m.* Promastigoten subkutan in die Schwanzwurzel einer BALB/c-Maus gespritzt. Dieser Vorgang wurde bei der Regierung von Unterfranken ordnungsgemäß angezeigt (Genehmigungsnummer: 55.2-2531.01-26/12).

Nach ca. 8 Wochen wurde die entstandene Hautläsion entnommen und durch ein Zellsieb getrieben. Nach dreimaligem Waschen in PBS (1. Zentrifugation:  $120 \times g$  für 10 min bei 21 °C; 2. Zentrifugation:  $450 \times g$  für 10 min bei 21 °C; 3. Zentrifugation:  $3.000 \times g$  für 10 min bei 21 °C) wurde das Zellpellet in 8 ml RPMI-Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 100 µl auf eine 96-Loch-Blutagarplatte verteilt (Anfangspassage) und bei 27 °C und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>)-Gehalt von 5 % inkubiert. Nach einer Woche wurden die Promastigoten 1 : 5 auf eine neue 96-Loch-Blutagarplatte mit frischem RPMI-Medium passagiert und bei 27 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Damit die Virulenz der Promastigoten auch nach mehrwöchiger Inkubation im Brutschrank gewährleistet werden konnte, wurden diese alle 8 Wochen durch Infektion einer neuen BALB/c-Maus passagiert.

#### 2.2.1.2 Ernte und Bestimmung der Zellzahl von *L. m.* Promastigoten

Vier Tage nach Passage befinden sich die Promastigoten in der stationären Phase. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie von der Blutagarplatte abgeerntet und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Volumen des Zentrifugenröhrchens wurde mit PBS auf 20 ml aufgefüllt. Nach einmaligem Waschen mit 20 ml PBS (Zentrifugation:  $3.000 \times g$  für 10 min bei Raumtemperatur [RT]) wurde das Zellpellet in 10 ml komplettem RPMI-Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,02 mm) in einer 1 : 20 Verdünnung in PBS durch Auszählen von 4 Großquadraten. Anschließend wurde die Zellzahl auf  $3 \times 10^6$  Promastigoten pro ml eingestellt.

#### 2.2.1.3 Kultivierung und Gewinnung des Überstands von L929-Zellen

Die murine Bindegewebsfibroblastenzelllinie L929 wurde von der DSMZ erworben. Aus deren Überstand wurde der für die Ausdifferenzierung von SZ zu BMDM essenzielle Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (englisch: *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) gewonnen. Dazu wurde eine in flüssigem Stickstoff gelagerte Subkultur im 37 °C warmen Wasserbad angetaut, mit 1 ml angewärmtem DMEM für L929-Zellen versetzt und vollends aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml warmes DMEM überführt und bei  $70 \times g$  für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 30 ml DMEM resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Zellen der 1. Passage wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Zellen zu ca. 80 % konfluent, sodass die Kultur gesplittet werden konnte. Hierfür wurden die L929-Fibroblasten mit einem Zellschaber abgeschabt und in DMEM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1 : 10 passagiert, dazu wurde zu 3 ml der Zellsuspension 27 ml neues DMEM gegeben. Die Passagen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 4 Tagen waren die Zellen zu ca. 90 % konfluent und konnten mithilfe eines Zellschabers aus den Zellkulturflaschen abgeerntet und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Nach Zentrifugation mit  $300 \times g$  für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in 2 ml DMEM resuspendiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte in einer 1 : 10 Verdünnung in Trypanblau mittels einer Neubauer-

Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm). Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml mit DMEM eingestellt. Jeweils 30 ml der Suspension wurden in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bzw. 7,5 ml in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 10 Tage.

Nach Inkubation von 10 Tagen wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen abgenommen und mit einem Filter (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert. Der Überstand wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.1.4 Generierung von BMDM aus SZ

Die Generierung von BMDM aus murinen SZ erfolgte nach einem modifizierten Protokoll, welches ursprünglich von Schleicher und Bogdan publiziert wurde [24]. Hierfür wurde eine weibliche BALB/c-Maus im Alter von 7 bis 10 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden beide Ober- und Unterschenkelknochen aus dem Becken herauspräpariert. Nach sorgfältiger Entfernung von Muskeln, Sehnen und Bindegewebe wurden die Knochen in eine Petrischale mit sterilem PBS gelegt und anschließend in 70 % Ethanol desinfiziert. Unter der Sterilbank erfolgte die Eröffnung der Röhrenknochen, indem die knochenmarksarmen Enden mit einer Präparationsschere entfernt wurden. Das Knochenmark wurde mit einer 23 G Kanüle auf einer 1 ml Spritze mit kaltem komplettem RPMI-Medium ausgespült und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach einem Zentrifugationsschritt mit  $300 \times g$  für 10 min bei 4 °C wurden die SZ mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und nochmals bei  $300 \times g$  für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem konditioniertem DMEM aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 10 in Trypanblau mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm). Die Zellzahl wurde mit konditioniertem DMEM auf  $1,2 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Damit die SZ sich zu BMDM ausdifferenzieren konnten, wurden jeweils 8 ml der Zellsuspension auf eine Suspensionsplatte (100/20) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 6 Tage inkubiert.

#### 2.2.1.5 Infektion von BMDM mit *L. m.* Promastigoten

Nach 6 Tagen Inkubation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen wurden die BMDM von den Suspensionsplatten abgeerntet. Die verwendeten Suspensionsplatten bieten den Vorteil, dass sich die BMDM zwar am Boden anheften, wodurch das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt werden kann, aber durch die spezielle Beschichtung der Suspensionsplatten können die BMDM trotzdem nach 10-minütiger Inkubation auf Eis mit einem Zellschaber von den Suspensionsplatten abgeerntet werden. Um die BMDM abzurnten, wurde das alte DMEM von den Suspensionsplatten vorsichtig abgesaugt und 10 ml kaltes PBS hinzugegeben. Anschließend wurden die Platten für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die BMDM vorsichtig mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Zellen mit 20 ml kaltem RPMI-Medium gewaschen und nochmals bei  $300 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10 ml kaltem komplettem RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 20 in Trypanblau mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm). Die Zellzahl wurde mit komplettem RPMI-Medium auf  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Dann wurden jeweils 46 ml in eine 100/20 Suspensionsplatte, 16,6 ml in eine 60/15 Suspensionsplatte, bzw. 5,7 ml der Zellsuspension in eine 35/10 Suspensionsplatte überführt und bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  für 4 h inkubiert, damit sich die BMDM an den Boden der Suspensionsplatten anheften konnten, was die spätere Infektion erleichtern sollte.

In der Zwischenzeit wurden die *L. m.* Promastigoten, wie zuvor erörtert, abgeerntet und auf eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^6$  Promastigoten pro ml eingestellt. Zur Infektion der BMDM wurde das Medium vorsichtig von den Suspensionsplatten abgesaugt und durch das gleiche Volumen an Promastigotensuspension ersetzt. Bei Kontrollzellen, welche nicht infiziert wurden, wurde das Medium durch die gleiche Menge komplettes RPMI-Medium ersetzt. Anschließend wurden infizierte und uninfizierte BMDM für die gleiche Zeit bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### 2.2.1.6 Autophagieinduktion in nicht-infizierten BMDM

BMDM wurden, wie oben beschrieben, generiert, inkubiert und von Zellsuspensionsplatten abgeerntet. Nach dem zuvor beschriebenen 4-stündigen Inkubationsschritt wurden, damit sich die BMDM an den Boden der Suspensionsplatten anheften, die Zellen zur Autophagieinduktion entweder in HBSS für 1 h oder in komplettem RPMI-Medium mit 500 nM Rapamycin für 1 h inkubiert. Sowohl die Inkubation in HBSS als auch die Behandlung mit Rapamycin sind bekannte und oft verwendete Methoden, um Autophagie in Zellen zu induzieren [12].

#### 2.2.2 Lichtmikroskopie

##### 2.2.2.1 Bestimmung der Infektionsrate in *L. m.*-infizierten BMDM

Nachdem BMDM, wie oben beschrieben mit *L. m.* Promastigoten infiziert wurden, wurden diese in einem Zeitraum von 0,5 h bis 48 h inkubiert. Die Infektionsrate wurde nach 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 10 h; 24 h; 27 h; 30 h und 48 h mittels Lichtmikroskopie bestimmt. Im Einzelnen wurden die *L. m.*-infizierten BMDM nach besagter Zeit abgeerntet, indem die Suspensionsplatte für 10 min auf Eis gestellt wurde und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt wurden. Die Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in einen Cytospin-Trichter pipettiert und mittels einer Shandon Cytospin3 bei  $1\,500\text{ min}^{-1}$  für 5 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit dem Diff-Quik Kit nach Anleitung des Herstellers fixiert und gefärbt.

Die fixierten Objektträger wurden im Anschluss mit einem Eclipse 50i Lichtmikroskop untersucht. Mit der NIS Elements Software konnten digitale Bilder der *L. m.*-infizierten BMDM erstellt werden. Pro Zeitpunkt wurden 50 BMDM untersucht und die Anzahl der intrazellulären Leishmanien gezählt. Die Infektionsrate wurde anhand der durchschnittlichen Anzahl intrazellulärer Parasiten pro Zelle bestimmt. Signifikanzen zwischen den einzelnen Ansätzen wurden durch zweiseitige t-Tests mittels SPSS Version 20.0.0 bestimmt. Die Normalverteilung der Stichproben wurde durch einem Kolmogorow-Smirnow-Test in SPSS Version 20.0.0 bestätigt. Ein Unterschied in den Infektionsraten galt ab einem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant.

#### 2.2.2.2 Bestimmung des Nukleus-Kinetoplast-Abstands in *L. m.*-infizierten BMDM

Wie bei der Bestimmung der Infektionsrate wurden BMDM mit *L. m.* Promastigoten infiziert und zu den beschriebenen Zeitpunkten abgeerntet. Anschließend wurden die Proben, wie oben beschrieben durch Zentrifugation auf Objektträgern fixiert und mit dem Diff-Quik Kit nach Anleitung des Herstellers fixiert sowie gefärbt. Zusätzlich wurden auch Promastigoten ohne BMDM (= Zeitpunkt 0) auf Objektträger fixiert und mit dem Diff-Quik Kit fixiert und gefärbt.

Analog zur Bestimmung der Infektionsrate wurden die fixierten Objektträger mit einem Eclipse 50i Lichtmikroskop untersucht und mit der NIS Elements Software konnten digitale Bilder der *L. m.*-infizierten BMDM gemacht werden. Für jeden Zeitpunkt wurden 50 intrazelluläre Parasiten untersucht, mit Ausnahme des Zeitpunkts 0, hier wurden 50 Promastigoten analysiert, da es sich um eine reine Leishmanienprobe ohne BMDM handelt. Der Nukleus-Kinetoplast-Abstand wurde anhand des durchschnittlichen Abstands zwischen diesen beiden leishmanialen Organellen bestimmt. Signifikanzen zwischen den einzelnen Ansätzen wurden durch zweiseitige t-Tests mittels SPSS Version 20.0.0 bestimmt. Die Normalverteilung der Stichproben wurde durch einem Kolmogorow-Smirnow-Test in SPSS Version 20.0.0 bestätigt. Ein Unterschied im Nukleus-Kinetoplast-Abstand galt ab einem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant.

### 2.2.3 TEM

#### 2.2.3.1 Einbettung der Proben für TEM

Für ultrastrukturelle Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurden *L. m.*-infizierte BMDM und uninfizierte Kontrollen sowie BMDM, bei denen durch HBSS oder Rapamycin Autophagie induziert wurde, eingebettet. Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, behandelt. *L. m.*-infizierte BMDM und uninfizierte Kontroll-BMDM wurden in einem Zeitraum von 0,5 h bis 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. BMDM, bei welchen Autophagie induziert wurde (durch HBSS oder Rapamycin), wurden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Inkubation wurden die Suspensionsplatten für 10 min auf Eis gestellt und anschließend mit einem Zellschaber abgeerntet und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 600 × g für 5 min bei RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml 2,5 % gepuffertem

Glutaraldehyd resuspendiert und über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Proben fünfmal mit jeweils 0,5 ml 50 mM Cacodylatpuffer für 3 min bei RT gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Proben bei 600 × g für 5 min bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Ansätze für 120 min bei RT in je 0,2 ml 2 % gepuffertem Osmiumtetroxid fixiert. Es folgten 5 Waschschriffe mit je 0,5 ml Aqua dest. für je 3 min bei RT. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Proben bei 1 600 × g für 5 min bei RT zentrifugiert. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C in je 0,1 ml 0,5 % Uranylacetat kontrastiert. Die Proben wurden nach der Kontrastierung wieder fünfmal mit je 0,5 ml Aqua dest. für je 3 min bei RT gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Proben bei 1 600 × g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Die genaue Vorgehensweise ist der untenstehenden Tabelle aufgeführt:

Ausführung	Substanz	Volumen	Inkubation	Zentrifugation
1x Dehydrierung	50 % Ethanol	0,5 ml	30 min; 4 °C	1 600 × g; 5 min; 4 °C
1x Dehydrierung	70 % Ethanol	0,5 ml	30 min; 4 °C	1 600 × g; 5 min; 4 °C
1x Dehydrierung	90 % Ethanol	0,5 ml	30 min; 4 °C	1 600 × g; 5 min; 4 °C
1x Dehydrierung	96 % Ethanol	0,5 ml	30 min; 4 °C	1 600 × g; 5 min; 4 °C
2x Dehydrierung	100 % Ethanol	0,5 ml	30 min; 4 °C	1 600 × g; 5 min; 4 °C
1x Dehydrierung	100 % Ethanol	0,5 ml	30 min; RT	1 600 × g; 5 min; RT
2x Dehydrierung	Propylenoxid	0,5 ml	30 min; RT	1 600 × g; 5 min; RT

Tabelle 8: Dehydrierungsschritte von Zellen zur Einbettung in Epon.

Anschließend wurden die Zellen in Einbettungsformen überführt und in einem Gemisch aus 50 % Epon und 50 % Propylenoxid über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten

Tag wurde dieses Gemisch vorsichtig abgenommen und durch reines Epon ersetzt. Die Proben wurden anschließend erneut über Nacht bei RT inkubiert. Im Weiteren erfolgte die Polymerisation des Epons bei 60 °C für 3 Tage.

Nach dieser Zeit konnten die ausgehärteten Eponstifte mit dem Zellpellet in der Spitze der Einbettungsformen aus den Formen herausgeschnitten werden. Danach wurden diese Stifte von den Mitarbeitern der „Imaging Core Facility“ der Universität Würzburg mit einem Mikrotom in 100 nm dicke Schnitte geschnitten und mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert.

#### 2.2.3.2 Erstellung eines semiquantitativen Scores zur Autophagiemessung

Zu den morphologischen Charakteristika der Autophagie zählen eine erhöhte Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie das intrazelluläre Auftreten von myelinähnlichen Strukturen (englisch: *myelin-like structures*, MLS) und Autophagosomen [12, 18, 25-29]. Sowohl die Vakuolisierung des Zytoplasmas als auch das Auftreten von MLS können hervorragend in einem Transmissionselektronenmikroskop beobachtet werden, weshalb anhand dieser beiden Parameter ein semiquantitativer Score (im Nachfolgenden als totaler Autophagiescore bezeichnet) entwickelt wurde, um den Grad der Autophagieinduktion in der jeweiligen Probe zu messen und mit anderen Proben vergleichen zu können. Anhand der Vakuolisierung des Zytoplasmas wurden Punkte zwischen 0 und 3 entsprechend des Grads der Vakuolisierung vergeben. Der Score 0 wurde vergeben, wenn 0 % – 25 % der Fläche des Zytoplasmas vakuolisiert waren. Der Score 1 wurde bei 26 % – 50 %, Score 2 bei 51 % – 75 % und Score 3 entsprechend bei 76 % – 100 % Vakuolisierung des Zytoplasmas. Für das intrazelluläre Auftreten von MLS wurde ein zusätzlicher Scorepunkt vergeben, sodass der maximal erreichbare totale Autophagiescore bei 4 lag.

Um die Autophagieinduktion in infizierten und uninfizierten Makrophagen sowie BMDM, bei denen Autophagie mit HBSS oder Rapamycin induziert wurde, mittels totalem Autophagiescore vergleichen zu können, wurden Übersichtsbilder bei 1 600 × Vergrößerung mit einem Zeiss EM900 Transmissionselektronenmikroskop gemacht. Von jedem Präparat wurden 50 individuelle BMDM durch den zuvor beschriebenen totalen Autophagiescore bewertet. Die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Proben



wurde durch einen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit SPSS Version 20.0.0 geprüft. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

### 2.2.3.3 Elektronentomografie

Um die Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle besser untersuchen zu können, wurden die TEM-Präparate (s. o.) von *L. m.*-infizierten BMDM nochmals von den Mitarbeitern der „Imaging Core Facility“ der Universität Würzburg mit einem Mikrotom in 250 nm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend mit 2,5 % Uranylacetat in Ethanol für 15 min und dann mit Bleizitrat für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate mit Kohlenstoff beschichtet und mit 12 nm großen Goldkörnchen behandelt. Da es sich bei den Goldkörnchen um elektronendichtes Material handelt, erscheinen diese im Transmissionselektronenmikroskop mit hohem Kontrast. Demgemäß können die Goldkörnchen später als Ansatzpunkte genutzt werden, um die einzelnen TEM-Aufnahmen zu einem Tomogramm zusammenzufügen. Für die Tomografie wurden Bilder von  $+70^\circ$  bis  $-70^\circ$  Neigung in  $1^\circ$  Schritten in einem JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen. Für diese Aufnahmen wurde die freiverfügbare SerialEM Software benutzt. Um die Bilder zu einem dreidimensionalen Tomogramm zu rekonstruieren, wurde die ebenfalls freiverfügbare ETomo/IMOD Software eingesetzt. Die zeitaufwendige Rekonstruktion der Tomogramme wurde freundlicherweise von Ana Marcu (SFB 630; Teilprojekt B3: Projektteil Schurig; Universität Würzburg) übernommen. Mithilfe der freiverfügbaren Software ImageJ Version 1.49g konnten die Tomogramme in Videos (mp4-Dateien) umgewandelt werden.

## 2.2.4 Transkriptomanalysen

### 2.2.4.1 Isolation von RNA aus *L. m.*-infizierten BMDM

Für die Hybridisierung von Affymetrix Microarrays wurde RNA aus *L. m.*-infizierten und nicht-infizierten BMDM isoliert, die für 24 h inkubiert wurden. Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Dazu wurde das Kulturmedium von den Suspensionsplatten vorsichtig abgenommen und anschließend 600  $\mu$ l Buffer RTL (aus RNeasy Mini Kit) pro Platte hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Lysate wurden dann in QIAshredder spin Säulchen (aus QIAshredder Kit), welche in 2 ml Reaktionsgefäßen

steckten, überführt und bei  $12\ 100 \times g$  für 2 min bei RT zentrifugiert, um die Lysate zu homogenisieren. Anschließend wurde das Säulchen verworfen und zum Durchfluss wurden  $600\ \mu\text{l}$  70 % Ethanol hinzugeben. Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt. Danach wurden die Proben jeweils in ein RNeasy spin Säulchen (aus RNeasy Mini Kit), welche ebenfalls in 2 ml Reaktionsgefäßen steckten, überführt und bei  $12\ 100 \times g$  für 15 s bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden  $350\ \mu\text{l}$  Buffer RW1 (aus RNeasy Mini Kit) zu jedem RNeasy spin Säulchen hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation bei  $12\ 100 \times g$  für 15 s bei RT wurde der Durchfluss verworfen. Zum Verdau von DNA wurden  $80\ \mu\text{l}$  DNase I incubation mix (aus RNase-Free DNase Set) auf jede RNeasy spin Membran gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden zu jeder Probe nochmals  $350\ \mu\text{l}$  Buffer RW1 hinzugefügt und die Proben bei  $12\ 100 \times g$  für 15 s bei RT zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss wieder verworfen wurde, wurden zu jedem Ansatz  $500\ \mu\text{l}$  Buffer RPE (aus RNeasy Mini Kit) gegeben und bei  $12\ 100 \times g$  für 15 s bei RT zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Durchfluss erneut verworfen. Es wurden dann  $500\ \mu\text{l}$  Buffer RPE zu jeder Probe hinzugefügt und bei  $12\ 100 \times g$  für 2 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss wieder verworfen und es wurde  $50\ \mu\text{l}$  ribonukleasefreies Wasser (aus RNeasy Mini Kit) direkt auf die RNeasy spin Membran gegeben und die Röhrchen bei  $12\ 100 \times g$  für 1 min bei RT zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde nochmals wiederholt und der Durchfluss in ribonukleasefreien Reaktionsgefäßen zu je  $20\ \mu\text{l}$  aliquotiert. Die RNA-Konzentration wurde für jede Probe mit einem NanoDrop 1000 bestimmt. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei  $-80\ ^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.4.2 Hybridisierung von Affymetrix Microarrays

Durch den Einsatz von Microarrays kann die Expression einer Vielzahl von Genen in sehr wenig Probenmaterial untersucht werden. Auf den Microarrays befinden sich spezielle Sonden, welche eine definierte DNA-Sequenz erkennen, wodurch die gebundene DNA identifiziert werden kann. Damit diese Sequenzen erkannt werden können, wird RNA in komplementäre DNA (englisch: *complementary DNA*, cDNA) durch das Enzym reverse Transkriptase synthetisiert. Je mehr cDNA von den entsprechenden Sonden er-

kannt wird, desto mehr Boten-RNA (englisch: *messenger RNA*, mRNA) ist in der jeweiligen Probe vorhanden. Durch den Vergleich mit Kontrollproben kann nun eine Aussage über die Änderung der Genexpression abgeleitet werden.

Die Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Microarrays wurden durch die Mitarbeiter der Microarray-Gruppe der „Core Unit SysMed“ des Universitätsklinikums Würzburg hybridisiert. Zuvor wurde die verwendete RNA auf Degradierung geprüft. Dazu wurde die RNA-Integritätszahl (englisch: *RNA integrity number*, RIN) für jede Probe mit einem Bioanalyzer 2100 bestimmt. Die bestimmten RINs lagen in einem Bereich von 8,8 bis 9,5; wobei 10,0 die höchstmögliche RIN ist. Die Affymetrix Microarrays wurden mit 100 ng RNA hybridisiert. Zuvor wurde die verwendete RNA *in vitro* transkribiert und mit dem IVT-Express Kit mit Biotin markiert. Die Signale der Affymetrix Microarrays wurden mit einem GeneChip Scanner 3000 7G ausgelesen. Um eine Kreuzhybridisierung mit dem Transkriptom der Parasiten zu vermeiden, wurden RNA-Sequenzen, welche eine Homologie mit dem Genom von *L. m.* aufweisen, aus der Analyse ausgeschlossen [30]. Die Hybridisierung der Affymetrix Microarrays wurde von Margarete Göbel, der Vergleich der RNA-Sequenzen auf Homologien zwischen *L. m.* und Maus wurde von Dr. Claus J. Scholz sowie Dr. Heike Weber (alle Microarray-Gruppe) durchgeführt.

#### 2.2.4.3 Bioinformatische Aufbereitung der Microarray-Daten

Die gewonnen Rohdaten aus der Hybridisierung der Affymetrix Microarrays wurden von Dr. Claus J. Scholz und Dr. Heike Weber (beide Microarray-Gruppe) bioinformatisch aufbereitet. Ebendiese Aufbereitung der Daten wurde kürzlich in der Literatur beschrieben [7].

### 2.2.5 Western-Blot-Analysen

#### 2.2.5.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden *L. m.*-infizierte und nicht-infizierte Kontroll-BMDM für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zudem wurden uninfizierte BMDM für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in HBSS inkubiert. Für Proteinlysate, welche für den LC3B Western Blot verwendet wurden, wurden die Proben 1 h vor Lyse mit 100 nM

Baf A1, welches in DMSO gelöst wurde, behandelt. Die Behandlung der Zellen mit Baf A1 bewirkt, dass die Ansäuerung des autophagosomalen/lysosomalen Kompartments verhindert wird und somit die Degradation von LC3B inhibiert wird. Kontrollen wurden 1 h vor Lyse mit DMSO behandelt. Anschließend wurde das Kulturmedium vorsichtig abgenommen und die Zellen wurden mit Lysepuffer lysiert. Für LC3B Western Blots wurden  $10^6$  BMDM mit  $31,5 \mu\text{l}$  Lämmli-Puffer lysiert. Für eine 60/15 Suspensionsplatte mit  $3,32 \times 10^6$  BMDM ergibt sich eine Menge von  $105 \mu\text{l}$  Lämmli-Puffer zum Lysieren der Zellen. Alle weiteren Proben wurden mit RIPA-Lysebuffer lysiert. Laut Anleitung des Herstellers sollen auf eine Petrischale mit  $100 \text{ mm}$  Durchmesser  $400 \mu\text{l}$  RIPA-Lysebuffer zum Lysieren der Zellen gegeben werden. Daraus ergibt sich für eine 60/15 Suspensionsplatte mit  $60 \text{ mm}$  Durchmesser ein Volumen von  $144 \mu\text{l}$ . Dazu wurden noch nach Anleitung des Herstellers jeweils  $1,5 \mu\text{l}$  EDTA bzw. Halt-Proteaseinhibitor-Cocktail gegeben, wodurch sich ein Gesamtvolumen von  $147 \mu\text{l}$  pro 60/15 Suspensionsplatte ergibt. Proben, welche mit Lämmli-Puffer lysiert wurden, wurden anschließend in  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäße überführt und bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $5 \text{ min}$  erhitzt. Das Lysat wurde nun mit einer  $27 \frac{3}{4} \text{ G}$  Kanüle auf einer  $1 \text{ ml}$  Spritze fünfmal auf und ab gezogen, um die DNA im Lysat zu zerschneiden. Jeweils  $24 \mu\text{l}$  Lysat wurden in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Zellen, welche mit RIPA-Lysepuffer behandelt worden waren, wurden vor dem Abernten für  $10 \text{ min}$  auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Lysate in QIAshredder Säulchen überführt und bei  $12 \text{ } 100 \times \text{ g}$  für  $2 \text{ min}$  bei RT zentrifugiert, um die Lysate zu homogenisieren. Jeweils  $20 \mu\text{l}$  Lysat wurden in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Lämmli-Puffer Proben konnten direkt aufgetaut und bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $5 \text{ min}$  denaturiert werden, bevor sie auf die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: *polyacrylamide gel electrophoresis*; PAGE)-Gele geladen worden sind, da der Probenpuffer schon enthalten war. Die RIPA-Puffer-Proben mussten vor Beladung der Gele mit jeweils  $5 \mu\text{l}$   $5\text{x}$  SDS-Probenpuffer gemischt und ebenfalls bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $5 \text{ min}$  denaturiert werden.

#### 2.2.5.2 Herstellung der SDS-PAGE-Gele

Für die SDS-PAGE wurden Polyacrylamidgele mit einer Dicke von  $1 \text{ mm}$  gegossen. Dazu wurde das  $12 \text{ \%}$ -ige Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, konnte das Sammelgel über dieses gegossen werden. Für

die späteren Banden wurden Kämme mit 10 Zinken in das noch flüssige Sammelgel gesteckt, sodass später pro Gel 10 Taschen für die Lysate entstanden. Die Kämme wurden nach Polymerisation des Sammelgels gezogen und die Taschen mit 1x SDS-Laufpuffer ausgespült.

#### 2.2.5.3 Aufbau und Durchführung der Western Blots

Ein SDS-PAGE-Gel wurde pro Tasche mit jeweils 20 µl Lysat beladen. Zur Größenbestimmung wurde eine Tasche mit einem Page ruler prestained protein ladder Größenmarker beladen. Jeweils 2 Gele wurden in eine Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophorese eingespannt. Diese wurde dann mit 1x SDS-Laufpuffer, wie vom Hersteller vorgeschrieben, befüllt. Für den Durchlauf der Proben durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in Sandwich-Technik in eine mit Western-Blot-Transferpuffer befüllte Blotkammer eingespannt. Die Proteine wurden im Anschluss mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Stromstärke von 250 mA für 1 h bei RT geblottet. Der Proteintransfer auf die Membran wurde durch Färben in Ponceau S überprüft. Die Membranen wurden anschließend in 50 ml 5 % BSA über Nacht bei 4 °C unter leichter Bewegung (ca. 70 min<sup>-1</sup>) inkubiert. Das BSA wurde in TBS-T gelöst. Daraufhin wurden die Membranen mit dem Primärantikörper, welcher in TBS-T verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlicher Bewegung (ca. 70 min<sup>-1</sup>) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen fünfmal in 50 ml TBS-T auf einem Schütteltisch (ca. 400 min<sup>-1</sup>) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membranen im Sekundärantikörper für 1 h bei RT unter kontinuierlicher Bewegung (ca. 70 min<sup>-1</sup>). Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit HRP konjugiert, welche durch kurze Inkubation in Immobilon Western HRP Substrat und einem ImageQuant LAS 4000 Imager sichtbar gemacht werden konnten. Die Bandenstärke der einzelnen Proben wurde mit ImageJ Version 1.49s densitometrisch ausgewertet. Für sämtliche Proteine diente ACTB als Ladekontrolle. Jedes Protein wurde daher auf ACTB normalisiert und anschließend wurden die densitometrischen Werte als Vielfache der nicht-infizierten Kontrollproben dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten wurde durch einseitige t-Tests in Excel 2013 getestet. Der einseitige t-Test wurde

angewendet, da bereits eine Vorannahme aus den Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix-Microarray-Analysen bestand. Die Normalverteilung der Stichproben wurde durch einem Shapiro-Wilk-Test in SPSS Version 20.0.0 bestätigt. Da aufgrund des technischen Aufwandes eine maximale Probenzahl von  $n = 3$  möglich war, wurde die Normalverteilung mit zuvor genannten Test geprüft. Ein Unterschied zwischen den Mittelwerten galt ab einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant.

### 2.2.6 Herunterregulation der Genexpression mit siRNA

Um die Auswirkungen von bestimmten Proteinen auf die Infektionsrate von *L. m.* Parasiten zu untersuchen, wurde die Expression von ausgewählten Proteinen durch spezifische siRNAs temporär herunterreguliert. Diese Herunterregulation wurde durch Proteinlysate von transfizierten Proben durch Western-Blot-Analysen bestätigt. Für die Proteine ATG5 und UB wurden BMDM direkt nach 6-tägiger Kultivierung abgeerntet (s. o.). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die BMDM nochmals bei  $300 \times g$  für 10 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Für die Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  BMDM in  $100 \mu\text{l}$  Mouse Macrophage Nucleofector Solution (aus Amaxa Mouse Macrophage Nucleofector Transfection Kit) gelöst. Zur Transfektion mit entsprechender siRNA wurden pro Transfektionsküvette (aus Amaxa Mouse Macrophage Nucleofector Transfection Kit)  $1,14 \times 10^6$  BMDM hinzugegeben. Die siRNAs wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers in mitgeliefertem ribonukleasefreiem Wasser gelöst, sodass eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  entstand. Zu jeder Transfektionsküvette wurden  $3 \mu\text{l}$  der jeweiligen siRNA-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Nucleofector 2b Device und Programm Y-001 transfiziert. Um ein Absterben der BMDM zu verhindern, wurde sofort nach Transfektion  $500 \mu\text{l}$  komplettes RPMI-Medium zu jeder Küvette hinzugegeben und die Küvette auf Eis gestellt. Die transfizierten BMDM wurden in  $50 \text{ ml}$  Zentrifugenröhrchen überführt und die Küvetten nochmals mit  $500 \mu\text{l}$  komplettem RPMI-Medium ausgespült. Anschließend wurden die Zellen wieder in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  BMDM pro ml auf die Suspensionsplatten ausgesät. Nach einer Inkubation von 4 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$ , wurden die BMDM, wie bereits beschrieben, infiziert.

Für die Proteine BNIP3 und CTSE wurden BMDM kultiviert und infiziert. 20 h nach Infektion wurden die infizierten Makrophagen abgeerntet und mit der entsprechenden

siRNA transfiziert (s. o.). Bei allen Proben wurde 48 h nach Infektion die Infektionsrate bestimmt (s. o.), um die Auswirkungen der Herunterregulation der Genexpression auf die Infektionsraten zu beobachten. Zudem wurden 6 h, 12 h und 24 h nach Transfektion Proteinlysate abgeerntet, mit denen die Herunterregulation mit Western-Blot-Analysen auf Proteinebene bestätigt wurde (Abbildung S1; siehe Anlage).

### 2.2.7 Statistische Methoden

Zur Testung der statistischen Signifikanz wurden in dieser Arbeit verschiedene statistische Verfahren verwendet, welche im Folgenden aufgeführt sind. Aufgrund der Verwendung verschiedener statistischer Testverfahren wird zusätzlich im jeweiligen Kapitel kurz auf die statistische Auswertung eingegangen.

Für die Prüfung der statistischen Signifikanz des totalen Autophagiescores der einzelnen Proben wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test benutzt. Die Berechnung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde mit SPSS Version 20.0.0 durchgeführt (s. Kapitel „2.2.3.2 Erstellung eines semiquantitativen Scores zur Autophagiemessung“).

Die statistische Signifikanz der Infektionsraten und der Nukleus-Kinetoplast-Abstände wurde durch einen zweiseitigen t-Test mit SPSS Version 20.0.0 geprüft. (s. Kapitel „2.2.2.1 Bestimmung der Infektionsrate in *L. m.*-infizierten BMDM“ und „2.2.2.2 Bestimmung des Nukleus-Kinetoplast-Abstands in *L. m.*-infizierten BMDM“)

Für die Vergleiche der Densitometrie der einzelnen Western-Blot-Proben wurde ein einseitiger t-Test zur Prüfung der Signifikanz verwendet. Die Berechnung des einseitigen t-Test wurde mit Excel 2013 durchgeführt (s. Kapitel „2.2.5.3 Aufbau und Durchführung der Western Blots“).

Die komplexe bioinformatische Aufarbeitung der aus den Affymetrix Microarrays gewonnenen Daten und die Testung der statistischen Signifikanz wurden von Dr. Claus J. Scholz und Dr. Heike Weber durchgeführt (s. Kapitel „2.2.4.3 Bioinformatische Aufbereitung der Microarray-Daten“)

Eine statistische Signifikanz wurde sowohl bei dem verwendeten Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als auch bei den t-Tests ab einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

Zur Beurteilung eines linearen Zusammenhangs zwischen den densitometrischen LC3B-II Werten und den totalen Autophagiescores wurde in Excel 2013 der Korrelationskoeffizient R berechnet und ein Korrelationsdiagramm erstellt (s. Kapitel „3.1.2 Untersuchung der Autophagieinduktion mit LC3B Western-Blot-Analysen“).



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM

#### 3.1.1 TEM Untersuchungen zur Autophagieinduktion

Zur Untersuchung der Autophagieinduktion in Makrophagen wurden BMDM mit *L. m.* Promastigoten infiziert und für 24 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden uninfizierte BMDM für die gleiche Zeit inkubiert. Ferner wurden uninfizierte BMDM für 1 h in HBSS, einem Hungermedium, inkubiert. Aufgrund der fehlenden Aminosäuren in HBSS wird in den behandelten Zellen Autophagie induziert, um auf diese Weise die Homöostase der Zelle zu erhalten. Außerdem wurde zu uninfizierten BMDM 500 nM Rapamycin gegeben und anschließend für 1 h inkubiert. Rapamycin führt über eine Hemmung der mechanistic Target of Rapamycin (MTOR)-Kinaseaktivität, einem zentralen Regulator der Autophagie, zur Autophagieinduktion [12, 31].

Die TEM war eine der ersten Methoden, mit der Autophagie untersucht wurde und sie nimmt bis heute einen sehr hohen Stellenwert in der Untersuchung autophager Prozesse ein [12]. Zu den wichtigen morphologischen Kennzeichen dieser autophagen Prozesse zählen v. a. eine erhöhte Vakuolisierung des Zytoplasmas (Abbildung 4C – E) sowie das vermehrte Auftreten von Autophagosomen (Abbildung 4F – H) und MLS (Abbildung 4I – K). Autophagosomen zeigen sich im Transmissionselektronenmikroskop als doppelmembrane Strukturen, in denen unter Umständen Teile des Zytoplasmas oder Zellorganellen enthalten sein können. MLS hingegen sind durch eine multilamellare Struktur gekennzeichnet [12, 18, 25-29]. Anhand des totalen Autophagiescores wurden die verschiedenen Proben ausgewertet und miteinander verglichen. Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den totalen Autophagiescores der uninfizierten Proben und den *L. m.*-infizierten Proben (Abbildung 5A). Auch ein signifikanter Unterschied zwischen uninfizierten Proben und den Proben, welche mit HBSS oder Rapamycin behandelt wurden, konnte beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied in den totalen Autophagiescores zwischen *L. m.*-infizierten Proben und HBSS- bzw. rapamycinbehandelten Proben (Abbildung 5A).

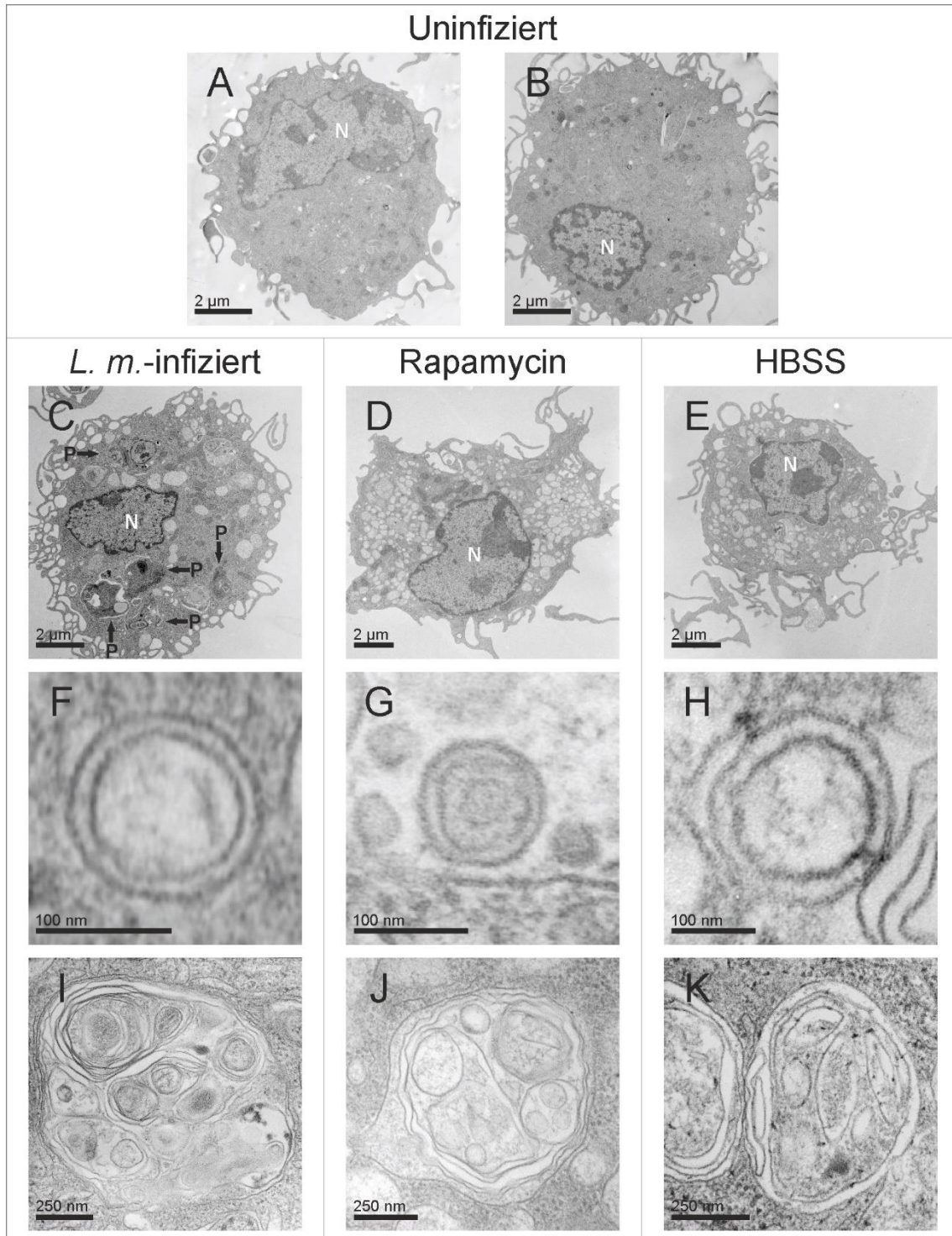


Abbildung 4: TEM-Aufnahmen von *L. m.*-infizierten, autophagieinduzierten und uninfizierten BMDM. (A, B) uninfizierte Kontroll-BMDM; (C – K) BMDM wurden mit (C, F, I) *L. m.* Promastigoten infiziert, bzw. wurden uninfizierte BMDM mit Autophagieinduktoren (D, G, J) Rapamycin oder (E, H, K) HBSS behandelt. Im Gegensatz zu den (A, B) uninfizierten Kontrollzellen zeigte sich in (C – K) eine Autophagieinduktion, welche durch (C – E) eine vermehrte Vakuolisierung des Zytoplasmas, das vermehrte Auftreten von (F – H) Autophagosomen und (I – K) MLS gekennzeichnet ist.

N = Nukleus des Makrophagen; P = Parasit.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

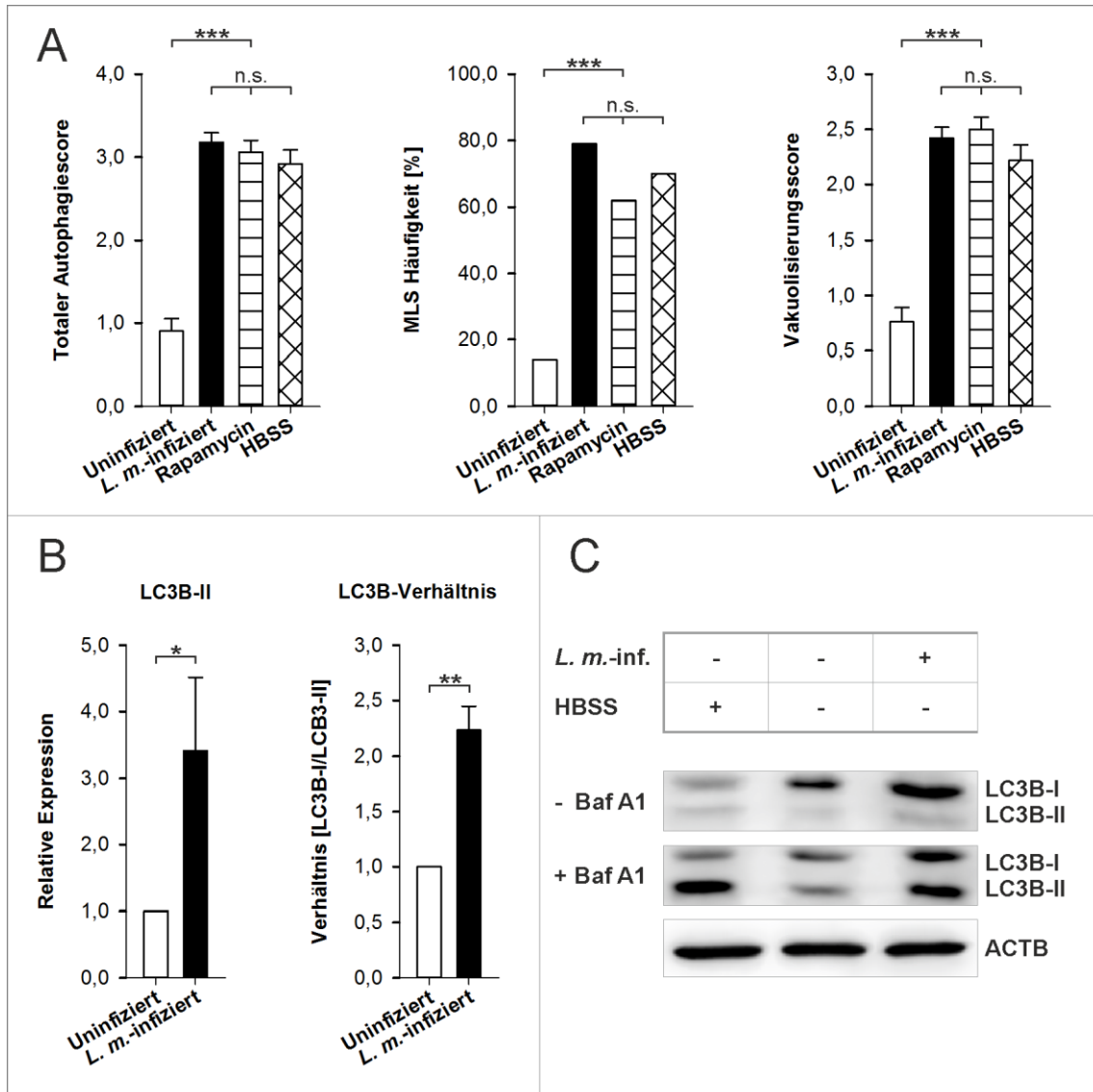


Abbildung 5: Untersuchungen zur Autophagieinduktion in BMDM.

(A) TEM-Übersichtsbilder von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM sowie BMDM, bei denen Autophagie durch Rapamycin oder HBSS induziert wurde, wurden mittels des totalen Autophagiescores bewertet. Außerdem wurde bei diesen Proben das Auftreten von MLS (MLS Häufigkeit) und die Vakuolisierung des Zytoplasmas (Vakuolisierungsscore) charakterisiert. (B, C) Lysate von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, wurden benutzt, um Autophagie mittels LC3B Antikörper in Western-Blot-Analysen zu untersuchen. Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. ACTB diente bei allen Western Blots als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung von LC3B-II in *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM, zusätzlich wurde anhand der densitometrischen Werte von LC3B-I und LC3B-II das LC3B-Verhältnis berechnet. (C) Um den autophagen Flux in *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, zu untersuchen, wurden diese Proben zusätzlich mit Baf A1 behandelt. Zur Kontrolle wurden BMDM mit DMSO behandelt.

Baf A1 = Bafilomycin A1; *L. m.*-inf. = *L. m.*-infiziert; n.s. = nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

Auch wenn man nur die Vakuolisierung der BMDM vergleicht, hat sich gezeigt, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen nicht-infizierten und *L. m.*-infizierten BMDM gibt. Wie beim totalen Autophagiescore haben infizierte Proben und HBSS- bzw. rapamycinbehandelte BMDM keinen signifikanten Unterschied aufgewiesen (Abbildung 5A).

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch beim Auftreten von MLS. Denn es konnte gezeigt werden, dass MLS signifikant häufiger bei *L. m.*-infizierten BMDM als bei uninfizierten BMDM auftraten. Zudem gab es bei der Häufigkeit der MLS keinen signifikanten Unterschied zwischen *L. m.*-infizierten und autophagieinduzierten (HBSS und Rapamycin) Proben (Abbildung 5A).

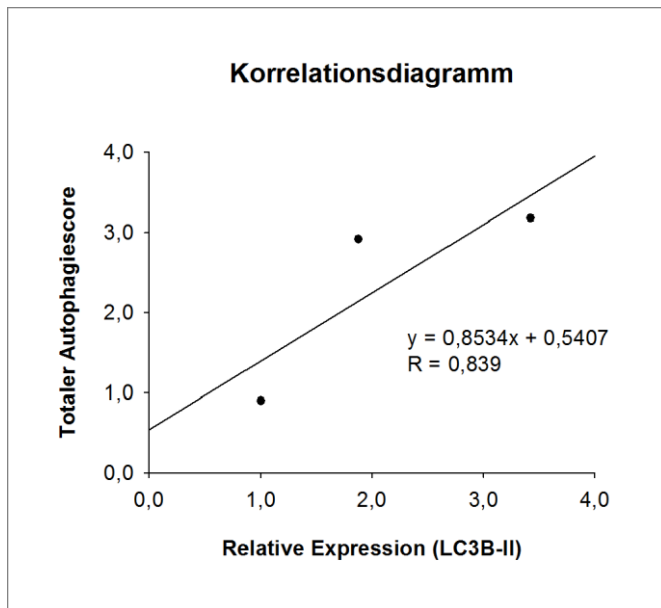
Dieses Ergebnis zeigt, dass *L. m.*-infizierte BMDM den gleichen Phänotyp aufweisen wie BMDM, bei denen Autophagie entweder pharmakologisch (Rapamycin) oder durch Hungern (HBSS) induziert wurde. Dies ließ sich nicht nur anhand des totalen Autophagiescores beobachten, sondern auch dadurch, dass die Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie das Auftreten von MLS alleine keinen signifikanten Unterschied zwischen *L. m.*-infizierten und autophagieinduzierten BMDM zeigen. Es lässt sich dementsprechend konkludieren, dass bei *L. m.*-infizierten BMDM die maximal mögliche Autophagie induziert war. Im Vergleich zwischen uninfizierten Kontroll-BMDM und *L. m.*-infizierten bzw. autophagieinduzierten BMDM konnte hingegen ein signifikanter Unterschied im totalen Autophagiescore, im Vakuolisierungsscore und im Auftreten von MLS (MLS Häufigkeit) festgestellt werden. So wurde die Hypothese der Autophagieinduktion in BMDM durch die Infektion von *L. m.* Parasiten aufgestellt, welche im Folgenden auf molekularer Ebene weiter untersucht wurde.

### 3.1.2 Untersuchung der Autophagieinduktion mit LC3B Western-Blot-Analysen

Um die Hypothese der Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM auch auf molekularer Ebene zu untersuchen und um die Ergebnisse aus den TEM Experimenten zu bestätigen, wurden LC3B Western Blots von uninfizierten und *L. m.*-infizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, durchgeführt. Bei LC3B handelt es sich um einen der sensitivsten und gebräuchlichsten Marker für Autophagie [12]. LC3B

tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Zum einen als zytosolisches LC3B-I und zum anderen als LC3B-II, welches an die Membran der Autophagosomen gebunden ist. Bei der Autophagieinduktion wird LC3B-I mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert, woraus LC3B-II entsteht, welches mit der Membran der Autophagosomen assoziiert ist. Somit ist LC3B-II ein exzellenter Marker für eine quantitative Analyse von Autophagosomen, denn je mehr LC3B-II detektierbar ist, desto mehr Autophagosomen sind vorhanden [12, 32].

So konnte gezeigt werden, dass bei *L. m.*-infizierten Proben mehr LC3B-II vorhanden ist als bei uninfizierten Proben, und somit auch mehr Autophagosomen vorhanden sind (Abbildung 5B und C). Vergleicht man nun die densitometrischen LC3B-II Werte mit den totalen Autophagiescores, so stellt man ein ähnliches Muster fest (Abbildung 5A und B). Um einen linearen Zusammenhang eindeutig zwischen den densitometrischen LC3B-II Werten und den totalen Autophagiescores festzustellen, wurde in Excel 2013 der Korrelationskoeffizient R berechnet. Mit einem Wert von  $R = 0,839$  wies der berechnete Korrelationskoeffizient einen starken positiven linearen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen auf und damit auch zwischen den beiden Methoden (Abbildung 6). Der Korrelationskoeffizient kann einen Wert zwischen -1,0 und +1,0 annehmen, wobei -1,0 einen vollständig negativen linearen und +1,0 einen vollständig positiven linearen Zusammenhang bedeuten würde. Falls der Korrelationskoeffizient einen Wert um 0,0 annimmt, bedeutet dies, dass kein linearer Zusammenhang besteht [33].



Korrelationskoeffizient R	0,839
Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>	0,703
Steigung b	0,8534
Achsenabschnitt a	0,5407

Tabelle 9: Berechnete Größen zum Korrelationsdiagramm (Abbildung 6).

Abbildung 6: Korrelationsdiagramm.

Diagramm zeigt die Korrelation zwischen dem totalen Autophagiescore und der relativen Expression von LC3B-II. Der berechnete Korrelationskoeffizient R beträgt  $R = 0,839$ . Die abgebildete Gerade hat die Funktion  $y = 0,8534x + 0,5407$ .

Probe	Relative Expression (LC3B-II)	Totaler Autophagiescore
HBSS	1,88	2,92
Uninfiziert	1,00	0,90
<i>L. m.</i> -infiziert	3,42	3,18

Tabelle 10: Werte für Korrelationsdiagramm (Abbildung 6).

Der LC3B-II Wert alleine kann jedoch zu Fehlinterpretationen über die Änderung der Autophagieaktivität führen. Denn eine erhöhte Anzahl von Autophagosomen kann nicht nur durch eine erhöhte Autophagieinduktion, sondern auch durch eine Hemmung des Autophagosomabbaus bedingt sein [12, 32]. Deshalb ist es üblich, das Verhältnis von LC3B-II zu LC3B-I zu berechnen. Durch das LC3B-II/LC3B-I-Verhältnis werden somit quantitative Änderungen in der Autophagieaktivität charakterisiert. Dies bedeutet, dass eine Erhöhung des LC3B-II/LC3B-I-Verhältnisses in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf eine erhöhte autophagie Aktivität in den behandelten Zellen schließen lässt [12, 32, 34], da mehr LC3B-I zu LC3B-II umgesetzt wird und somit auch mehr Autophagosomen entstehen. In *L. m.*-infizierten BMDM konnte gezeigt werden, dass diese Zellen im Vergleich zu den uninfizierten BMDM ein signifikant erhöhtes LC3B-

II/LC3B-I Verhältnis aufweisen und somit auch eine erhöhte autophagy Aktivität (Abbildung 5B und C).

Mithilfe von bestimmten Autophagieinhibitoren können qualitative Veränderungen im autophagen Flux (englisch Fluss) untersucht werden. Ein sehr bekannter und oft angewandter Inhibitor ist Baf A1. Dieser Inhibitor hemmt u. a. die V-Typ-ATPase an den Lysosomen, wodurch deren Ansäuerung verhindert wird und somit auch der Abbau in den Autolysosomen inhibiert wird. Für die Anwendung von Baf A1 bedeutet dies, dass bei einem funktionierenden autophagen Flux eine Behandlung mit Baf A1 bedingt, dass der Abbau von LC3B-II in den Autolysosomen verhindert wird und es somit zu einer Anreicherung von LC3B-II kommt. Im Umkehrschluss heißt es, dass bei einem defekten oder inhibierten autophagen Fluss eine Behandlung mit Baf A1 keine weitere Anreicherung von LC3B-II zu sehen ist [12, 32]. Durch die Behandlung mit 100 nM Baf A1 für 1 h zeigte sich eine deutliche Anreicherung von LC3B-II in *L. m.*-infizierten BMDM verglichen mit *L. m.*-infizierten BMDM, die mit der gleichen Menge DMSO für 1 h behandelt wurden (Abbildung 5C). Zudem konnte auch in uninfizierten BMDM eine leichte Anreicherung von LC3B-II nachgewiesen werden, nachdem diese mit 100 nM Baf A1 für 1 h behandelt wurden (Abbildung 5C). Dieses Ergebnis offenbart, dass in den verwendeten BMDM eine funktionierende Autophagie existent ist, was durch die Anreicherung von LC3B-II in uninfizierten BMDM nach Baf A1 Behandlung gezeigt wurde. Außerdem zeigte sich eine deutlich höhere autophagy Aktivität in *L. m.*-infizierten BMDM, da nach Baf A1 Behandlung eine größere LC3B-II Anreicherung zu sehen war, im Vergleich zu uninfizierten BMDM, die mit Baf A1 behandelt wurden (Abbildung 5C).

In den LC3B-Western-Blot-Analysen konnte eine signifikant erhöhte Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM im Vergleich zu uninfizierten BMDM beobachtet werden. Mit einem berechneten Korrelationskoeffizient von  $R = 0,839$  konnte zudem ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen dem neu etablierten totalen Autophagiescore und der densitometrischen Auswertung der LC3B Western Blots, welche eine der besten und gängigsten Methoden zur Autophagiemessung ist, gezeigt werden. Es lässt sich folgern, dass der totale Autophagiescore zur Messung der Autophagie in *L. m.*-infizierten BMDM herangezogen werden kann.

### 3.2 Verdau von *L. m.* Parasiten in BMDM

Um die Auswirkungen der Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM auf die Infektionsrate zu untersuchen, wurden BMDM mit *L. m.* Promastigoten infiziert und in einem Zeitraum von 0,5 h bis 48 h inkubiert. Anschließend wurden die infizierten BMDM auf Objektträgern fixiert, angefärbt und mit einem Lichtmikroskop untersucht.

In diesem Infektionszeitkurs hatte sich gezeigt, dass in der sehr frühen Infektionsphase, d. h. zwischen 0,5 h und 1 h nach Infektion, ein signifikanter Anstieg der Infektionsrate zu beobachten war. In der darauffolgenden Zeit, also zwischen 1 h und 24 h nach Infektion, zeigte sich allerdings kein signifikanter Anstieg der Infektionsrate. Im folgenden Zeitabschnitt, von 24 h bis 48 h nach Infektion, konnte ein signifikanter Rückgang der Infektionsrate nachgewiesen werden (Abbildung 7A). Dieser Rückgang der Infektionsrate könnte durch die erhöhte autophagische Aktivität, wie mittels totalem Autophagiescore und LC3B Western Blots nachgewiesen wurde, und dem damit verbundenen autophagen Verdau von Parasiten erklärt werden.

Zusätzlich zur Infektionsrate wurden die Abstände zwischen Nukleus und Kinetoplast der *L. m.* Parasiten gemessen. Wie bereits erwähnt, treten Leishmanien in zwei Lebensformen auf, nämlich Promastigoten und Amastigoten. Charakteristisch für die langen lanzettförmigen Promastigoten ist ein weiter Abstand zwischen Nukleus und Kinetoplast. Während ihrer Differenzierung zu Amastigoten verkürzt sich dieser Abstand, weshalb die runden Amastigoten durch einen kurzen Nukleus-Kinetoplast-Abstand gekennzeichnet sind. Auch im untersuchten Zeitraum konnte eine signifikante Verkürzung des Nukleus-Kinetoplast-Abstands zwischen 0,5 h und 24 h nach Infektion beobachtet werden (Abbildung 7B). Somit könnte die Differenzierung der Leishmanien von Promastigoten zu Amastigoten eine mögliche Erklärung für die unveränderte Infektionsrate zwischen 1 h und 24 h nach Infektion sein, da der Parasit sich in dieser Zeit vor Verdau schützt, um eine Differenzierung zum Amastigoten zu gewährleisten.



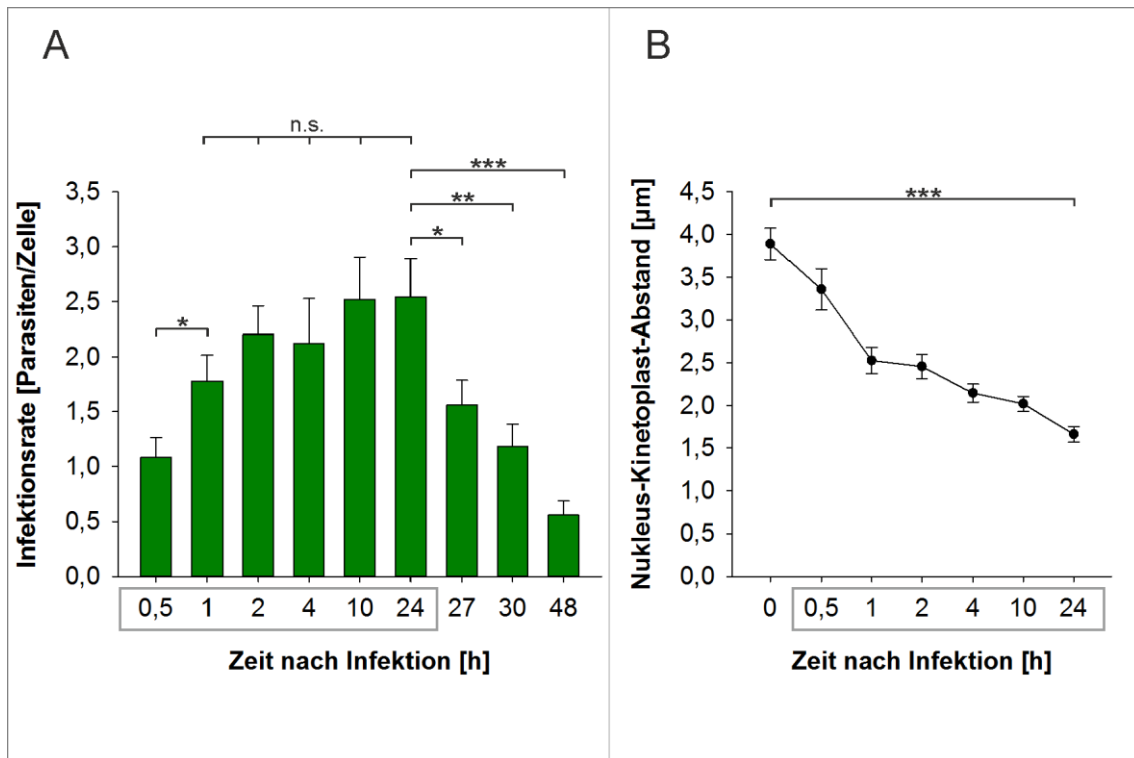


Abbildung 7: Entwicklung der Infektionsrate und des Nukleus-Kinetoplast-Abstands. (A) BMDM wurden mit *L. m.* Promastigoten infiziert und zu den abgebildeten Zeiten abgeerntet. Mittels Lichtmikroskopie wurde die Anzahl der intrazellulären Parasiten bestimmt. Die Infektionsrate wurde durch die durchschnittliche Anzahl der intrazellulären Parasiten zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt. (B) BMDM wurden mit *L. m.* Promastigoten infiziert und zu den abgebildeten Zeiten abgeerntet. Mittels Lichtmikroskopie wurde der Abstand zwischen Nukleus und Kinetoplast der Parasiten bestimmt. Der Nukleus-Kinetoplast-Abstand wurde durch den durchschnittlichen Abstand zwischen diesen beiden Organellen zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt.

n.s. = nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

### 3.3 Untersuchung weiterer autophagierelevanter Proteine

Durch die Expressionsanalysen von LC3B konnte bereits eine Autophagieinduktion in *L. m.*-infizierten BMDM auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Es wird jedoch von führenden Experten auf dem Gebiet der Autophagieforschung empfohlen, dass eine Autophagieinduktion durch mehrere Methoden oder Marker gezeigt wird [12]. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zum totalen Autophagiescore und der LC3B-Expression noch die Expression von ATG5 und UB, zwei weitere wichtige Proteine der Autophagie, mit Western-Blot-Analysen untersucht.

### 3.3.1 Untersuchungen der Expression von ATG5

Bei ATG5 handelt es sich um ein essenzielles Protein für die Bildung von autophagen Membranen. ATG5 bildet zusammen mit zwei weiteren Proteinen, nämlich autophagy-related 12 (ATG12) und autophagy-related 16 (ATG16), einen Komplex, welcher für die Konjugation von PE an LC3B-I verantwortlich ist. Durch diese Konjugation entsteht LC3B-II, das für die Bildung von reifen Autophagosomen notwendig ist [12, 35].

Es konnte mithilfe von Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass ATG5 in *L. m.*-infizierten BMDM, im Vergleich zu nicht-infizierten BMDM, signifikant erhöht exprimiert wird (Abbildung 8A und B). Durch die erhöhte Menge an ATG5 kann man auf einen verstärkten autophagen Flux schließen, da ATG5 für die Umsetzung von LC3B-I zu LC3B-II nötig ist. Um zu zeigen, dass es sich beim Verdau von *L. m.* Parasiten tatsächlich um autophagen Verdau handelt, wurde *Atg5* mRNA mittels spezifischer siRNA herunterreguliert, was zur Folge hat, dass ebenfalls weniger ATG5 Protein translatiert wird. Durch die Herunterregulation von ATG5 wird die Autophagosomformation reduziert, wodurch die autophage Maschinerie inhibiert wird und somit auch keine Parasiten durch Autophagie verdaut werden können. Der Effekt der Herunterregulation wurde auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen bestätigt (Abbildung S1A; siehe Anlage). In den mit *Atg5* siRNA transfizierten BMDM zeigte sich eine signifikant erhöhte Infektionsrate im Vergleich zu den Proben, welche mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden (Abbildung 8C).

Somit konnte die Hypothese des autophagen Verdau von *L. m.* Parasiten in BMDM bestätigt werden. Zusätzlich konnte durch die Untersuchung des für den autophagen Flux essenziellen Proteins ATG5 bestätigt werden, dass die autophage Aktivität in *L. m.*-infizierten BMDM erhöht ist.

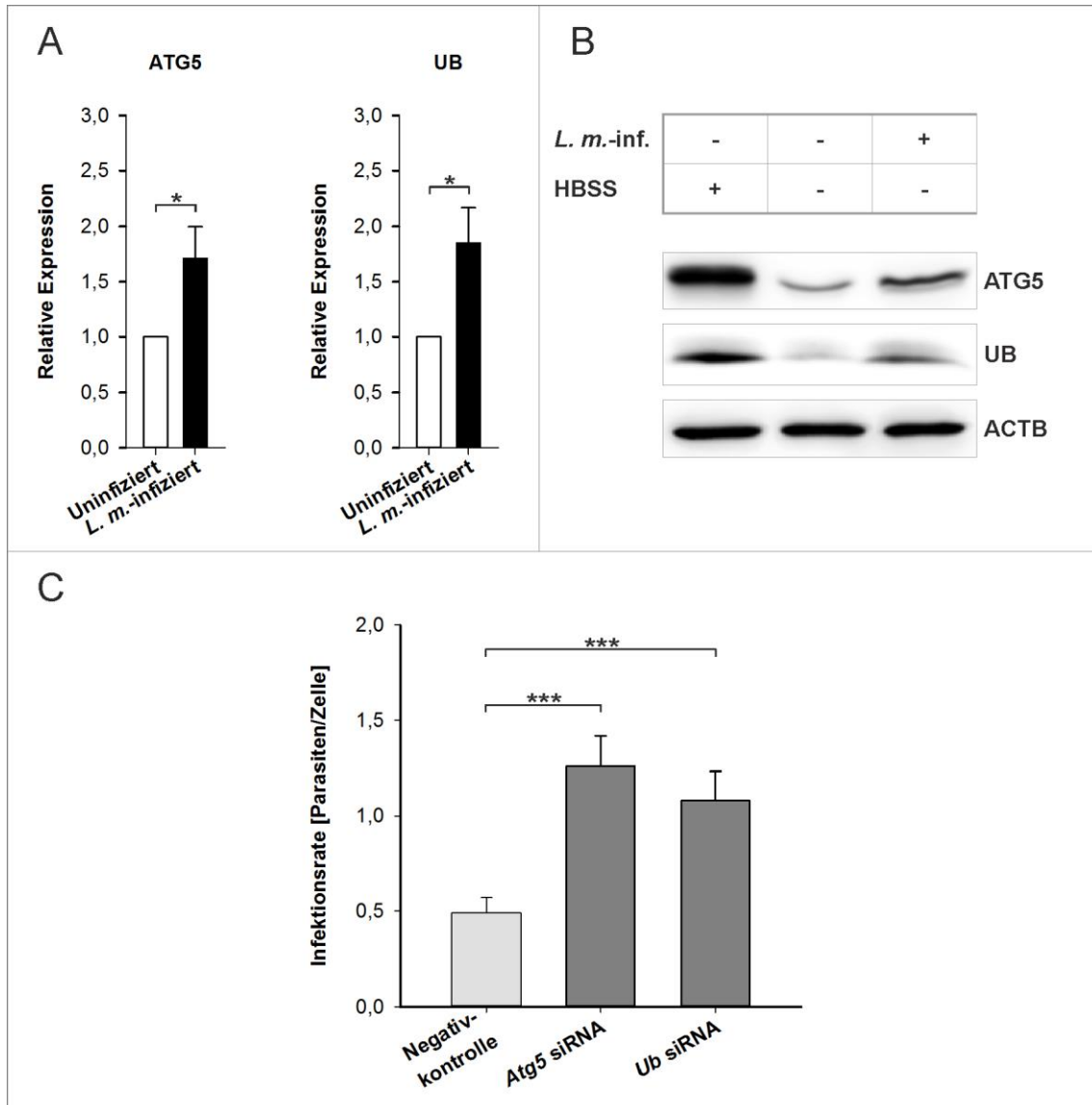


Abbildung 8: Untersuchungen zu ATG und UB.

(**A**, **B**) Lysate von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, wurden benutzt, um Autophagie mittels ATG5 bzw. UB Antikörper in Western-Blot-Analysen zu untersuchen. Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. ACTB diente bei allen Western Blots als Ladekontrolle. (**A**) Densitometrische Auswertung von ATG5 bzw. UB in *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM. (**C**) BMDM wurden direkt nach Generierung mit siRNA bzw. einer Negativkontrolle transfiziert. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit *L. m.* Promastigoten infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 h nach Infektion bestimmt.

*L. m.-inf.* = *L. m.*-infiziert; n.s. = nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

### 3.3.2 Untersuchungen der Expression von UB

Bei UB handelt es sich um ein wichtiges Protein für die Degradation von Substraten durch Autophagie. UB fungiert bei der Autophagie als Adapterprotein zwischen Substrat und den Autophagosomen und sorgt dadurch dafür, dass Strukturen, welche der autophagen Maschinerie zugeführt werden sollen, erkannt und zielgerichtet zum Autophagosom geführt werden [36, 37].

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass UB in *L. m.*-infizierten BMDM im Vergleich zu uninfizierten BMDM (Abbildung 8A und B) signifikant erhöht ist. Darüber hinaus wurde versucht, mittels siRNA die Rolle von UB am autophagen Verdau von *L. m.* Amastigoten zu untersuchen. Dazu wurden, wie bereits beschrieben, *L. m.*-infizierte BMDM mit *Ub*-spezifischer siRNA transfiziert, um die *Ub* mRNA und die Expression des daraus resultierenden UB Proteins herunterzuregulieren. Die Herunterregulation von UB wurde auf Proteinebene durch Western-Blot-Analysen verifiziert (Abbildung S1A; siehe Anlage). Durch die Herunterregulation von UB Protein zeigte sich 48 h nach Infektion eine signifikant erhöhte Infektionsrate in den *L. m.*-infizierten BMDM, welche mit *Ub*-spezifischer siRNA transfiziert wurden, verglichen mit den *L. m.*-infizierten Zellen, die mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden (Abbildung 8C).

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass auch UB wahrscheinlich eine wichtige Rolle am autophagen Verdau von *L. m.* Amastigoten durch BMDM spielt. Eine mögliche Funktion als Adapterprotein zwischen Parasiten und autophagen Membranen, z. B. MLS, ist denkbar, jedoch benötigt es weitergehende und ausführlichere Untersuchungen, um diese Frage vollständig zu klären.

### 3.4 Rolle von MLS im Verdau von *L. m.* Parasiten

Gewöhnlich werden intrazelluläre Pathogene durch autophage Membranen eingeschlossen und in Autolysosomen degradiert. Dies konnte für eine Vielzahl von Erregern, u. a. Bakterien und Viren, gezeigt werden [38]. Aus diesem Grund wurden die *L. m.*-infizierten Proben mit einem Transmissionselektronenmikroskop auf das Vorkommen von solchen autophagen Membranen untersucht. Überraschenderweise konnten keine autophagen Membranen, welche *L. m.* Parasiten einschließen, beobachtet werden, wie es u. a. bei Mykobakterien der Fall ist [18]. Es hatte sich jedoch gezeigt, dass sehr häufig

extrazelluläre MLS, d. h. MLS, die außerhalb des Zytoplasmas des Parasiten waren, mit den Zellmembranen der *L. m.* Amastigoten assoziiert waren (Abbildung 9A und B). Zudem konnten sogar MLS innerhalb der Amastigoten (intrazelluläre MLS) nachgewiesen werden (Abbildung 9C und D). Bei bereits angedauten Parasiten konnten sehr häufig MLS in unmittelbarer Nähe zum Parasiten beobachtet werden (Abbildung 9E und F).

Um die Interaktion von Parasitenmembran und MLS genauer zu untersuchen, wurden Elektronentomografien von den *L. m.*-infizierten Proben erstellt. Mittels dieser Tomogramme konnte die Interaktion von extrazellulären MLS mit der Parasitenmembran bestätigt werden (Videos 1 und 2; Link siehe Anhang). Zudem konnten die intrazellulären MLS genauer untersucht werden (Videos 1 und 3; Link siehe Anhang). Das intrazelluläre Auftreten von MLS, also innerhalb des *L. m.* Parasiten, wurde dadurch verifiziert, dass sich die MLS innerhalb der Mikrotubuli des *L. m.* Amastigoten befunden hatten. Denn diese Mikrotubuli sind ein wesentlicher Bestandteil der leishmanialen Zellmembran. Zudem konnte eine direkte Interaktion von intrazellulären MLS mit den Mikrotubuli des Parasiten beobachtet werden (Video 3; Link siehe Anhang).

Mithilfe der TEM und Elektronentomografie konnte gezeigt werden, dass der autophage Verdau von *L. m.* Parasiten sich vom autophagen Verdau von kleinen Bakterien und Viren zu unterscheiden scheint. Es liegt die Vermutung nahe, dass die 2 – 3  $\mu\text{m}$  großen *L. m.* Amastigoten nicht durch autophage Membranen eingeschlossen werden, sondern dass MLS mit der Parasitenmembran interagieren und dadurch ein Verdau des Parasiten möglich ist. Der exakte Mechanismus ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig bestimmbar und muss in Zukunft genauer untersucht werden.

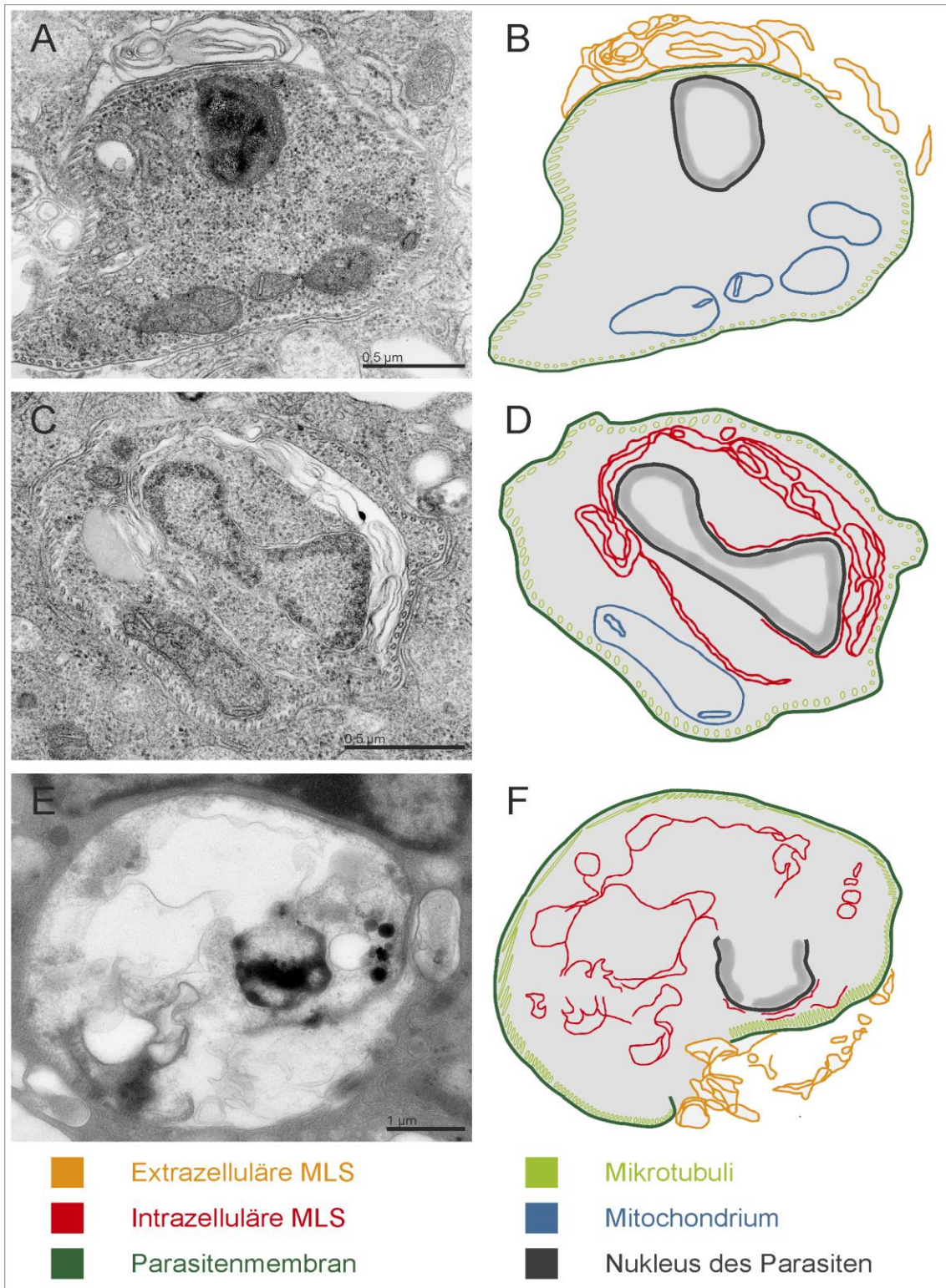


Abbildung 9: Untersuchung der parasitenassoziierten MLS mittels TEM. (A – F) BMDM wurden mit *L. m.* Promastigoten für 24 h infiziert und anschließend für die TEM eingebettet. Es wurden sehr häufig MLS (A) im Zytoplasma der BMDM mit dichter Assoziation zu Amastigoten und (C) im Zytoplasma der Amastigoten beobachtet. (E) zudem wurden bei angedauten Amastigoten mit defekter Zellmembran Überreste von intrazellulären MLS gefunden; (B, D, F) schematische Darstellung der TEM-Bilder A, C, bzw. E.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

## 3.5 Identifikation infektionsspezifischer Gene

### 3.5.1 Erstellung eines Netzwerks aus autophagierelevanten Genen

Um neben den bekannten autophagierelevanten Genen neue, eventuell sogar für die Infektion von *L. m.* Parasiten spezifische Gene zu identifizieren, wurde mithilfe von Affymetrix Microarrays die Genexpression von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM untersucht. Die daraus resultierenden Daten wurden von Dr. Claus J. Scholz und Dr. Heike Weber (beide Microarray-Gruppe) bioinformatisch aufgearbeitet. Von insgesamt 42 712 untersuchten Probesets waren 878 Probesets signifikant differentiell reguliert. Diese Probesets konnten 310 hochregulierten Genen und 333 herunterregulierten Genen zugeordnet werden. Eine vollständige Tabelle der signifikant differentiellen Probesets wurde kürzlich publiziert [7].

Um nun die autophagierelevanten Gene aus dieser Fülle an Genen herauszufiltern, wurde der erstellte Datensatz mit einem von Behrends *et al.* veröffentlichten Netzwerk über autophagierelevante Protein-Protein-Interaktionen verglichen [39]. Das von Behrends *et al.* publizierte Netzwerk wurde als „Autophagy Interaction Network“ (AIN) bezeichnet. Mithilfe dieses Netzwerks konnte ein eigenes Netzwerk erstellt werden, welches aus Genen bestand, die sowohl für die Autophagie relevant als auch spezifisch für die Infektion mit *L. m.* Parasiten sind. Das entstandene Netzwerk enthielt 28 signifikant differentiell exprimierte Gene und wurde in Anlehnung an das AIN als „*Leishmania* Infection Subset of AIN“ (LISA) bezeichnet (Abbildung 10 und Tabelle 11).

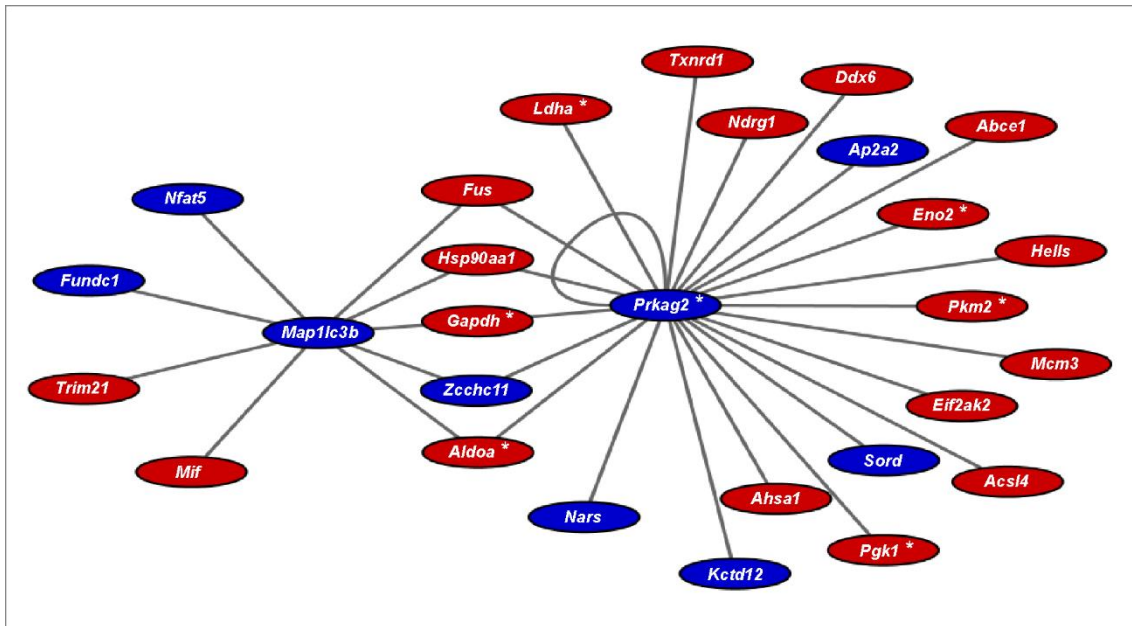


Abbildung 10: LISA.

BMDM wurden mit *L. m.* Promastigoten für 24 h infiziert und anschließend wurde die RNA extrahiert. Danach wurden Affymetrix Microarrays mit RNA hybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Netzwerk aus autophagierelevanten und für die *L. m.* Infektion spezifischen Genen.

\* = Gene der Glykolyse.

Abbildung wurde aus [7] entnommen.

Bei genauerer Untersuchung dieses Netzwerkes zeigte sich, dass LISA zwei zentrale Knotenpunkte hat. Bei diesen handelt es sich zum einem um *Map1lc3b* (= *Lc3b*), einem zentralen Gen der Autophagie und zum anderen um Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (*Prkag2*) der AMP-aktivierten Proteinkinase, einem Regulator der Glykolyse. Diese zwei Knotenpunkte werden durch 5 weitere Gene miteinander verbunden. Dabei handelt es sich um Aldolase A (englisch: *aldolase a*, *Aldoa*), Fused in sarcoma (*Fus*), Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (englisch: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*), Hitzeschockprotein 90 kDa alpha (englisch: *heat shock protein 90 kDa alpha*, *Hsp90aa1*) und Zinc finger CCHC domain containing 11 (*Zcchc11*) (Abbildung 10 und Tabelle 11). Zudem zeigte sich, dass außer *Prkag2* noch weitere Gene der Glykolyse in LISA enthalten waren (Abbildung 10). Außerdem konnten noch zusätzliche signifikant regulierte Gene der Glykolyse in *L. m.*-infizierten BMDM gefunden werden (Tabelle 12). Mit Ausnahme von *Prkag2*, bei dem es sich um einen negativen Regulator der Glykolyse handelt [40], waren alle anderen Gene der Glykolyse signifikant hochreguliert.



<b>LISA</b>		
<b>Gen (Probeset ID)</b>	<b>Symbol</b>	<b>LogFC</b>
ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 (1416014_at)	<i>Abce1</i>	0,392
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (1418911_s_at)	<i>Acsl4</i>	0,347
AHA1, activator of heat shock protein ATPase homolog 1 (yeast) (1424147_at)	<i>Ahsa1</i>	0,422
Aldolase A, fructose-bisphosphate (1433604_x_at)	<i>Aldoa</i>	0,496
Adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit (1432007_s_at)	<i>Ap2a2</i>	-0,536
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60 (1447789_x_at)	<i>Ddx6</i>	0,598
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (1440866_at)	<i>Eif2ak2</i>	0,533
Enolase 2, gamma neuronal (1418829_a_at)	<i>Eno2</i>	0,673
FUN14 domain containing 1 (1453369_a_at)	<i>Fundc1</i>	-0,357
Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human) (1451285_at)	<i>Fus</i>	0,397
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (1447999_x_at)	<i>Gapdh</i>	0,506
Helicase, lymphoid specific (1417541_at)	<i>Hells</i>	0,505
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1 (1426645_at)	<i>Hsp90aa1</i>	0,543
Potassium channel tetramerisation domain containing 12 (1434881_s_at)	<i>Kctd12</i>	-0,419
Lactate dehydrogenase A (1419737_a_at)	<i>Ldha</i>	0,558
Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (1415929_at)	<i>Map1lc3b</i>	-0,445
Minichromosome maintenance deficient 3 ( <i>S. cerevisiae</i> ) (1420028_s_at)	<i>Mcm3</i>	0,365
Macrophage migration inhibitory factor (1416335_at)	<i>Mif</i>	0,731
Asparaginyl-tRNA synthetase (1428666_at)	<i>Nars</i>	-0,384
N-myc downstream regulated gene 1 (1420760_s_at)	<i>Ndrg1</i>	0,545
Nuclear factor of activated T cells 5 (1438999_a_at)	<i>Nfat5</i>	-0,401
Phosphoglycerate kinase 1 (1417864_at)	<i>Pgk1</i>	0,730
Pyruvate kinase, muscle (1417308_at)	<i>Pkm2</i>	0,471
Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (1423831_at)	<i>Prkag2</i>	-0,498
Sorbitol dehydrogenase (1438183_x_at)	<i>Sord</i>	-0,385
Tripartite motif-containing 21 (1418077_at)	<i>Trim21</i>	0,400
Thioredoxin reductase 1 (1421529_a_at)	<i>Txnrd1</i>	0,448
Zinc finger, CCHC domain containing 11 (1437395_at)	<i>Zcchc11</i>	-0,477

Tabelle 11: Liste der in LISA enthaltenen Gene.

Rot = signifikant hochreguliertes Gen; blau = signifikant herunterreguliertes Gen.

<b>Glykolyse</b>		
<b>Gen (Probeset ID)</b>	<b>Symbol</b>	<b>LogFC</b>
Fructose-bisphosphate aldolase A (1433604_x_at)	<i>Aldoa</i>	0,496
Fructose-bisphosphate aldolase C (1451461_a_at)	<i>Aldoc</i>	0,636
Enolase 2 (1418829_a_at)	<i>Eno2</i>	0,673
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (1447999_x_at)	<i>Gapdh</i>	0,506
Lactate dehydrogenase A (1419737_a_at)	<i>Ldha</i>	0,558
Phosphoglycerate kinase 1 (1417864_at)	<i>Pgk1</i>	0,730
Phosphoglycerate mutase 1 (1426554_a_at)	<i>Pgam1</i>	0,546
Pyruvate kinase, muscle (1417308_at)	<i>Pkm2</i>	0,471
Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (1423831_at)	<i>Prkag2</i>	-0,498
Triosephosphate isomerase 1 (1415918_a_at)	<i>Tpi1</i>	0,670

Tabelle 12: Regulierte Gene der Glykolyse.

Rot = signifikant hochreguliertes Gen; blau = signifikant herunterreguliertes Gen.

So entstand durch die Affymetrix-Microarray-Analysen LISA, ein Netzwerk aus infektionsspezifischen und autophagierelevanten Genen. Zudem kann man anhand der Ergebnisse aus LISA vermuten, dass bei der *L. m.* Infektion auch die Glykolyse von Relevanz ist. Des Weiteren scheinen Autophagie und Glykolyse bei der Infektion mit *L. m.* Parasiten eng verknüpft zu sein.

### 3.5.2 Identifikation weiterer infektionsspezifischer Autophagiegene

Neben den in LISA identifizierten autophagierelevanten Genen wurden zudem anhand von publizierten Ergebnissen weitere für die Autophagie relevante Gene in *L. m.*-infizierten BMDM gefunden, die nicht im AIN enthalten waren (Tabelle 13). Bei diesen Genen handelte es sich um *Bnip3*, *Ctse*, DNA-damage regulated autophagy modulator 1 (*Dram1*), Optineurin (*Optn*), Syntaxin 5A (*Stx5a*) und Vacuolar protein sorting 41 (*Vps41*) [41-46].

Weitere autophagierelevante Gene		
Gen (Probeset ID)	Symbol	LogFC
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 (1422470_at)	<i>Bnip3</i>	0,765
Cathepsin E (1418989_at)	<i>Ctse</i>	-0,852
DNA-damage regulated autophagy modulator 1 (1424524_at)	<i>Dram1</i>	0,445
Optineurin (1435679_at)	<i>Optn</i>	0,355
Syntaxin 5A (1449679_s_at)	<i>Stx5a</i>	-0,429
Vacuolar protein sorting 41 (yeast) (1437901_a_at)	<i>Vps41</i>	-0,423

Tabelle 13: Zusätzliche autophagierelevante Gene.

Rot = signifikant hochreguliertes Gen; blau = signifikant herunterreguliertes Gen.

Aus den Genen von Tabelle 13 wurden *Bnip3* und *Ctse* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Bei BNIP3 handelt es sich um ein Protein, welches in der Literatur im Zusammenhang mit MTOR-unabhängiger Autophagie beschrieben worden ist [45]. Bei MTOR handelt es sich um einen der zentralen Regulatoren der Autophagie [31]. Die Protease CTSE wurde ausgewählt, da sie als wichtig für die autophagische Proteolyse in Makrophagen beschrieben worden ist [46].

### 3.6 Untersuchung von BNIP3 und CTSE als autophagierelevante Proteine

#### 3.6.1 Untersuchungen der Expression von BNIP3

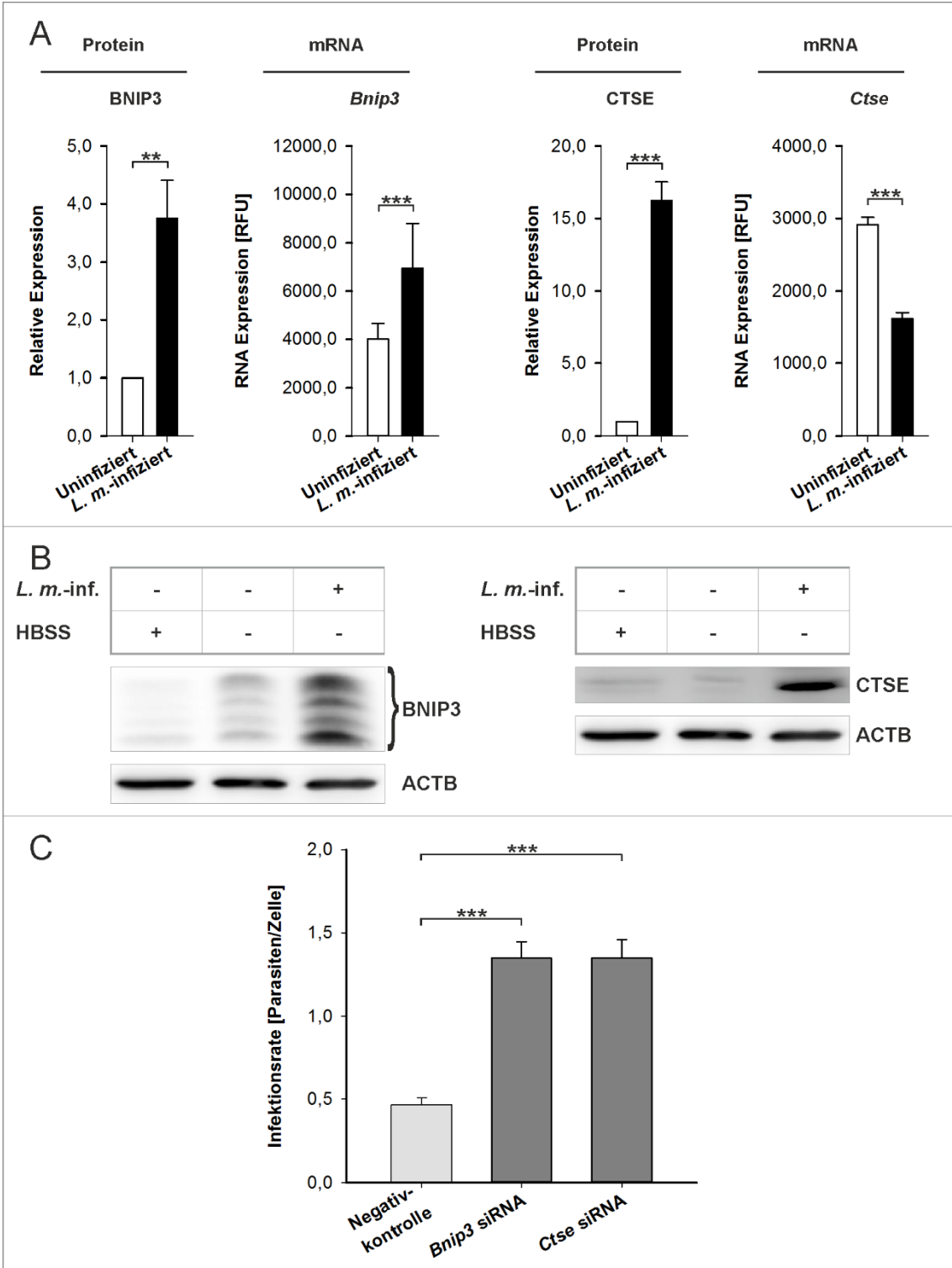
BNIP3 wurde für die genauere Untersuchung ausgewählt, da es zum einen im Zusammenhang mit MTOR-unabhängiger Autophagie beschrieben wurde [45], zum anderen aber auch, da eine direkte Interaktion zwischen BNIP3 und LC3 publiziert wurde. Zudem wurde BNIP3 im Rahmen der Xenophagy, d. h. im autophagen Verdau von Pathogenen, erwähnt [47, 48].

Es konnte gezeigt werden, dass BNIP3 in *L. m.*-infizierten BMDM nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene im Vergleich zu uninfizierten Proben (Abbildung 11A und B) signifikant hochreguliert war. Überdies hatte sich auf Proteinebene gezeigt, dass BNIP3 in Proben, welche in HBSS gehungert wurden, keine Hochregulation nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11B). In diesen Proben wurde durch die Inkubation

im Hungermedium HBSS Autophagie ausgelöst. Da in diesen Proben keine Hochregulation zu sehen war, kann man daraus schließen, dass eine Hochregulation von BNIP3 spezifisch für *L. m.*-infizierte BMDM ist. Andere autophagierelevante Proteine, wie z. B. ATG5 und UB, waren sowohl in *L. m.*-infizierten als auch in HBSS-gehungerten Proben hochreguliert (Abbildung 8B), woraus sich ableiten lässt, dass diese Proteine allgemein für die Autophagieinduktion in BMDM wichtig sind. Im nächsten Schritt wurde ein Zeitkurs für die BNIP3-Expression erstellt. In einem Zeitfenster von 0,5 h bis 24 h war zu sehen, dass die BNIP3-Expression in uninfizierten Proben auf einem niedrigen Level blieb. Im Gegensatz dazu stieg die BNIP3-Expression in *L. m.*-infizierten Proben im gleichen Zeitraum sukzessive bis 24 h nach Infektion an (Abbildung 12A und B). Die BNIP3-Expression war bei 24 h nach Infektion am höchsten, was auch für die Wichtigkeit dieses Protein für den Verdau von *L. m.* Parasiten spricht, da ab 24 h die Infektionsrate schrittweise abnimmt (Abbildung 7A).

Um die Bedeutung von BNIP3 im Verdau von *L. m.* Parasiten zu untermauern, wurden *L. m.*-infizierte BMDM 20 h nach Infektion, also zu einem Zeitpunkt an dem die BNIP3-Expression sehr hoch war, mit *Bnip3*-spezifischer siRNA transfiziert, um die Expression von BNIP3 auf Proteinebene herunterzuregulieren. Die Herunterregulation auf Proteinebene wurde mit Western-Blot-Analysen bestätigt (Abbildung S1B; siehe Anlage). Zur Kontrolle wurden *L. m.*-infizierte zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls mit einer Negativkontrolle transfiziert. 48 h nach Infektion wurden die Infektionsraten sowohl für *L. m.*-infizierte BMDM, die mit *Bnip3* siRNA transfiziert wurden, als auch für die Kontrollzellen, die mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden, bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Infektionsrate in den mit *Bnip3* siRNA transfizierten BMDM signifikant höher war, als in den Kontrollzellen (Abbildung 11C).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass BNIP3 ein wichtiges Protein für den Verdau von *L. m.* Parasiten in BMDM ist. Außerdem scheint es spezifisch für *L. m.*-infizierte BMDM zu sein.



(Abbildung 11: Legende auf der nächsten Seite)

(Abbildung auf der vorherigen Seite)

Abbildung 11: Untersuchungen zu BNIP3 und CTSE.

(A, B) Lysate von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, wurden benutzt, um Autophagie mittels BNIP3 bzw. CTSE Antikörper in Western-Blot-Analysen zu untersuchen. Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. ACTB diente bei allen Western Blots als Ladekontrolle. Zudem wurde aus *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM RNA extrahiert, welche mittels Affymetrix Microarrays hybridisiert wurde. (A) Densitometrische Auswertung von BNIP3 bzw. CTSE in *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM. (C) 20 h nach Infektion wurden *L. m.*-infizierte BMDM mit siRNA bzw. einer Negativkontrolle transfiziert und für insgesamt 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Infektionsrate bestimmt.

*L. m.*-inf. = *L. m.*-infiziert; n.s. = nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; RFU = relative Fluoreszenzeinheit.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

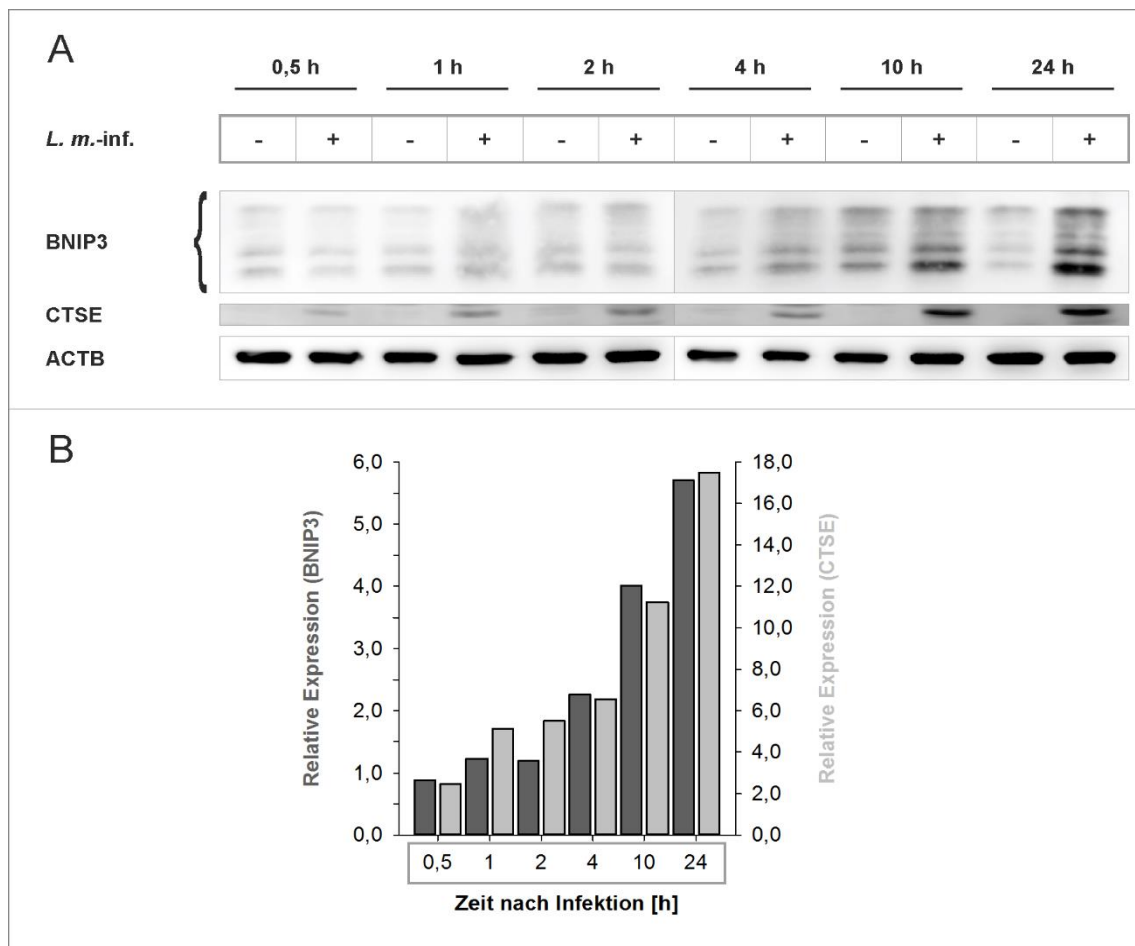


Abbildung 12: Zeitkursuntersuchung zu BNIP3 und CTSE.

(A, B) Lysate von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM wurden benutzt, um Autophagie mittels BNIP3 bzw. CTSE Antikörper in Western-Blot-Analysen in einem Zeitraum von 0,5 h bis 24 h nach Infektion zu untersuchen. ACTB diente bei allen Western Blots als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung von BNIP3 bzw. CTSE in *L. m.*-infizierten BMDM in einem Zeitraum von 0,5 h bis 24 h nach Infektion.

*L. m.*-inf. = *L. m.*-infiziert.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

### 3.6.2 Untersuchungen der Expression von CTSE

Das zweite Protein, das für die genauere Untersuchung ausgewählt worden ist, war CTSE. Bei CTSE handelt es sich um eine Aspartatprotease, die hauptsächlich in Zellen des Immunsystems, d. h. also auch in Makrophagen, vorkommt. In der Literatur wurde CTSE als wichtiges Protein für die Immunabwehr gegen eindringende Pathogene beschrieben, da es eine wichtige Rolle bei der Fusion von Autophagosom und Lysosom spielt [46]. Zudem zeigte sich, dass CTSE relevant für die Degradation von Substrat durch Lysosomen ist, indem es u. a. den sauren pH-Wert im Lysosom aufrechterhält [46, 49].

In vorliegender Studie konnte beobachtet werden, dass *Ctse* in *L. m.*-infizierten BMDM auf mRNA-Ebene signifikant herunterreguliert war, verglichen mit uninfizierten Kontrollzellen (Abbildung 11A). Um diese Herunterregulation auch auf Proteinebene zu zeigen, wurden Western-Blot-Analysen von *L. m.*-infizierten BMDM und nicht-infizierten BMDM sowie von BMDM, die in HBSS gehungert wurden, durchgeführt. Überraschenderweise zeigte sich auf Proteinebene eine signifikante Hochregulation in *L. m.*-infizierten Makrophagen im Vergleich zu uninfizierten BMDM (Abbildung 11A und B). Dieser Unterschied könnte damit erklärt werden, dass in Makrophagen ein großer Pool an *Ctse* mRNA vorhanden ist, welcher ggf. schnell translatiert werden kann, um die Degradation in den Autolysosomen zu gewährleisten. Zudem konnte beobachtet werden, dass in den Proben, in welchen Autophagie durch die Inkubation in HBSS ausgelöst wurde, kein Unterschied zu uninfizierten BMDM zu sehen war (Abbildung 11B). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei CTSE um eine infektionsspezifische Protease handelt, da CTSE nur in *L. m.*-infizierten BMDM hochreguliert ist. Um die Veränderungen von CTSE während der Infektion von Makrophagen genauer zu untersuchen, wurde ein Zeitkurs von 0,5 h bis 24 h nach Infektion durchgeführt. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei BNIP3. Es konnte ein schrittweiser Anstieg von CTSE bis 24 h nach Infektion beobachtet werden (Abbildung 12A und B). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass auch CTSE ein essenzielles Protein für den Verdau von *L. m.* Parasiten ist, da im Zeitraum von 1 h bis 24 h nach Infektion keine Änderung der Infektionsrate zu erkennen war. Erst ab 24 h nach Infektion, als die CTSE-Expression am höchsten war, zeigte sich eine sukzessive Abnahme der Infektionsrate (Abbildung 7A).

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden in einem nächsten Schritt BMDM mit *L. m.* Promastigoten infiziert und für 20 h inkubiert. Anschließend wurden die *L. m.*-infizierten BMDM mit spezifischer *Ctse* siRNA transfiziert, um die CTSE-Expression auf Proteinebene herunterzuregulieren. Zur Kontrolle wurden *L. m.*-infizierte BMDM mit einer Negativkontrolle zum gleichen Zeitpunkt transfiziert. Die Herunterregulation wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Abbildung S1B; siehe Anlage). Die Infektionsrate beider Ansätze wurde 48 h nach Infektion (s. o.) bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Infektionsrate in den mit *Ctse* siRNA transfizierten *L. m.*-infizierten BMDM verglichen mit der Kontrollprobe (Abbildung 11C).

Es kann insofern aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass es sich bei CTSE um eine infektionsspezifische Protease handelt, welche eine essenzielle Rolle für den Verdau von *L. m.* Parasiten in Makrophagen zu haben scheint.

### 3.7 Entwicklung des totalen Autophagiescores während der *L. m.* Infektion

Da die Zeitkursexperimente mit BNIP3 und CTSE einen schrittweisen Anstieg bis 24 h nach Infektion zeigten, sollte nun untersucht werden, ob dieser sukzessive Anstieg auch für den totalen Autophagiescore zutrifft. So wurden wie bei den Zeitkursexperimenten zu BNIP3 und CTSE BMDM mit *L. m.* Promastigoten infiziert und für 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 10 h und 24 h inkubiert. Uninfizierte Kontrollzellen wurden für den gleichen Zeitraum in komplettem RPMI-Medium inkubiert.

Überraschenderweise zeigte sich hier ein etwas anderes Bild als bei den BNIP3-, bzw. CTSE-Zeitkursexperimenten. Im Vergleich zwischen *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM zeigte sich ein deutlich erhöhter totaler Autophagiescore in den infizierten Proben (Abbildung 13). Viel interessanter war allerdings der Verlauf des totalen Autophagiescores in *L. m.*-infizierten BMDM. Hier zeigte sich schon bei 0,5 h ein hoher Score, welcher bis 1 h nach Infektion konstant blieb. Im weiteren Verlauf zeigte sich ein signifikanter Rückgang des totalen Autophagiescores bis 10 h nach Infektion, verglichen mit 1 h nach Infektion (Abbildung 13). Von 10 h auf 24 h nach Infektion war wieder ein signifikanter Anstieg des totalen Autophagiescores zu beobachten (Abbildung 13). Zwischen den Proben 1 h und 24 h nach Infektion war wiederum kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 13).



Auch der Verlauf des totalen Autophagiescores in uninfizierten BMDM zeigte einen interessanten Verlauf. Hier konnte man einen schrittweisen Rückgang beobachten (Abbildung 13). Dieser Rückgang des totalen Autophagiescores könnte durch den Entzug des Wachstumsfaktors M-CSF erklärt werden. M-CSF ist unerlässlich für die Differenzierung von SZ zu Makrophagen, jedoch findet nach Generation der BMDM ein Wechsel des Inkubationsmediums von M-CSF-haltigen konditionierten DMEM zu komplettem RPMI-Medium statt, welches kein M-CSF enthält. So wurde bereits in der Literatur erörtert, dass Autophagie durch M-CSF während der Differenzierung von SZ zu BMDM induziert wird und dass diese Autophagie für die Entwicklung der Makrophagen essenziell ist [50, 51].

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich resümierend konstatieren, dass bei *L. m.*-infizierten BMDM schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt, d. h. noch vor 0,5 h nach Infektion, Autophagie induziert wird. Zudem scheint die autophage Aktivität in infizierten BMDM zwischen 1 h und 24 h inhibiert zu sein, was womöglich die Differenzierung der Promastigoten zu Amastigoten gewährleisten könnte.

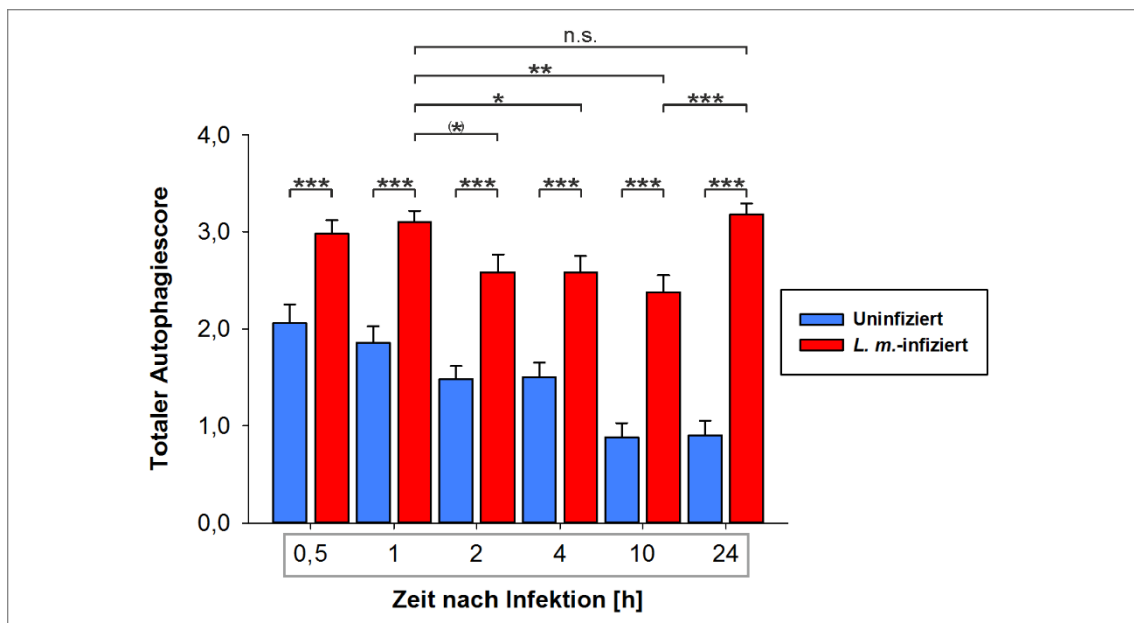


Abbildung 13: Zeitkursuntersuchung des totalen Autophagiescores. TEM-Übersichtsbilder von *L. m.*-infizierten und uninfizierten BMDM in einem Zeitraum von 0,5 h bis 24 h nach Infektion wurden mittels des totalen Autophagiescores bewertet.

n.s. = nicht signifikant; (\*)  $p \leq 0,1$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *L. m.* Parasiten durch Autophagie in Makrophagen verdaut werden können. Dies wurde durch Auswertung von TEM-Bildern mittels des neu etablierten totalen Autophagiescores, durch Untersuchungen des autophagiespezifischen Proteins LC3B sowie durch Bestimmung der Infektionsrate zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt (Abbildungen 5 und 7A). Außerdem wurden zusätzliche autophagierelevante Proteine, wie ATG5 und UB, analysiert, welche schließlich diese These der Autophagieinduktion und des anschließenden autophagen Verdaus von *L. m.* Parasiten durch BMDM bestätigten (Abbildung 8). Im bisher beschriebenen autophagen Verdau von Mikroorganismen wurden Pathogene von einer autophagen Membran umschlossen und in Autolysosomen degradiert [17]. Dies wurde u. a. schon für diverse Bakterien und Viren gezeigt [38]. Im Gegensatz dazu konnten beim autophagen Verdau von *L. m.* Parasiten keine Amastigoten in Autolysosomen oder von Phagophoren umschlossene Parasiten beobachtet werden. Daher scheint dieser autophage Verdau sich vom bisher berichteten zu unterscheiden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass MLS mit der Zellmembran von *L. m.* Amastigoten interagieren und anschließend diese wahrscheinlich penetrieren (Abbildung 9A und B; Videos 1 und 2). Nach Penetration werden dann Teile des Zytoplasmas und intrazelluläre Kompartimente von den MLS umschlungen (Abbildung 9C und D; Videos 1 und 3). Bei bereits verdauten Amastigoten konnte eine defekte Zellmembran mit MLS in unmittelbarer Nachbarschaft beobachtet werden (Abbildung 9E und F). Ein Grund für diese Art des autophagen Verdaus könnte schlichtweg die Größe der *L. m.* Parasiten sein. So sind *L. m.* Amastigoten durchschnittlich 2 – 3  $\mu\text{m}$  groß [7], wobei Bakterien im Querschnitt nur ca. 0,5  $\mu\text{m}$  [52] und Viren zwischen 0,022  $\mu\text{m}$  (Parvo-Virus B 19) und 0,3  $\mu\text{m}$  (Pocken-Virus) groß sind [53]. Im Vergleich dazu haben Autophagosomen einen Durchschnitt von ca. 0,1  $\mu\text{m}$  bis 0,9  $\mu\text{m}$  [54]. Aufgrund dieses Größenunterschieds und des damit verbundenen energetischen Aufwands zur Formation und Erhaltung solch großer Membranen könnte es sein, dass die deutlich größeren Amastigoten nicht von autophagen Membranen umschlossen werden können. Ein anderer Grund für diese Art des autophagen Verdaus könnte darin bestehen, dass aufgrund der Penetration der MLS durch die Zellmembran der Parasiten diese intakt bleibt und dadurch der Verdau der Amastigoten vom Zytoplasma der Wirtszelle separiert

wird. Damit könnte eine Antigenpräsentation an die Wirtsmakrophagen durch tote Parasiten verhindert werden. In diesem Zusammenhang wurde schon in der Literatur berichtet, dass die T-Zell-Proliferation und die Eliminierung von *L. m.* Parasiten durch Infektion mit apoptoseähnlichen *L. m.* deutlich reduziert wird [55].

Bisher wurde eine solche Art des autophagen Verdaus noch nicht beschrieben. Der genaue Mechanismus dieses Verdaus von *L. m.* Parasiten durch BMDM bleibt allerdings noch unbekannt. Möglicherweise könnte UB als Adapterprotein zwischen MLS und Zellmembran der Amastigoten fungieren und somit die Penetration der MLS ermöglichen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die signifikant erhöhte Infektionsrate in *L. m.*-infizierten BMDM sein, nachdem die UB-Expression mittels spezifischer siRNA herunterreguliert worden ist (Abbildung 8C). Eine Ubiquitinierung von intrazellulären Erregern, bevor diese in Autolysosomen degradiert werden, wurde für diverse Pathogene beschrieben [36, 37]. Auch die genaue Herkunft der MLS und ihre exakte Funktion bleiben bisher nicht vollständig geklärt.

Da die Penetration der leishmanialen Zellmembran durch MLS wahrscheinlich der entscheidende Schritt beim hier untersuchten autophagen Verdau ist, wurde auch die bisherige Literatur über MLS analysiert. Zum ersten Mal wurden MLS von Armstrong und Hart im Jahr 1971 als Myelinfiguren (englisch: *myelin figure[s]*) im Zusammenhang mit beschädigten Mykobakterien beschrieben (Abbildung 14F) [56]. Zu diesem Zeitpunkt wurden Myelinfiguren noch nicht mit Autophagie konnektiert. Später wurden diese Strukturen im Zusammenhang mit Autophagie als MLS (Abbildung 14A und B) [25], multilamellare Körper (englisch: *multilamellar bodies*) (Abbildung 14C) [29], Myelinfiguren (englisch: *myelin figures*) (Abbildung 14D) [28] und myelinähnliche Figuren (englisch: *myelin-like figures*) (Abbildung 14E) [18] beschrieben. In letzterer Publikation wurde sogar gezeigt, dass diese Strukturen Mykobakterien enthalten [18]. Andere Autoren gehen noch einen Schritt weiter und beschreiben diese Strukturen als autophagische Vakuolen (englisch: *autophagic vacuole[s]*) (Abbildung 14G) [57] oder als Autophagosomen (englisch: *autophagosome[s]*) (Abbildung 14H) [58], bzw. stellen MLS als charakteristisch für Autophagosomen dar (Abbildung 14B). Somit besteht zwar ein deutlicher Zusammenhang zwischen Autophagie und MLS, wobei ihre exakte Herkunft in weiteren und aufwendigen Studien in Zukunft genau untersucht werden sollte.

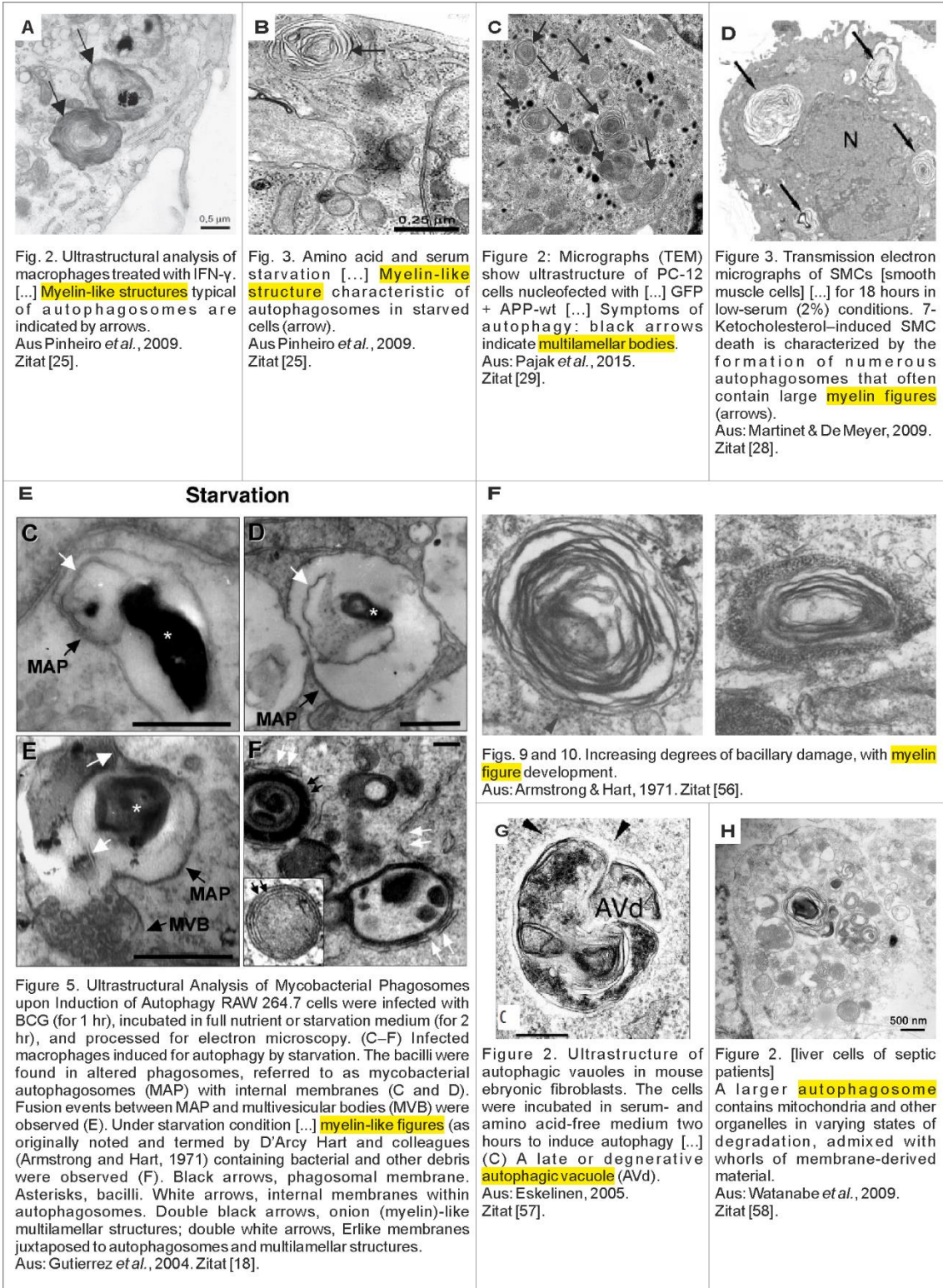


Abbildung 14: Literaturübersicht zu MLS.

(A – H) Auswahl an verschiedenen Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen MLS und Autophagie beschreiben. In der Abbildung sind die Originalabbildungen mit Legenden aus der jeweiligen Publikation dargestellt.

Der beobachtete Verdau von *L. m.* Parasiten durch BMDM, welche aus BALB/c-Mäusen generiert worden sind, konnte bisher noch nie belegt werden. In der Literatur gelten BALB/c-Mäuse eigentlich als suszeptibel für *L. m.* Infektionen [59]. Dennoch zeigte sich in dieser Arbeit ein signifikanter Rückgang der Infektionsrate in BMDM *in vitro* (Abbildung 7A). Dieses Ergebnis steht jedoch nicht unmittelbar im Gegensatz zu bisher beschriebenen Suszeptibilität von BALB/c-Mäuse für *L. m.* Infektionen, sondern es zeigt vielmehr die eigentliche Komplexität der Autophagieregulation.

So wird die Autophagie in Makrophagen u. a. durch die Zytokine Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Interleukin (IL)-4 reguliert. Dabei bewirkt INF- $\gamma$  eine Autophagieinduktion, wogegen IL-4 zur Inhibierung der Autophagie führt [60]. Aufgrund dieser Regulationsmechanismen haben Makrophagen zwar *in vitro* die Fähigkeit *L. m.* Parasiten zu verdauen, aber durch das Zusammenspiel mit anderen Zellen des Immunsystems, z. B. DCs oder T-Zellen, könnten Makrophagen *in vivo* am Verdau von *L. m.* Parasiten gehindert werden. So können T-Helfer(Th)-Zellen nach Antigenpräsentation durch DCs oder Makrophagen sowohl INF- $\gamma$  als auch IL-4 sezernieren [59]. Bei BALB/c-Mäusen kommt es während der Infektion von *L. m.* zu einer starken Th2-Immunantwort und damit verbunden zu einer Sezernierung von Th2-Zytokinen, wie IL-4, was zu einer Inhibierung der Autophagie und folglich auch zum Überleben der *L. m.* Parasiten führt [59, 60]. Diese Regulationsmechanismen würden wiederum die Suszeptibilität von BALB/c-Mäusen erklären. Im Gegensatz dazu kommt es bei C57BL/6-Mäusen, welche als resistent gegen *L. m.* Infektionen gelten [59], während einer *L. m.* Infektion zu einer überwiegend Th1 vermittelten Immunantwort [59] und damit zur Ausschüttung von INF- $\gamma$ , wodurch Autophagie in Makrophagen induziert wird, und somit die Resistenz dieses Mausstamms gegen *L. m.* Infektionen erklärt werden könnte.

Dieses Ergebnis, dass BMDM von *L. m.* suszeptiblen BALB/c-Mäusen prinzipiell in der Lage sind, *L. m.* Parasiten zu verdauen, könnte für zukünftige antileishmaniale Therapien genutzt werden. So könnte versucht werden, dass gezielt in Makrophagen Autophagie ausgelöst wird, was einen Rückgang der Infektionsrate zur Folge haben sollte.

Durch Transkriptomanalysen von *L. m.*-infizierten BMDM konnten mithilfe von Affymetrix Microarrays BNIP3 und CTSE als autophagierelevante und für die *L. m.* Infektion spezifische Proteine identifiziert werden. Dadurch wurden mit diesen Proteinen zwei

neue potenzielle Ansatzpunkte für die Entwicklung möglicher zukünftiger antileishmanialer Medikamenten gefunden. Mit diesem Wissen könnten Therapeutika entwickelt werden, welche gezielt diese Proteine in den infizierten Zellen hochregulieren, was zu einem Rückgang der *L. m.* Parasiten führen sollte – und damit auch zu einer erfolgreichen Therapie der Infektion. Eine Möglichkeit der gezielten Regulation von Genen und den damit verbunden Proteinen bietet der Einsatz von microRNA (miRNA). So werden derzeit diverse miRNAs als mögliche Therapieoption bei verschiedenen Erkrankungen erforscht oder sogar schon in klinischen Studien getestet [61-63]. Es befindet sich sogar schon eine miRNA-basierte Therapie für die chronische Hepatitis C in der Phase 2a. Hier konnte in der Gruppe, die mit miRNA behandelt wurden, eine deutliche Reduktion des Hepatitis C Virus gezeigt werden [64]. Sowohl für BNIP3 als auch für CTSE konnte eine Regulation durch miRNA gezeigt werden [65, 66]. So wurde in der Literatur beschrieben, dass die BNIP3 Proteinexpression durch miR-210 unterdrückt wird [65]. In Anlehnung an dieses Ergebnis konnte beobachtet werden, dass die Behandlung von *L. m.*-infizierten BMDM mit einem Inhibitor für miR-210 zu einem signifikanten Rückgang der Infektionsrate in BMDM führte [7]. Ein ähnliches Szenario konnte auch für CTSE gezeigt werden. Es wurde in diesem Kontext beschrieben, dass miR-129-5p indirekt die Regulation von CTSE beeinflussen könnte [66, 67]. Zudem wurde gezeigt, dass die Behandlung von *L. m.*-infizierten BMDM mit exogener miR-129-5p miRNA zu einem signifikanten Rückgang der Infektionsrate in BMDM führte [7]. Dieser Ansatz bietet in Zukunft vielversprechende Möglichkeiten für die Entwicklung neuer antileishmanialer Therapien. Zudem sind bei Leishmanien keine RNA-Interferenzen bekannt, zumindest bei *L. m.* und *L. donovani* nicht [68]. Da dieser Mechanismus jedoch beim Menschen vorkommt, könnte dies ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine nebenwirkungsarme Therapie der Leishmaniose sein.

Zeitkursuntersuchungen in *L. m.*-infizierten BMDM zu BNIP3 und CTSE zeigten einen stufenweisen Anstieg der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf bis 24 h nach Infektion (Abbildung 12). Dagegen zeigte eine Zeitkursuntersuchung in *L. m.*-infizierten BMDM zu den gleichen Zeitpunkten für den totalen Autophagiescore ein etwas anderes Bild (Abbildung 13). Der totale Autophagiescore zeigte schon in der sehr frühen Infektionsphase (0,5 h und 1 h nach Infektion) einen hohen Score an (Abbildung 13). Danach fiel der Score zwischen 2 h und 10 h signifikant ab, wobei er bei 24 h nach Infektion

wieder einen vergleichbar hohen Score wie bei 1 h nach Infektion erreichte (Abbildung 13). Dieser Rückgang des totalen Autophagiescores könnte mit einer Inhibierung des Proteins MTOR, einem zentralen Regulator der Autophagie [31], verbunden sein. Wenn Autophagie induziert wird, z. B. bei einem Mangel an Nährstoffen, bei zellulärem Stress oder pharmakologisch (z. B. durch Rapamycin), liegt MTOR in phosphorylierter Form vor. In diesem Zustand kann es seine Funktion als Kinase nicht ausführen, um untergeordnete Proteine zu phosphorylieren und damit zu inhibieren. Somit wird bei phosphoryliertem MTOR die autophagische Maschinerie in Gang gesetzt [69]. Hingegen liegt bei genügend Nahrungsangebot MTOR in nicht-phosphorylierter Form vor, wodurch untergeordnete Proteine phosphoryliert werden und somit Autophagie gehemmt wird [69]. So konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass bei *L. m.*-infizierten BMDM in der frühen Phase (1 h nach Infektion) MTOR hyperphosphoryliert ist, was eine Inhibierung des autophagen Flux zur Folge hat [7]. Durch zusätzliche Untersuchungen zu *L. m.*-infizierten BMDM, welche mit *Mtor* siRNA transfiziert wurden, konnte in besagter Studie gezeigt werden, dass eine Herunterregulation der MTOR-Expression in der frühen Infektionsphase, wodurch Autophagie induziert wird, zu einer signifikanten Reduktion der Infektionsrate geführt hat [7]. In der gleichen Studie ist ebenfalls gezeigt worden, dass bei 24 h nach *L. m.* Infektion keine Hyperphosphorylierung von MTOR mehr vorliegt. Hierdurch könnte auch der Rückgang des totalen Autophagiescores zwischen 1 h und 24 h nach Infektion erklärt werden. Während dieser Zeit kommt es auch zu keiner signifikanten Veränderung der Infektionsrate (Abbildung 7A). Denn erst ab 24 h nach Infektion, wenn der totale Autophagiescore wieder einen hohen Wert erreicht hat, kommt es schrittweise zu einer signifikanten Abnahme der Infektionsrate (Abbildung 7A). Die Hemmung der Autophagie zwischen 1 h und 24 h nach Infektion über eine Hyperphosphorylierung von MTOR könnte durch den Parasiten induziert sein, um einen ausreichenden Schutz vor autophagem Verdau zu gewährleisten, da in diesem Zeitraum eine Differenzierung von *L. m.* Promastigoten zu Amastigoten stattfindet (Abbildung 7B).

Die mithilfe von Affymetrix-Microarray-Analysen gewonnenen Daten bzw. die daraus resultierenden, regulierten Gene konnten mit den Daten aus dem AIN verglichen werden. Das AIN, welches zuvor von Behrends *et al.* veröffentlicht worden ist [39], besteht aus einem Netzwerk und verschiedenen Subnetzwerken mit möglichen Proteininteraktionen, welche für die Regulation der Autophagie verantwortlich sind. Aus dem Vergleich der

AIN-Daten mit den Ergebnissen aus den Affymetrix-Microarray-Analysen konnte ein neues Netzwerk erstellt werden, welches in Anlehnung an das AIN als LISA bezeichnet wurde. LISA besteht aus verschiedenen Genen, die potenziell an der Autophagieregulation in *L. m.*-infizierten BMDM beteiligt sind. So könnte jedes der 28 in LISA enthaltenen Gene ein möglicher neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung zukünftiger antileishmanialer Medikamente sein. Jedoch braucht es noch weitere und ausführlichere Untersuchungen, um dieses Ergebnis in Zukunft therapeutisch nutzbar zu machen.

Neben den in LISA enthaltenen Genen waren in den Affymetrix-Microarray-Analysen noch weitere Gene der Glykolyse signifikant reguliert (Tabellen 11 und 12). Diese waren Aldolase C (englisch: *aldolase c*, *Aldoc*), Enolase 2 (englisch: *enolase 2*, *Eno2*), Phosphoglyceratmutase 1 (englisch: *phosphoglycerate mutase 1*, *Pgam1*) und Triosephosphatisomerase 1 (englisch: *triosephosphate isomerase 1*, *Tpi1*). Dieses Ergebnis bestätigte die Untersuchungen zum Transkriptom *L. m.*-infizierter Makrophagen durch Rabhi *et al.* [70]. Auch hier zeigte sich eine Hochregulation der Gene der Glykolyse. Die Autoren beschreiben, dass eine Hochregulation der Glykolyse eine Reaktion der Wirtsmakrophagen auf die Infektion mit *L. m.* sei [70]. Zudem wurde gezeigt, dass in aktivierten Makrophagen die Glykolyse essenziell für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen ist, wie z. B. des Tumornekrosefaktors (TNF) und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species*, ROS), welche zur mikrobioziden Aktivität der Makrophagen beitragen. Des Weiteren wurde der Hypoxie-induzierte Faktor 1 alpha (HIF1A) als möglicher Regulator der Glykolyse in aktivierten Makrophagen beschrieben [71]. Dieser Transkriptionsfaktor wurde auch schon als Regulator für BNIP3 charakterisiert [45], womit wieder eine Verbindung zwischen Autophagie und Glykolyse hergestellt werden kann.

Aus dieser Erkenntnis könnte ein neuer Ansatzpunkt für eine mögliche Regulation von Autophagie und Glykolyse entstehen und damit verbunden die Entwicklung neuer antileishmanialer Medikamente.



## 5 Zusammenfassung

Die von der WHO zu den 17 wichtigsten NTDs gezählte Leishmaniose wird durch intrazelluläre Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen. Der Lebenszyklus der Parasiten besteht aus zwei Phasen. Die länglichen und beweglichen Promastigoten kennzeichnen die Phase in der Sandmücke – der Vektor der Leishmaniose. Hingegen ist die Phase im Säugerwirt durch runde unbewegliche Amastigoten charakterisiert. Aufgrund des Mangels an potenten antileishmanialen Therapien wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen *L. m.* Parasiten und der Hauptwirtszelle, der Makrophage, v. a. in Hinblick auf autophagische Prozesse in den infizierten Makrophagen näher untersucht, um demgemäß neue Erkenntnisse zu gewinnen, welche bei der Herstellung zukünftiger antileishmanialer Medikamente helfen könnten.

Bei der Autophagie handelt es sich um einen katabolen Prozess, wodurch Zellen bei Nahrungsmangel oder zellulärem Stress ihre Homöostase erhalten können. Durch diesen Prozess können überflüssige oder beschädigte Organellen recycelt werden, um die Funktionen der Zelle aufrechtzuerhalten. Daneben übernimmt Autophagie auch eine essenzielle Rolle bei der Abwehr von ins Zytosol eindringenden Pathogenen.

Mittels des neu etablierten totalen Autophagiescore konnte festgestellt werden, dass Autophagie in *L. m.*-infizierten BMDM induziert wird. Die intrazellulären Amastigoten werden durch Autophagie in den BMDM verdaut. Die erhöhte autophagische Aktivität konnte zudem durch Western-Blot-Analysen der autophagierelevanten Proteine ATG5, LC3B und UB bestätigt werden. Die molekulargenetischen Untersuchungen von *L. m.*-infizierten BMDM mithilfe von Affymetrix Microarrays führten zu einem Netzwerk aus autophagierelevanten und infektionsspezifischen Genen, welches als LISA bezeichnet worden ist. Hier hat sich ebenfalls eine starke Verknüpfung von autophagierelevanten Genen und den Genen der Glykolyse, einem zweiten katabolen Prozess, gezeigt. Zudem konnten zwei weitere autophagierelevante und infektionsspezifische Gene außerhalb von LISA identifiziert werden, nämlich *Bnip3* und *Ctse*, welche im Anschluss genauer untersucht worden sind. Bei beiden Genen konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass sie in *L. m.*-infizierten BMDM signifikant erhöht sind. Durch siRNA-Analysen konnte überdies beobachtet werden, dass beide für die erfolgreiche Elimination der Amastigoten essenziell sind.

Somit konnte mit den Proteinen BNIP3 und CTSE zwei potenzielle neue Ansatzpunkte für mögliche zukünftige antileishmaniale Therapien gefunden werden. Auch die in LISA enthaltenen Gene stellen prinzipiell vielversprechende Ziele für künftige Medikamente gegen Leishmaniose dar. Durch all diese Untersuchungen kommt man dem Ziel einer neuen, gezielten und nebenwirkungsärmeren Behandlung der Leishmaniose einen Schritt näher.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ-	Mikro- (= 10 <sup>-6</sup> )
%	Prozent
× g	×-fache Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s <sup>2</sup> )
2-ME	2-Mercaptoethanol
A	Ampere
ACTB	β-Aktin
AIN	Autophagy Interaction Network
<i>Aldoa</i>	Aldolase A; englisch: <i>aldolase a</i>
<i>Aldoc</i>	Aldolase C; englisch: <i>aldolase c</i>
Aqua dest.	entionisiertes Wasser; lateinisch: <i>aqua destillata</i>
ATG5, <i>Atg5</i>	Autophagy-related 5
ATG12	Autophagy-related 12
ATG16	Autophagy-related 16
Baf A1	Bafilomycin A1
BMDM	Knochenmarksmakrophage(n); englisch: <i>bone marrow-derived macrophage(s)</i>
BNIP3, <i>Bnip3</i>	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BSA	Bovines Serumalbumin
c-	Zenti- (= 10 <sup>-2</sup> )
cDNA	komplementäre DNA; englisch: <i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTSE, <i>Ctse</i>	Cathepsin E
d. h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle(n); englisch: <i>dendritic cell(s)</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

<i>Dram1</i>	DNA-damage regulated autophagy modulator 1
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>Eno2</i>	Enolase 2; englisch: <i>enolase 2</i>
<i>et al.</i>	und andere; lateinisch: <i>et alii</i>
FCS	Fötale Kälberserum; englisch: <i>fetal calf serum</i>
<i>Fus</i>	Fused in sarcoma
g	Gramm
G	Gauge
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; englisch: <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperanzinyl]-ethansulfonsäure
HIF1A	Hypoxie-induzierender Faktor 1 alpha
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase; englisch: <i>horseradish peroxidase</i>
<i>Hsp90aa1</i>	Hitzeschockprotein 90 kDa alpha; englisch: <i>heat shock protein 90 kDa alpha</i>
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>L. m.</i>	<i>Leishmania major</i>
LC3B, <i>Lc3b</i> (= MAP1LC3B, <i>Map1lc3b</i> )	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
LISA	<i>Leishmania</i> Infection Subset of AIN

m	Meter
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m-	Milli- (= 10 <sup>-3</sup> )
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor; englisch: <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
MLS	myelinähnliche Struktur(en); englisch: <i>myelin-like structure(s)</i>
mRNA	Boten-RNA; englisch: <i>messenger RNA</i>
MTOR	mechanistic Target of Rapamycin
n	Stichprobe
n-	Nano- (= 10 <sup>-9</sup> )
NTD	vernachlässigte Tropenkrankheit; englisch: <i>neglected tropical disease</i> ,
<i>Optn</i>	Optineurin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese; englisch: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung; englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
<i>Pgam1</i>	Phosphoglyceratmutase 1; englisch: <i>phosphoglycerate mutase 1</i>
<i>Prkag2</i>	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit(en); englisch: <i>relative fluorescence unit(s)</i>
RIN	RNA-Integritätszahl; englisch: <i>RNA integrity number</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies; englisch: <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)

s.	siehe
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat; englisch: sodium dodecyl sulfate
SFB	Sonderforschungsbereich
siRNA	kleine eingreifende RNA; englisch: <i>small interfering RNA</i>
<i>Stx5a</i>	Syntaxin 5A
SZ	Stammzelle(n)
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung/Tween20; englisch: <i>TRIS buffered saline/Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure; englisch: <i>trichloroacetic acid</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>Tpi1</i>	Triosephosphatisomerase 1; englisch: <i>triosephosphate isomerase 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UB, <i>Ub</i>	Ubiquitin
V	Volt
v. a.	vor allem
<i>Vps41</i>	Vacuolar protein sorting 41
WHO	Weltgesundheitsorganisation; englisch: <i>World Health Organization</i>
z. B.	zum Beispiel
<i>Zcchc11</i>	Zinc finger CCHC domain containing 11

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ignatius R., Liesenfeld O.: **Protozoen**. In: Hahn H., Kaufmann S. E., Schulz T. *et al.* (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2009: 645-671.
2. Wikipedia-Autoren: **William Boog Leishman**. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Stand: 06/2014. [https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=William Boog Leishman&oldid=131009008](https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=William_Boog_Leishman&oldid=131009008) (abgerufen am 27.07.2015).
3. World Health Organization: **Neglected tropical diseases**. Stand: 07/2015. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/) (abgerufen am 28.07.2015).
4. World Health Organization: **Leishmaniasis - Fact sheet N°375**. Stand: 02/2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (abgerufen am 28.07.2015).
5. Schurigt U., Masic A., Moll H.: **Interaction of *Leishmania* parasites with host cells and its functional consequences**. In: Jäger T., Koch O., Flohé L. (Hrsg.). *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013: 103-119.
6. Rittig M. G., Bogdan C.: ***Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views**. *Parasitol Today* 2000, **16**(7): 292-297.
7. Frank B., Marcu A., de Oliveira Almeida Petersen A. L. *et al.*: **Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210**. *Parasit Vectors* 2015, **8**(1): 404.
8. Marcu A.: **Establishment of western blot analyses of autophagy-inducing genes in *L. major*-infected bone marrow-derived macrophages**. *Bachelorarbeit*. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität; 2013.
9. de Menezes J. P., Guedes C. E., Petersen A. L. *et al.*: **Advances in development of new treatment for Leishmaniasis**. *Biomed Res Int* 2015, **2015**: 815023.
10. Wikipedia-Autoren: **Autophagozytose**. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie Stand: 02/2015. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Autophagozytose&oldid=138661999> (abgerufen am 29.07.2015).
11. Feng Y., He D., Yao Z. *et al.*: **The machinery of macroautophagy**. *Cell Res* 2014, **24**(1): 24-41.
12. Klionsky D. J., Abdalla F. C., Abeliovich H. *et al.*: **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy**. *Autophagy* 2012, **8**(4): 445-544.
13. Parzych K. R., Klionsky D. J.: **An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation**. *Antioxid Redox Signal* 2014, **20**(3): 460-473.
14. Deretic V.: **Autophagy in infection**. *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(2): 252-262.

15. Klionsky D. J., Eskelinen E. L., Deretic V.: **Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused.** *Autophagy* 2014, **10**(4): 549-551.
16. Deretic V., Kimura T., Timmins G. *et al.*: **Immunologic manifestations of autophagy.** *J Clin Invest* 2015, **125**(1): 75-84.
17. Deretic V.: **Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes.** *Immunol Rev* 2011, **240**(1): 92-104.
18. Gutierrez M. G., Master S. S., Singh S. B. *et al.*: **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages.** *Cell* 2004, **119**(6): 753-766.
19. Sin J., Mangale V., Thienphrapa W. *et al.*: **Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis.** *Virology* 2015, **484**: 288-304.
20. Bill & Melinda Gates Foundation (2015): **Neglected Infectious Diseases - Strategy Overview.** Stand: 2015. <http://www.gatesfoundation.org/What-We-Do/Global-Health/Neglected-Infectious-Diseases> (abgerufen am 28.07.2015).
21. Diaz R., Luengo-Arratta S. A., Seixas J. D. *et al.*: **Identification and characterization of hundreds of potent and selective inhibitors of *Trypanosoma brucei* growth from a kinase-targeted library screening campaign.** *PLoS Negl Trop Dis* 2014, **8**(10): e3253.
22. Bringmann G., Thomale K., Bischof S. *et al.*: **A novel *Leishmania major* amastigote assay in 96-well format for rapid drug screening and its use for discovery and evaluation of a new class of leishmanicidal quinolinium salts** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**: 3003-3011.
23. Solbach W., Forberg K., Rollinghoff M.: **Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in *Leishmania major*-infected, genetically susceptible BALB/c mice.** *Infect Immun* 1986, **54**(3): 909-912.
24. Schleicher U., Bogdan C.: **Generation, culture and flow-cytometric characterization of primary mouse macrophages.** *Methods Mol Biol* 2009, **531**: 203-224.
25. Pinheiro R. O., Nunes M. P., Pinheiro C. S. *et al.*: **Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages.** *Microbes Infect* 2009, **11**(2): 181-190.
26. Cyrino L. T., Araujo A. P., Joazeiro P. P. *et al.*: **In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages.** *Tissue Cell* 2012, **44**(6): 401-408.
27. Mizushima N.: **Methods for monitoring autophagy.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(12): 2491-2502.
28. Martinet W., De Meyer G. R.: **Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential.** *Circ Res* 2009, **104**(3): 304-317.
29. Pajak B., Kania E., Orzechowski A.: **Nucleofection of rat pheochromocytoma PC-12 cells with human mutated beta-amyloid precursor protein gene (APP-**



- sw) leads to reduced viability, autophagy-like process, and increased expression and secretion of beta amyloid. *Biomed Res Int* 2015, **2015**: 746092.
30. Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A. *et al.*: **The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major***. *Science* 2005, **309**(5733): 436-442.
  31. Jung C. H., Ro S. H., Cao J. *et al.*: **mTOR regulation of autophagy**. *FEBS Lett* 2010, **584**(7): 1287-1295.
  32. Mizushima N., Yoshimori T.: **How to interpret LC3 immunoblotting**. *Autophagy* 2007, **3**(6): 542-545.
  33. Weiß C.: **Die Beschreibung eines Zusammenhangs**. *Basiswissen Medizinische Statistik*: Springer Berlin Heidelberg; 2010: 77-98.
  34. Barth S., Glick D., Macleod K. F.: **Autophagy: assays and artifacts**. *J Pathol* 2010, **221**(2): 117-124.
  35. Romanov J., Walczak M., Ibiricu I. *et al.*: **Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation**. *EMBO J* 2012, **31**(22): 4304-4317.
  36. Knodler L. A., Celli J.: **Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy**. *Cell Microbiol* 2011, **13**(9): 1319-1327.
  37. Yuk J. M., Yoshimori T., Jo E. K.: **Autophagy and bacterial infectious diseases**. *Exp Mol Med* 2012, **44**(2): 99-108.
  38. Deretic V., Levine B.: **Autophagy, immunity, and microbial adaptations**. *Cell Host Microbe* 2009, **5**(6): 527-549.
  39. Behrends C., Sowa M. E., Gygi S. P. *et al.*: **Network organization of the human autophagy system**. *Nature* 2010, **466**(7302): 68-76.
  40. O'Neill L. A., Hardie D. G.: **Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation**. *Nature* 2013, **493**(7432): 346-355.
  41. Boyle K. B., Randow F.: **The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity**. *Curr Opin Microbiol* 2013, **16**(3): 339-348.
  42. Renna M., Schaffner C., Winslow A. R. *et al.*: **Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex**. *J Cell Sci* 2011, **124**(Pt 3): 469-482.
  43. Heiland I., Erdmann R.: **Topogenesis of peroxisomal proteins does not require a functional cytoplasm-to-vacuole transport**. *Eur J Cell Biol* 2005, **84**(10): 799-807.
  44. Zhang X. D., Qi L., Wu J. C. *et al.*: **DRAM1 regulates autophagy flux through lysosomes**. *PLoS One* 2013, **8**(5): e63245.
  45. Zhang J., Ney P. A.: **Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy**. *Cell Death Differ* 2009, **16**(7): 939-946.
  46. Tsukuba T., Yanagawa M., Kadowaki T. *et al.*: **Cathepsin E deficiency impairs autophagic proteolysis in macrophages**. *PLoS One* 2013, **8**(12): e82415.

47. Hanna R. A., Quinsay M. N., Orogo A. M. *et al.*: **Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy.** *J Biol Chem* 2012, **287**(23): 19094-19104.
48. Ney P. A.: **Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX.** *Biochim Biophys Acta* 2015.
49. Yamamoto K., Kawakubo T., Yasukochi A. *et al.*: **Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1824**(1): 105-112.
50. Jacquel A., Obba S., Boyer L. *et al.*: **Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions.** *Blood* 2012, **119**(19): 4527-4531.
51. Jacquel A., Obba S., Solary E. *et al.*: **Proper macrophagic differentiation requires both autophagy and caspase activation.** *Autophagy* 2012, **8**(7): 1141-1143.
52. Josenhans C., Hahn H., Streeck R.: **Bakterien: Definition und Aufbau.** In: Hahn H., Kaufmann S. E., Schulz T. *et al.* (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2009: 175-185.
53. Falke D.: **Virusbegriff — Struktur — Einteilung.** In: Hahn H., Kaufmann S. E., Schulz T. *et al.* (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2009: 433-438.
54. Jin M., Klionsky D. J.: **Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes.** *FEBS Lett* 2014, **588**(15): 2457-2463.
55. Crauwels P., Bohn R., Thomas M. *et al.*: **Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination.** *Autophagy* 2015, **11**(2): 285-297.
56. Armstrong J. A., Hart P. D.: **Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes.** *J Exp Med* 1971, **134**(3 Pt 1): 713-740.
57. Eskelinen E. L.: **Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells.** *Autophagy* 2005, **1**(1): 1-10.
58. Watanabe E., Muenzer J. T., Hawkins W. G. *et al.*: **Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study.** *Lab Invest* 2009, **89**(5): 549-561.
59. Sacks D., Noben-Trauth N.: **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(11): 845-858.
60. Harris J., Master S. S., De Haro S. A. *et al.*: **Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages.** *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **128**(1-3): 37-43.
61. Dyawanapelly S., Ghodke S. B., Vishwanathan R. *et al.*: **RNA interference-based therapeutics: molecular platforms for infectious diseases.** *J Biomed Nanotechnol* 2014, **10**(9): 1998-2037.

62. Romaine S. P., Tomaszewski M., Condorelli G. *et al.*: **MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians.** *Heart* 2015, **101**(12): 921-928.
63. Diaz-Gonzalez Sdel M., Deas J., Benitez-Boijseauneau O. *et al.*: **Utility of microRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**: 374924.
64. Janssen H. L., Reesink H. W., Lawitz E. J. *et al.*: **Treatment of HCV infection by targeting microRNA.** *N Engl J Med* 2013, **368**(18): 1685-1694.
65. Wang F., Xiong L., Huang X. *et al.*: **miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells.** *Stem Cell Res* 2013, **11**(1): 657-667.
66. Zhang J., Li S., Yan Q. *et al.*: **Interferon-beta induced microRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells.** *PLoS One* 2013, **8**(12): e81366.
67. Okamoto K., Okamoto Y., Kawakubo T. *et al.*: **Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene.** *J Biochem* 2012, **151**(3): 263-272.
68. Kolev N. G., Tschudi C., Ullu E.: **RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges.** *Eukaryot Cell* 2011, **10**(9): 1156-1163.
69. Alers S., Loffler A. S., Wesselborg S. *et al.*: **Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks.** *Mol Cell Biol* 2012, **32**(1): 2-11.
70. Rabhi I., Rabhi S., Ben-Othman R. *et al.*: **Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(8): e1763.
71. Ganeshan K., Chawla A.: **Metabolic regulation of immune responses.** *Annu Rev Immunol* 2014, **32**: 609-634.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: TEM-Aufnahmen von <i>L. m.</i> Promastigoten und Amastigoten.....	3
Abbildung 2: Lebenszyklus der <i>L. m.</i> Parasiten. ....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Makroautophagie (Autophagie).....	9
Abbildung 4: TEM-Aufnahmen von <i>L. m.</i> -infizierten, autophagieinduzierten und uninfizierten BMDM. ....	37
Abbildung 5: Untersuchungen zur Autophagieinduktion in BMDM. ....	38
Abbildung 6: Korrelationsdiagramm.....	41
Abbildung 7: Entwicklung der Infektionsrate und des Nukleus-Kinetoplast-Abstands. ....	44
Abbildung 8: Untersuchungen zu ATG und UB. ....	46
Abbildung 9: Untersuchung der parasitenassoziierten MLS mittels TEM.....	49
Abbildung 10: LISA. ....	51
Abbildung 11: Untersuchungen zu BNIP3 und CTSE. ....	57
Abbildung 12: Zeitkursuntersuchung zu BNIP3 und CTSE. ....	57
Abbildung 13: Zeitkursuntersuchung des totalen Autophagiescores. ....	60
Abbildung 14: Literaturübersicht zu MLS. ....	63
Tabelle 1: Liste der verwendeten allgemeinen Chemikalien und Reagenzien.....	14
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits. ....	15
Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte.....	15
Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper. ....	16
Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 6: Liste der verwendeten siRNAs. ....	16
Tabelle 7: Liste der verwendeten Programme.....	20
Tabelle 8: Dehydrierungsschritte von Zellen zur Einbettung in Epon. ....	26
Tabelle 9: Berechnete Größen zum Korrelationsdiagramm (Abbildung 6). ....	41
Tabelle 10: Werte für Korrelationsdiagramm (Abbildung 6).....	41
Tabelle 11: Liste der in LISA enthaltenen Gene. ....	52
Tabelle 12: Regulierte Gene der Glykolyse. ....	53
Tabelle 13: Zusätzliche autophagierelevante Gene. ....	54

## 9 Anhang

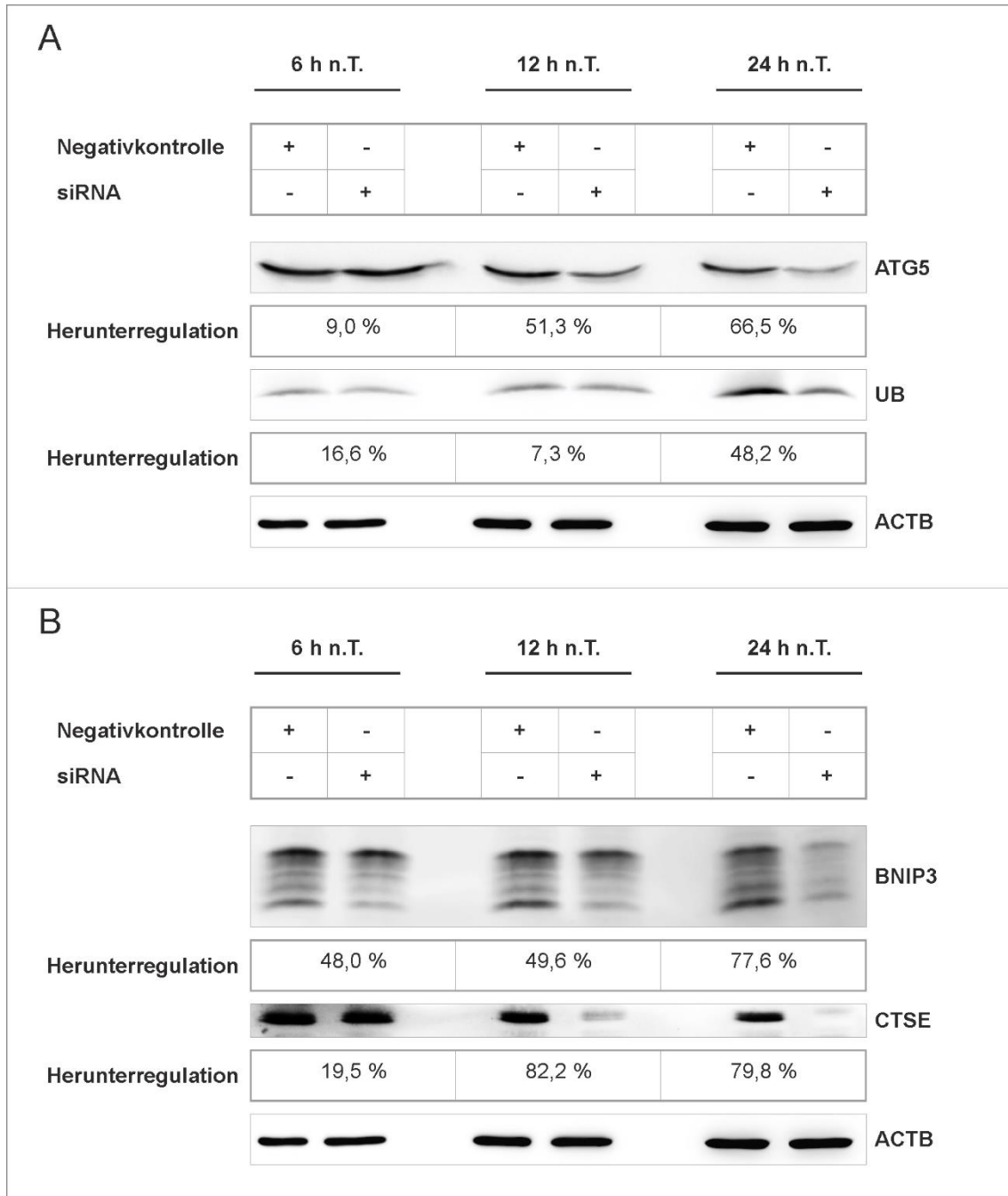


Abbildung S1: Herunterregulation von verschiedenen Proteinen durch siRNA.

(A) BMDM wurden direkt nach Generierung mit siRNA bzw. einer Negativkontrolle transfiziert. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit *L. m.* Promastigoten infiziert. 6 h, 12 h und 24 h nach Transfektion (n. T.) wurden die Proben abgeerntet und für Western-Blot-Analysen lysiert, um die Herunterregulation auf Proteinebene zu bestätigen. (B) *L. m.*-infizierte BMDM wurden 20 h nach Infektion mit siRNA bzw. einer Negativkontrolle transfiziert und für 6 h, 12 h und 24 h n. T. inkubiert. Anschließend wurden die Proben abgeerntet und für Western-Blot-Analysen lysiert, um die Herunterregulation auf Proteinebene zu bestätigen.

n. T. = nach Transfektion.

Abbildung wurde aus [7] entnommen und anschließend modifiziert.

Video 1: Lokalisation von MLS in einem beispielhaften *L. m.* Amastigoten 24 h nach Infektion: Das Elektronentomogramm zeigt die extrazelluläre (= außerhalb des Parasiten) (roter Rahmen) und die intrazelluläre (= innerhalb des Parasiten) (blauer Rahmen) Lokalisation der MLS. Vergrößerung 10 000 ×.

Link zu Video 1: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071\\_2015\\_974\\_MOESM5\\_ESM.mp4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071_2015_974_MOESM5_ESM.mp4)

Video 2: Assoziation von extrazellulären MLS mit der Membran des *L. m.* Amastigoten: Vergrößerung des roten Rahmens aus Video 1. Das vergrößerte Elektronentomogramm zeigt die nahe Assoziation zwischen extrazellulären MLS und der Zellmembran des Amastigoten (roter Pfeil). Vergrößerung 25 000 ×.

Link zu Video 2: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071\\_2015\\_974\\_MOESM6\\_ESM.mp4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071_2015_974_MOESM6_ESM.mp4)

Video 3: Interaktion zwischen intrazellulären MLS und den Mikrotubuli des Amastigoten: Vergrößerung des blauen Rahmens aus Video 1. Das vergrößerte Elektronentomogramm zeigt die Interaktion zwischen intrazellulären MLS und den Mikrotubuli des Amastigoten (blaue Pfeile). Vergrößerung 25 000 ×.

Link zu Video 3: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071\\_2015\\_974\\_MOESM7\\_ESM.mp4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521392/bin/13071_2015_974_MOESM7_ESM.mp4)

Videos wurden aus [7] entnommen.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Mai 2011 und August 2015 im Teilprojekt B3 (Projektteil Schurigt) des SFB 630 der Universität Würzburg unter wissenschaftlicher Leitung von Frau Dr. Uta Schurigt angefertigt.

Frau Dr. Schurigt möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas, ihre exzellente praktische und theoretische Anleitung während der Durchführung des praktischen Teils der Doktorarbeit sowie für die Unterstützung während der Anfertigung des Manuskripts meinen Dank aussprechen.

Frau Ana Marcu (Teilprojekt B3: Projektteil Schurigt des SFB 630) danke ich herzlich für die hervorragende Unterstützung während der praktischen Arbeit im Labor, für die zeitaufwendige Rekonstruktion der Elektronentomogramme sowie für die Anfertigung der schematischen Zeichnungen der TEM-Bilder in Abbildung 9.

Frau Martina Schultheis (Teilprojekt B3: Projektteil Schurigt des SFB 630) möchte ich für die ausgezeichnete technische Zuarbeit im Labor Dank sagen, besonders für die Kultivierung und Passage der *L. m.* Promastigoten.

Frau Bianca Röger (Teilprojekt B3: Projektteil Schurigt des SFB 630) gilt mein Dank für ihre Unterstützung bei der Generation der BMDM aus den murinen SZ.

Bei Frau Christina Daumberger (Tierstall des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie) möchte ich mich dafür bedanken, dass sie die getöteten Versuchstiere zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Microarray-Gruppe der „Core Unit SysMed“ des Universitätsklinikums Würzburg. Hier möchte ich Herrn Dr. Claus J. Scholz und Frau Dr. Heike Weber für die bioinformatische Aufbereitung und Auswertung der Microarray-Daten meinen Dank aussprechen. Zudem gilt Herrn Dr. Scholz meinen Dank für die statistische Beratung während meiner Doktorarbeit. Außerdem möchte ich Frau Margarete Göbel für die Hybridisierung der Microarrays danken.

Ich möchte auch der „Imaging Core Facility“ der Universität Würzburg Dank sagen. Hier gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Mitarbeiterinnen Frau Daniela Bunsen und Frau Claudia Gehrig. Die eingebetteten TEM-Proben wurden

von Frau Bunsen und Frau Gehring geschnitten und für die TEM aufbereitet. Außerdem wurde ich von beiden in die Benutzung des Transmissionselektronenmikroskops eingeführt. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Stigloher für die zeitaufwendigen Aufnahmen für die Elektronentomogramme danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei der studentischen statistischen Beratungsstelle der Universität Würzburg, v. a. Frau Dipl.-Math. Sabine Karl (damals Lehrstuhl VIII – Statistik, Institut für Mathematik), für die statische Beratung in der Anfangsphase meiner Promotion bedanken.

Zudem möchte ich mich beim SFB 630 der Universität Würzburg (Sprecher: Prof. Dr. Gerhard Bringmann) für die Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanken.