

**Charakterisierung von zwei  
stadien-spezifischen Proteinen  
des parasitischen Protozoons  
*Leishmania donovani* [ROSS, 1903]**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
- Dr. rer. nat. -  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Simone Harder**

aus Hamburg

Hamburg 2005

Gutachterin der Dissertation: Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS  
Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. M. LEIPPE  
Tag der Disputation: 15. Juli 2005

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	V
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das parasitische Protozoon <i>Leishmania</i> .....	1
1.2 Lebenszyklus des Parasiten und Immunantwort des Wirtes .....	1
1.3 Verbreitung und Krankheitsbilder der wichtigsten Leishmaniosen.....	3
1.4 Therapie von Leishmaniosen .....	5
1.5 <i>In vitro</i> -Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i> .....	5
1.6 Stadien-spezifische Proteine bei <i>Leishmania</i> .....	7
1.7 Genregulation in Kinetoplastida .....	9
1.8 Identifizierung stadien-spezifischer Proteine .....	11
1.9 Vergleichende Proteomanalysen .....	13
1.10 Zielsetzung.....	14
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Enzyme .....	15
2.1.3 Immunreagenzien .....	16
2.1.4 Oligonukleotide .....	16
2.1.5 Marker .....	17
2.1.6 Weitere Materialien .....	17
2.1.7 Geräte .....	18
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.9 Kulturmedien und Medienzusätze .....	20
2.2 Organismen und Plasmide .....	22
2.2.1 Organismen .....	22
2.2.2 Plasmide.....	22
2.3 Methoden.....	23
2.3.1 Zellkultur.....	23
2.3.2 Einfrieren von Stammkulturen .....	23
2.3.3 <i>In vitro</i> -Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i> .....	23
2.3.4 <i>In vitro</i> -Infektion von peritonealen Exsudat Zellen .....	23
2.3.5 Kultivierung von Bakterien .....	24
2.3.6 Isolierung von Nukleinsäuren.....	25
2.3.6.1 Plasmid-Mini-Präparationen.....	25
2.3.6.2 Plasmid-Maxi-Präparation .....	25
2.3.6.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>L. donovani</i> .....	25
2.3.6.4 Isolierung von RNA aus <i>L. donovani</i> .....	25
2.3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	26
2.3.7 Enzymatische Modifikationen von DNA .....	26

2.3.7.1	Restriktionsanalysen von DNA.....	26
2.3.7.2	Dephosphorylierung freier 5`-Enden von DNA .....	26
2.3.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten .....	27
2.3.7.4	Fill-in Reaktionen .....	27
2.3.7.5	Radioaktive Markierung von DNA.....	27
2.3.8	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	27
2.3.9	Reinigen und Fällern von DNA .....	28
2.3.9.1	Elution aus Agarosegelen .....	28
2.3.9.2	Reinigung von PCR-Amplifikaten .....	28
2.3.9.3	Chloroformextraktion .....	28
2.3.9.4	Fällern von Nukleinsäuren mit NaAcetat oder Isopropanol .....	28
2.3.10	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation .....	29
2.3.11	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen und Hybridisierung von DNA-Sonden .....	29
2.3.11.1	Northern Blot-Analysen .....	29
2.3.11.2	Southern Blot-Analysen .....	30
2.3.11.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	30
2.3.12	Polymerasekettenreaktion .....	30
2.3.13	Sequenzierung von DNA.....	31
2.3.14	Transfektion von <i>L. donovani</i> durch Elektroporation und Selektion rekombinanter Zellpopulationen.....	31
2.3.15	Vereinzeln von Zellpopulationen .....	32
2.3.16	Zellaufschluss von Leishmanien .....	32
2.3.16.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus <i>L. donovani</i> für die eindimensionale Gelelektrophorese .....	32
2.3.16.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus <i>L. donovani</i> für die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese .....	33
2.3.17	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung .....	33
2.3.17.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	33
2.3.17.2	Zweidimensionale (2D) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	34
2.3.18	Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) .....	36
2.3.19	Western Blot-Analysen und immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen .....	37
2.3.20	Herstellung rekombinanter <i>L. donovani</i> Proteine .....	38
2.3.20.1	Überexpression in <i>E. coli</i> .....	38
2.3.20.2	Reinigung der rekombinanten Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie .....	39
2.3.21	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford.....	39
2.3.22	Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY) .....	39
2.3.23	Bestimmung der Enzymaktivität des rekombinanten Peroxiredoxins von <i>L. donovani</i> .	40
2.3.23.1	Dialyse des rekombinanten Proteins.....	40
2.3.23.2	DNA-Nicking-Assay .....	40
2.3.23.3	Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von DTT .....	41
2.3.24	Mikroskopie .....	41
2.3.24.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	41
2.3.24.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	42

2.3.24.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	42
2.3.25	Viabilitäts-Assay.....	43
2.3.26	<i>In situ</i> -Markierung von DNA-Fragmenten.....	43
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
3.1	Proteomanalyse der <i>in vitro</i> -Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i> .....	45
3.1.1	<i>In vitro</i> -Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i> .....	45
3.1.2	Darstellung der Proteome mit Hilfe der 2D- Gelelektrophorese .....	45
3.1.3	Vergleich der Proteinmuster .....	46
3.1.4	Identifizierung der stadien-spezifischen Proteine und Analyse der Aminosäuresequenzen .....	48
3.1.5	Auswahl amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen .....	52
3.2	Das mitochondriale Peroxiredoxin von <i>L. donovani</i> ( <i>LdmPrx</i> ) .....	53
3.2.1	Klonierung des Gens und Analyse der Aminosäuresequenz.....	53
3.2.2	Genomische Organisation von <i>ldmprx</i> .....	55
3.2.3	Rekombinante Expression von <i>ldmprx</i> in <i>E. coli</i> und Antikörperproduktion.....	55
3.2.4	Enzymatische Aktivität des <i>LdmPrx</i> .....	56
3.2.4.1	DNA-Nicking Assay .....	56
3.2.4.2	Thiol-Peroxidase-Aktivität.....	57
3.2.5	Expressionsmuster von <i>ldmprx</i> .....	58
3.2.6	Intrazelluläre Lokalisierung von <i>LdmPrx</i> .....	58
3.2.7	Versuch der Generierung einer <i>Δmprx knock-out</i> Mutante .....	59
3.2.7.1	DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination .....	59
3.2.7.2	Amplifikation der 5`-und 3`-UTR .....	61
3.2.7.3	Generierung eines Ein-Allel <i>knock-out</i> des <i>mprx</i> -Gens in <i>L. major</i> .....	62
3.2.8	Überexpression von <i>ldmprx</i> in <i>L. donovani</i> .....	64
3.2.8.1	Klonierung des Vektors, Transfektion und Kontrolle der Überexpression .....	64
3.2.8.2	Auswirkung der Überexpression von <i>ldmprx</i> auf andere stadien-spezifische Proteine .....	65
3.2.8.3	Auswirkung der Überexpression von <i>ldmprx</i> auf den Schutz vor oxidativem Stress .....	66
3.2.8.4	Auswirkung der Überexpression von <i>ldmprx</i> auf die <i>in vitro</i> -Infektion von peritonealen Exsudat Zellen .....	67
3.2.8.5	Auswirkung der Überexpression von <i>ldmprx</i> auf die Fragmentierung von DNA in <i>L.</i> <i>donovani</i> nach Inkubation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	68
3.3	Die 70 kDa Untereinheit des <i>outer dynein arm docking complex</i> (ODA-DC) von <i>L. donovani</i> ( <i>LdDC2</i> ) .....	70
3.3.1	Klonierung des Gens und Analyse der Aminosäuresequenz.....	70
3.3.2	Genomische Organisation von <i>lddc2</i> .....	71
3.3.3	Rekombinante Expression von <i>lddc2</i> und Antikörperproduktion .....	73
3.3.4	Expressionsmuster von <i>lddc2</i> .....	74
3.3.5	Intrazelluläre Lokalisierung von <i>LdDC2</i> .....	74
3.3.6	Generierung einer <i>Δlddc2 knock-out</i> -Mutante .....	75
3.3.6.1	Amplifikation der 5`-und 3`-UTR und Klonierung der DNA-Konstrukte .....	75
3.3.6.2	Transfektion und Selektion rekombinanter Klone .....	75
3.3.7	Rekonstitution der <i>DLdDC2<sup>n/p</sup></i> Mutanten .....	76
3.3.8	Phänotypische Charakterisierung der <i>DLdDC2<sup>n/p</sup></i> -Mutanten .....	78

3.3.8.1	Immunfluoreszenz-Analyse .....	78
3.3.8.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen .....	79
3.3.8.3	Bestimmung der Wachstumsraten.....	79
3.3.9	Synthese amastigoten-spezifischer Proteine in <i>DLdDC2<sup>n/p</sup></i> -Mutanten.....	80
3.3.10	<i>In vitro</i> -Infektion von peritonealen Exsudat Zellen .....	81
4.	DISKUSSION .....	83
4.1	Proteomanalyse der Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i> .....	83
4.1.1	Vergleich der Proteinmuster und Identifizierung stadien-spezifischer Proteine.....	83
4.1.2	Auswahl amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen .....	85
4.2	Peroxiredoxine in Trypanosomatiden .....	87
4.2.1	Funktionen von Peroxiredoxinen in <i>Leishmania</i> und anderen Organismen .....	87
4.2.2	Analyse der Aminosäuresequenz von <i>LdmPrx</i> .....	88
4.2.3	Charakterisierung der Enzymaktivitäten von <i>LdmPrx</i> und Lokalisierung des Proteins innerhalb der Mitochondrien.....	89
4.2.4	Expression von <i>ldmprx</i> .....	89
4.2.5	Generierung einer $\Delta$ <i>mprx</i> -Mutante.....	90
4.2.6	Charakterisierung möglicher Funktionen von <i>LdmPrx in vivo</i> .....	92
4.2.6.1	Hat <i>LdmPrx</i> einen Einfluss auf andere stadien-spezifische Proteine? .....	92
4.2.6.2	Schützt Überexpression von <i>ldmprx</i> vor oxidativem Stress? .....	92
4.2.6.3	<i>LdmPrx</i> und apoptose-ähnlicher Zelltod in Leishmanien .....	93
4.3	<i>Outer dynein arm docking complex</i> .....	95
4.3.1	Analyse der Aminosäuresequenz von <i>LdDC2</i> .....	96
4.3.2	Expressionsmuster von <i>lddc2</i> .....	97
4.3.3	Generierung einer $\Delta$ <i>lddc2</i> -Mutante .....	98
4.3.4	Phänotypische Veränderungen der $\Delta$ <i>lddc2</i> -Mutanten .....	98
4.3.4.1	Morphologie und Wachstumsverhalten .....	98
4.3.4.2	Synthese amastigoten-spezifischer Proteine .....	100
4.3.4.3	<i>In vitro</i> -Infektion von peritonealen Exsudat Zellen .....	100
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	102
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	105

## Abkürzungsverzeichnis

2D-GE	zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Ampere
A. (bi)dest	Aqua (bi)destillata
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5-triphosphat
E-64	L-trans-Epoxysuccinyl-1-leucylamido-4-(guanidino)-buta
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
exp	experimentell
F	Farad
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G418	G418-Sulfat (Geneticin)
GIPL	Glykoinositolphospholipide
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
hyg	Hygromycinphosphotransferase
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFT	<i>Intraflagellar Transport</i>
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IP	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
IR	intergenische Region
k	Kilo
l	Liter

LB	Luria-Bertani
LPG	Lipophosphoglykan
M	Molar
m	milli
MALDI TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
neo	Neomycinphosphotransferase
OD	optische Dichte
ODA-DC	<i>Outer Dynein Arm Docking Complex</i>
pac	Puromycinacetyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEC	<i>Peritoneal Exsudat Cells</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFR	<i>Paraflagellar Rod</i>
Prx	Peroxiredoxin
PPG	Proteophosphoglykan
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygene Species</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	<i>Spliced Leader</i>
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratessigpuffer
t-BOOH	tetra-Butylhydroperoxid
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
theo	theoretisch
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick-End-Labeling</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-Galaktopyranosid

## 1. Einleitung

### 1.1 Das parasitische Protozoon *Leishmania*

*Leishmania* sind trypanosomatide Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida. Ein besonderes Merkmal dieser parasitischen Protozoen ist ein Gestaltwandel im Verlauf des Entwicklungszyklus, der sich über zwei Wirtstypen (Wirbeltier und Insektenvektor) erstreckt. Ein weiteres wesentliches und zudem namensgebendes Merkmal dieser Gattung ist der Kinetoplast. Hierbei handelt es sich um einen Abschnitt des langgestreckten Mitochondriums der Zelle, in dem 15% der zellulären DNA lokalisiert sind. Er liegt stets in unmittelbarer Nähe des Basalapparates der Geißel. Innerhalb der Kinetoplastida gehören die Leishmanien zur Familie der Trypanosomatidae. Weitere, für den Menschen bedeutsame Parasiten dieser Familie und den Leishmanien am nächsten verwandt, sind die Trypanosomen. Man unterscheidet hier zwischen der *Trypanosoma brucei*-Gruppe (u. a. der Erreger der Schlafkrankheit in Afrika) und *Trypanosoma cruzi*. Letztere kommen ausschließlich in Südamerika vor und sind die Erreger der Chagas-Krankheit.

Das hier untersuchte Mitglied der Gattung *Leishmania*, *Leishmania donovani*, wurde 1903 von Sir William B. Leishman und Charles Donovan, unabhängig voneinander, erstmals beschrieben und nach seinen Entdeckern benannt.

Die Infektion des Säugetierwirtes (Mensch, Hund, Nagetiere) erfolgt durch den Stich weiblicher Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia*. Eine Übertragung durch die Gattung *Phlebotomus* ist in den semiariden und Savannengebieten Europas, Asiens und Afrikas gegeben, während die Gattung *Lutzomyia* vorwiegend in den Waldgebieten Zentral- und Südamerikas beheimatet ist (Harms und Bienzle, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 1993).

Im Insektenwirt leben die Leishmanien als begeißelte, 10-15 µm lange, promastigote Zellen extrazellulär im Darmlumen. Während einer Übertragung auf den Säugetierwirt wandeln sie sich in die 2-5 µm große, amastigote Form um, die nur noch ein rudimentäres Flagellum besitzt und sich intrazellulär in den Phagolysosomen der Wirtszelle vermehrt.

### 1.2 Lebenszyklus des Parasiten und Immunantwort des Wirtes

Während einer Blutmahlzeit der Sandmücke an einem infizierten Säugetierwirt werden die amastigote Stadien enthaltenen Makrophagen aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücken erfolgt die Freisetzung der Parasiten aus ihren Wirtszellen. Innerhalb von 12-24 Stunden differenzieren sie zu prozyklischen promastigoten Formen, die sich im Darmlumen des Vektors etablieren. Die Anheftung der Parasiten an das Darmepithel erfolgt über das Hauptoberflächenmolekül Lipophosphoglykan (LPG) in Form einer gerichteten Insertion der Flagellen zwischen die Mikrovilli der Darmepithelzellen (Sacks *et al.*, 1994). Innerhalb von 5-7 Tagen differenzieren die avirulenten prozyklischen Zellen zu metazyklischen

Promastigoten. Dieser Prozess wird als Metazyklogenese bezeichnet und geht mit einer Veränderung der terminalen Zucker der LPG-Moleküle einher und führt schließlich zur Ablösung der Zellen vom Darmepithel (Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995). Diese hochvirulenten Parasiten wandern nun über den Vorderdarm in Ösophagus und Pharynx und können von dort durch Reurgitation bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke wieder übertragen werden. Nach Internalisierung durch Makrophagen im Säugetierwirt sind die Leishmanien zunächst im Phagosom lokalisiert, das im weiteren Verlauf mit Endosomen und Lysosomen zum so genannten Phagolysosom fusioniert. Im Phagosom erfolgt eine Stadiendifferenzierung der Parasiten zur amastigoten Form. Schlüsselreize für diesen Prozess sind vermutlich die Temperaturerhöhung auf 37°C und der saure pH-Wert von 5,5 im Phagolysosom. Die Umwandlung dauert, je nach Spezies, 2-5 Tage und ist mit einer Reduktion der LPG-Expression verbunden. Glykoinositolphospholipide (GIPL) stellen in diesem Stadium die Hauptoberflächenmoleküle dar (Ferguson, 1997). Die Replikation der Parasiten erfolgt bis zur Lyse ihrer Wirtszellen, die zu einer Freisetzung der Leishmanien führt. Diese können dann durch Rezeptor-vermittelte Endozytose wiederum von Wirtszellen aufgenommen und beim erneuten Biss der Sandmücke zurück in den Insektenvektor gelangen. Durch Rückdifferenzierung zum promastigoten Stadium schließt sich der Lebenszyklus.

Die amastigote Form der Leishmanien ist sehr gut an das feindliche Milieu im Säugetierwirt angepasst und hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um den abwehrenden Immunmechanismen zu entgehen. Diese bestehen einerseits aus den lytischen Effekten des Komplementsystems und andererseits aus der Aktivierung der Hauptwirtszellen der Leishmanien, den Makrophagen. Bei der Umgehung der Abwehrmechanismen scheinen die verschiedenen Glykoproteine auf der Oberfläche der Parasiten eine Rolle zu spielen. Metazyklische Promastigote weisen eine Resistenz gegen Komplement-vermittelte Lyse auf, die mit Modifikationen im LPG während der Metazyklogenese korreliert (Sacks *et al.*, 1995). Resistenz gegen komplement-vermittelte Lyse ist außerdem auf die Unfähigkeit des Membranangriffskomplexes C5b-C9, die Oberfläche der Parasiten zu durchdringen, zurückzuführen (Puentes *et al.*, 1990). Andere Oberflächenmoleküle, wie die in den metazyklischen Stadien exprimierte Serin/Threonin-Proteinkinase (LPK-1) können über eine Phosphorylierung von C3, C5 und C9 sowohl den klassischen, als auch den alternativen Komplement-Reaktionsweg inhibieren (Hermoso *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996). Die proteolytische Aktivität von GP63, einer Oberflächenmetalloproteinase, ist ebenfalls wichtig für die Resistenz gegenüber Komplement-vermittelter Lyse (Brittingham *et al.*, 1995).

Zu den Hauptabwehrmechanismen aktivierter Makrophagen gegenüber Pathogenen gehören die Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (oxidativer *burst*). Dabei erfolgt die Bildung von Superoxid ( $O_2^-$ ) über den NADPH-Oxidase-Komplex, während die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) die Synthese von Stickoxid (NO) aus L- Arginin und molekularem Sauerstoff katalysiert. LPG inhibiert die Proteinkinase C-Aktivität (McNeely and Turco, 1987), deren Aufgabe in der Einleitung des oxidativen *bursts* liegt. Es dient zudem als Rezeptor während der Makrophageninvasion und schützt gegen die initiale Immunantwort des Wirtes, indem es als Radikalfänger fungiert und offenbar eine Barriere

gegen den Angriff hydrolytischer Enzyme aus dem Lysosom der Makrophagen darstellt (Descoteaux and Turco, 1999; Sacks, 1989; Sacks *et al.*, 1994; Turco and Descoteaux, 1992). GIPL zeigen beispielsweise einen inhibierenden Einfluss auf die Expression von iNOS (Proudfoot *et al.*, 1995).

Durch die Unterdrückung des oxidativen *bursts* wurde die Überlebensrate der Parasiten um das zehnfache gesteigert (Mosser and Edelson, 1987). Ebenso ist die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>-Radikalen nach Infektion mit *L. major*, *L. donovani* oder *L. mexicana* stark reduziert (Passwell *et al.*, 1994). Antioxidantische Enzyme, wie z. B. Peroxiredoxine, sind für die Inaktivierung dieser Moleküle verantwortlich (McGonigle *et al.*, 1997; Nogoceke *et al.*, 1997).

Außerdem wurde beschrieben, dass die Infektion mit *Leishmania* zu einem Schutz der Makrophagen vor Apoptose (programmierter Zelltod) führt (Akarid *et al.*, 2004).

### 1.3 Verbreitung und Krankheitsbilder der wichtigsten Leishmaniosen

Die von Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufenen Krankheitsbilder werden unter dem Überbegriff der Leishmaniosen zusammengefasst. Die Leishmaniosen sind auf vier Kontinenten vertreten und in 88 Ländern endemisch. Sie stellen eine bedeutende parasitäre Erkrankung dar, da weltweit ca. 12 Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert sind und weitere 350 Millionen Menschen in Risikogebieten leben (WHO, World Health Report 2004, <http://www.who.int/whr/en>).

Für die meisten Krankheitssymptome wird eine durch die Proliferation der Amastigoten verursachte Lyse der Wirtszellen verantwortlich gemacht. Je nach Erreger lassen sich drei Manifestationsformen der Krankheit beim Menschen unterscheiden, deren unterschiedliche Symptome und Krankheitsverläufe auch vom Immunstatus des Wirtes abhängen. Man unterscheidet cutane, mucocutane und viscerale Leishmaniosen.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten humanpathogenen *Leishmania*-Spezies, deren geographische Verbreitung und die durch die Parasiten hervorgerufenen Krankheitsbilder dargestellt.

**Tabelle 1: Wichtige *Leishmania*-Spezies des Menschen**

Spezies	geographische Verbreitung	Krankheit
<i>L. tropica</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeerraum, Asien	cutane Hautleishmaniose
<i>L. major</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeerraum, Subsahara	cutane Hautleishmaniose
<i>L. aetiopica</i>	Äthiopien, Kenia, Sudan	diffuse cutane Hautleishmaniose
<i>L. brasiliensis</i> -Komplex	Süd- und Mittelamerika	cutane/mucocutane Leishmaniose (Espundia)
<i>L. mexicana</i> -Komplex	Mittelamerika, Venezuela und Kolumbien	cutane/diffuse cutane Leishmaniose

<i>L. donovani donovani</i>	Ostafrika, Indien, Iran, Südasien, Südsahara	viscerale Leishmaniose (Kala Azar)
<i>L. donovani infantum</i>	Mittelmeergebiet	viscerale Leishmaniose
<i>L. donovani chagasi</i>	Süd- und Mittelamerika	viscerale Leishmaniose

### Cutane Leishmaniose

Die cutane Leishmaniose stellt mit 50-75% aller Leishmaniosen-Neuinfektionen die häufigste Form der Erkrankung dar. Dabei kommt es 4-5 Wochen nach dem Stich einer infizierten Sandmücke zur Bildung eines juckenden Knotens, der sich im weiteren Verlauf zu einer ulzerierenden Läsion entwickelt. Diese heilt spontan ab, hinterlässt aber in den meisten Fällen eine eingezogene Narbe. Als Komplikationen können Superinfektionen der Wunde auftreten. Es kommt zu einer mehrjährigen Immunität gegen die auslösende Spezies.

### Diffuse cutane Leishmaniose

Durch Infektion mit *L. aetiopica* und Vertretern des *L. mexicana*-Komplexes (*L. m. mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. m. venezulensis*) kann in seltenen Fällen bei Patienten mit defizienter Immunantwort eine diffuse cutane Leishmaniose hervorgerufen werden. Dabei kommt es zur Ausbildung nicht-ulzerierender Läsionen, die sich über den ganzen Körper ausbreiten können. Diese Form der Erkrankung heilt nicht spontan und ist durch häufige Rückfälle charakterisiert.

### Mucocutane Leishmaniose (Espundia)

Als Folge einer cutanen Leishmaniose kann sich durch Erreger des *L. brasiliensis*-Komplexes (*L. b. brasiliensis*, *L. b. panamensis*, *L. b. guyanensis*) eine mucocutane Leishmaniose entwickeln. 90% der Fälle treten in Brasilien, Bolivien und Peru auf (WHO, World Health Report 2004, <http://www.who.int/whr/en>). Es kommt zur Invasion der nasopharyngealen Schleimhäute, bereits während der cutanen Leishmaniose oder aber erst Jahre später, die daraufhin nekrotisieren. Im Extremfall kann es zur Zerstörung der gesamten Schleimhäute, des Nasenseptums und des Gaumens kommen. Unbehandelt verläuft diese Erkrankungsform tödlich.

### Viscerale Leishmaniose (Kala Azar)

Die viscerale Leishmaniose ist die schwerste Form der Erkrankung. Die Hauptverbreitungsgebiete liegen in Bangladesch, Indien, Nepal, Sudan und Brasilien. Hier werden 90% aller Fälle registriert (WHO, World Health Report 2004, <http://www.who.int/whr/en>). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einem Befall der inneren Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark, der von Hepato- und Splenomegalie und einer Anämie begleitet wird. Die Inkubationszeit kann Monate bis mehrere Jahre dauern. Unbehandelt verläuft die Krankheit meist innerhalb von zwei Jahren nach Infektion tödlich. Die Mortalitätsrate behandelter Fälle liegt bei 15%. Als

Spätkomplikation kann sich das sogenannte *post Kala Azar dermal Leishmanoid* (PKDL) manifestieren. Dabei handelt es sich um Parasiten-enthaltende Hautknoten, die nicht ulzerieren, sich aber über die gesamte Körperoberfläche verteilen. Als wichtiger Punkt ist außerdem die *Leishmania*/HIV-Koinfektion zu nennen, die in Afrika und Südeuropa ein ständig wachsendes Problem darstellt. Im Mittelmeergebiet ist ausschließlich *L. d. infantum* als Erreger von sowohl cutaner als auch visceraler Leishmaniose bekannt. Bei einer Koinfektion mit HIV kommt es auf Grund der Immunsuppression immer zur Ausbildung einer visceralen Leishmaniose (Gradoni and Gramiccia, 1994).

#### 1.4 Therapie von Leishmaniosen

Als Medikamente der Wahl werden nach wie vor auf Grund nicht vorhandener adäquater Alternativen pentavalente Antimonpräparate eingesetzt. Die am häufigsten verwendeten Mittel sind Pentostam (Natriumantimonoglukonat) und Glucantim (N-Methylglucaminantimonat). Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung von Purinnukleosidtriphosphaten der Parasiten. Die Heilungsraten liegen zwar bei 95%, allerdings geht die Therapie mit zum Teil schweren Nebenwirkungen einher und kann nur stationär erfolgen. Außerdem wird sie zudem zunehmend durch Resistenzentwicklungen eingeschränkt. Bei Resistenzen wurden bislang alternativ Pentamidin-Präparate gegeben. Sie wirken auf den Kinetoplasten der Parasiten, sind aber ebenfalls mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Eine weitere Alternative stellt Amphotericin B dar, dessen Wirkung auf der Inhibierung der Ergosterol-Synthese (Bestandteil der Parasitenmembran) beruht. Neben der Applikation durch regelmäßige Infusionen wurden in den letzten Jahren auch andere, weniger toxische Verabreichungsformen getestet (liposomales Amphotericin B), die bisher aber auf Grund der extrem hohen Kosten keine Alternative zu herkömmlichen Präparaten darstellen. Ein neu entwickeltes Medikament ist Miltefosin, das auch oral verabreicht werden kann. In Indien ist dieses Medikament bereits zugelassen und zeigt gute Heilungsraten (96% bei visceraler Leishmaniose, 94% bei cutaner Leishmaniose) (Fischer *et al.*, 2001). Allerdings erzielt es nur temporäre Effekte bei HIV/*Leishmania* Koinfektionen und ist auf Grund seiner teratogenen Wirkung bei weiblichen Patienten im gebärfähigen Alter nicht einsetzbar (Bryceson, 2001).

#### 1.5 *In vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

Die Differenzierung von der promastigoten in die amastigote Form ist für das Überleben der Leishmanien in ihren verschiedenen Wirten von essentieller Bedeutung. Nur die an den jeweiligen Wirt am besten angepasste Lebensform ist in der Lage zu überleben und den Infektionskreislauf zu schließen. Wie schon in 1.2 beschrieben, geht diese Differenzierung mit umfassenden morphologischen und biochemischen Veränderungen der Parasiten einher und nur das amastigote Stadium ist für die zahlreichen klinischen Symptome der verschiedenen Leishmaniosen verantwortlich. Für die Entwicklung von

Impfstoffen und Medikamenten ist es daher wichtig, genau dieses Stadium des Parasiten zu untersuchen und zu charakterisieren. Über die molekularen Prozesse, die während der Differenzierung ablaufen, ist bisher nur wenig bekannt. Ein gutes Modell, den Transformationsprozess zu untersuchen, bietet *Leishmania donovani*. Für diesen Parasiten ist es möglich, die Stadiendifferenzierung *in vitro* auszulösen und so große Mengen amastigoter Parasiten für analytische Untersuchungen zu gewinnen (Joshi *et al.*, 1993; Saar *et al.*, 1998). Ein Vorteil dieser Methode gegenüber den anderen Möglichkeiten, amastigote Leishmanien aus infiziertem Gewebe (Glaser *et al.*, 1990) oder durch Infektionen von peritonealen Mausemakrophagen (Chang, 1980) oder Makrophagen-Zelllinien (Bates *et al.*, 1992) zu gewinnen, liegt außerdem darin, dass diese Präparationen nicht mit Wirtszellkomponenten kontaminiert sind. So können ausschließlich die Parasiten untersucht werden. Für einige *Leishmania*-Arten (z.B. *L. donovani* und *L. mexicana*) ist es bereits gelungen, durch die Anwendung verschiedener Auslösemechanismen, axenische Amastigote zu generieren (Saar *et al.*, 1998). Bisher gibt es aber über die ausschlaggebenden molekularen Marker für diese *in vitro*-differenzierten Amastigoten keinen Konsensus.

Im Folgenden soll das in dieser Arbeit verwendete System kurz dargestellt werden. Promastigote *L. donovani* werden einem Hitzeshock von 25°C auf 37°C und 24 Stunden später einer Ansäuerung des Mediums von pH 7,0 auf pH 5,5 ausgesetzt. Die Differenzierung ist unter diesen Konditionen innerhalb von 120 Stunden abgeschlossen und kann durch Kultivierung der amastigoten Zellen unter den Wachstumsbedingungen der Promastigoten (25°C, pH 7,0) umgekehrt werden. Die *in vitro*-differenzierten Amastigoten sind den aus Tiermodellen isolierten Zellen sehr ähnlich (Saar *et al.*, 1998). Sie exprimieren alle sieben Proteine der A2-Genfamilie (Charest and Matlashewski, 1994), die im weiteren Verlauf ausführlicher beschrieben werden. Die LPG-Synthese wird in diesen axenischen Amastigoten runterreguliert. McConville und Blackwell zeigten, dass die LPG-Expression in *L. donovani* stadien-spezifisch ist und somit als Marker für erfolgreiche Differenzierung verwendet werden kann (McConville and Blackwell, 1991). Bei Rückdifferenzierung in das promastigote Stadium wird nach zwei Stunden die Synthese wieder hochreguliert. Nach insgesamt sechs Stunden erreicht sie ihr ursprüngliches Niveau. Axenische Amastigote zeigen außerdem amastigoten-spezifische metabolische Aktivität bezüglich Prolin-Aufnahme und -Einbau. Optimaler Prolin-Transport erfolgt in promastigoten Zellen bei pH 7,0 (Mukkada *et al.*, 1985), wohingegen das pH-Optimum für amastigote Zellen bei pH 5,5 liegt und die Aufnahmerate zehnfach reduziert ist (Glaser and Mukkada, 1992).

Alles in allem handelt es sich bei den *in vitro*-differenzierten Amastigoten von *L. donovani* um Zellen, die den *in vivo*-generierten sehr ähnlich und somit geeignet sind, die Differenzierungsmechanismen dieses Organismus zu untersuchen.

## 1.6 Stadien-spezifische Proteine bei *Leishmania*

Ein Prozess wie die Stadiendifferenzierung der Leishmanien ist mit genregulatorischen Prozessen verbunden. Die Synthese bestimmter Proteine muss im Verlauf der Differenzierung hoch- bzw. runterreguliert werden. Im Folgenden sollen die bisher beschriebenen stadien-spezifischen Proteine und Moleküle der verschiedenen *Leishmania*-Spezies zusammengefasst werden, wobei besonders *L. donovani* Proteine berücksichtigt werden.

Das Protein ARL-3A von *L. donovani* wurde als promastigoten-spezifisch identifiziert (Cuvillier *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich um ein G-Protein, das in die Flagellum-Biosynthese involviert ist.

Ein weiteres promastigoten-spezifisches Protein, das in *L. major* charakterisiert wurde, ist der Glukosetransporter *LmGT2* (Burchmore and Landfear, 1998). *Leishmania* Amastigote transportieren wesentlich weniger Glukose als die promastigoten Zellen (Burchmore and Hart, 1995) und generieren ihre metabolische Energie hauptsächlich aus der Oxidation von Fettsäuren (Hart and Coombs, 1982).

Stadien-spezifische Expression konnte ebenfalls für das *paraflagellar rod protein 2* (PFR-2) gezeigt werden (Moore *et al.*, 1996). Das Gen ist in dreifacher Kopie im *L. mexicana* Genom vorhanden, deren Transkripte in 15-fach erhöhter Menge im promastigoten Stadium vorliegen.

Wiese und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase Kinase (*LmxMKK*) ausschließlich in *L. mexicana* Promastigoten vorhanden ist (Wiese *et al.*, 2003). Wohingegen ein *L. mexicana* MAP-Kinasen-homologes Protein amastigoten-spezifisch ist (Wiese, 1998).

GP63 bzw. Leishmanolysin ist eine Metalloproteinase, die auf der Zelloberfläche beider Stadien der Leishmanien lokalisiert ist (Button *et al.*, 1989; Frommel *et al.*, 1990; Medina-Acosta *et al.*, 1989; Medina-Acosta *et al.*, 1993). Kodiert wird GP63 von einer, durch alle bisher untersuchten *Leishmania*-Spezies hochkonservierten Multi-Genfamilie, die aus 7 Mitgliedern besteht (Button *et al.*, 1989; Medina-Acosta *et al.*, 1993). Die *gp63* Gene 1-5 werden ausschließlich in Promastigoten exprimiert, das *gp63* Gen 6 in Pro- und Amastigoten und das *gp63* Gen 7 vorwiegend in Promastigoten der stationären Wachstumsphase und Amastigoten (Voth *et al.*, 1998).

Die insgesamt 19 *cpb*-Gene von *L. mexicana* kodieren für stadien-spezifisch regulierte Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteinasen (CPB). *cpb* 1 und 2 werden vor allem in metazyklischen Promastigoten exprimiert, während *cpb* 3-19 vornehmlich in Amastigoten exprimiert werden (Mottram *et al.*, 1997). Außerdem zeigen diese Isoenzyme unterschiedliche Substratspezifitäten, was ebenfalls auf unterschiedliche Rollen der Proteine innerhalb des Parasiten schließen lässt.

Die Oberfläche promastigoter Leishmanien ist bedeckt mit einer Glykokalyx, die einen sehr hohen Anteil an glykosylierten Phosphatidylinositolen (GPI) aufweist. Einige dieser GPI-Glykolipide dienen als Membrananker für Oberflächenproteine (Bordier, 1987), wie z. B für das bereits erwähnte GP63 (Schneider *et al.*, 1990). Andere wiederum sind

nicht an Proteine gekoppelt. Diese sind die bereits erwähnten LPG (McConville *et al.*, 1987; Orlandi and Turco, 1987) und GIPL (McConville and Bacic, 1989; McConville *et al.*, 1990). LPG sind in einer sehr hohen Kopienzahl ( $6 \times 10^6$  Moleküle/Zelle) auf promastigoten *L. donovani* Zellen vorhanden, wobei die Synthese aber während des Differenzierungsprozesses runterreguliert wird (McConville and Blackwell, 1991). GIPL dagegen werden in beiden Entwicklungsstadien des Parasiten synthetisiert und sind ebenfalls in hoher Kopienzahl (ca.  $10^7$  Moleküle/Zelle) auf den Zellen vorhanden (McConville and Blackwell, 1991).

Weitere Oberflächenmoleküle der *Leishmania* Zellen sind die Proteophosphoglykane (PPG), deren verschiedene Mitglieder ebenfalls stadien-spezifisch exprimiert werden (Ilg, 2000).

Desweiteren wurde eine Stadien-Spezifität für verschiedene Adenosintransporter in *L. donovani* nachgewiesen (Ghosh and Mukherjee, 2000). Parasiten der Ordnung Kinetoplastida sind purinauxotroph und damit abhängig von der Aufnahme dieser Nukleotide aus ihren Wirten. Anders als die Promastigoten besitzen amastigote *L. donovani* zwei verschiedene Adenosintransporter. Einer ist identisch zu dem Adenosin/Pyrimidinnukleosidtransporter der Promastigoten, der andere dagegen ist spezifisch für das amastigote Stadium des Parasiten und transportiert nur Purinnukleoside.

Ein weiteres Protein, homolog zu den stark hydrophoben Molekülen der Amastin-Proteinfamilie aus *T. cruzi*, wurde als reguliert synthetisiert in *L. donovani* gefunden (Wu *et al.*, 2000). Es ist vorwiegend an der Oberfläche amastigoter Leishmanien lokalisiert.

Bei dem Hitzeschockprotein 100 (HSP100) handelt es sich ebenfalls um ein Protein, das während der Differenzierung unterschiedlich reguliert wird (Krobitsch *et al.*, 1998; Krobitsch and Clos, 1999). Es wird unter Hitzestress und während des amastigoten Stadiums von *L. donovani* synthetisiert.

Lamontagne und Papadopoulou konnten zeigen, dass die *spliced leader* (SL) RNA in *L. donovani* amastigoten-spezifisch reguliert wird (Lamontagne and Papadopoulou, 1999).

Ferner wurden die Mitglieder der A2-Proteinfamilie als amastigoten-spezifisch charakterisiert (Charest and Matlashewski, 1994; Zhang *et al.*, 1996). Die Gene liegen in multiplen Kopien im *L. donovani* Genom vor und kodieren für eine Proteinfamilie, die aus 7 Mitgliedern mit unterschiedlichen Größen, von 45 bis 100 kDa, besteht. Inhibierung der A2-Expression mittels *antisense*-RNA resultierte in A2-defizienten Amastigoten, die eine Beeinträchtigung ihrer Virulenz zeigten (Zhang and Matlashewski, 1997). Die A2-Gene sind nicht in allen *Leishmania*-Spezies vorhanden. In der nicht-visceralisierenden Form *L. major* können die Gene nicht detektiert werden (Ghedin *et al.*, 1997) und eine Expression der A2-Gene in dieser Spezies führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Parasiten in den Milzen der infizierten Mäuse (Zhang and Matlashewski, 2001). Es handelt sich bei dieser Proteinfamilie um die am besten untersuchten stadien-spezifischen Proteine von *L. donovani*, die als Marker-Proteine für das amastigote Stadium der Parasiten eingesetzt werden.

Als weiteres differentiell reguliertes Protein wurde das *L. major* Histon 1 (H1) gefunden (Noll *et al.*, 1997). Das Protein akkumuliert in den Parasiten während der Metazyklogeneese und bleibt in großen Mengen in amastigoten Zellen erhalten. Während der

Rückdifferenzierung zu Promastigoten verringert sich die Proteinmenge wieder. Diese unterschiedlichen H1-Mengen könnten einen Einfluss auf den unterschiedlichen Kondensierungsgrad des Chromatins während des Lebenszyklus von *L. major* haben.

Eine Differential Display Analyse ergab ein weiteres amastigoten-spezifisches Gen in *L. mexicana*, das VG7A5, das für einen offenen Leserahmen von 587 Aminosäuren kodiert (Liu *et al.*, 2000). Eine weitere Funktion des Proteins ist allerdings bisher noch nicht bekannt.

Bellatin und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine neue Genfamilie (A600) und ein  $\beta$ -Tubulin-Gen in *L. mexicana* Amastigoten hochreguliert werden (Bellatin *et al.*, 2002).

Während einer Proteomanalyse der Stadiendifferenzierung von *L. infantum* konnten zwei amastigoten-spezifische Proteine identifiziert werden, bei denen es sich um die Energiestoffwechsellenzyme Isocitratdehydrogenase und Triosephosphatisomerase handelt (El Fakhry *et al.*, 2002). Messungen der Enzymkinetiken zeigten außerdem erhöhte Aktivität in diesem Stadium der Parasiten.

Für *L. chagasi* wurde eine stadien-spezifische Regulation der Expression von drei Peroxiredoxinen gezeigt. *lcpxn1* wird vorwiegend während des amastigoten Stadiums exprimiert, wohingegen *LcPxn2* und 3 hauptsächlich im promastigoten Stadium vorliegen (Barr and Gedamu, 2001).

## 1.7 Genregulation in Kinetoplastida

Umfassende Veränderungen im Proteinsynthesemuster benötigen ein gut funktionierendes System, mit dem die Transkription der entsprechenden Gene reguliert wird (Clayton, 2002; Graham, 1995; Stiles *et al.*, 1999).

In höheren Eukaryoten bestehen Protein-kodierende Gene aus einer Vielzahl von aufeinander folgenden Exons (kodierende Sequenzen) und Introns (nicht-kodierende Sequenzen). Die Initiation der Transkription unterliegt der Kontrolle eines Promotors, sie startet an der so genannten Transkriptionsinitiationsstelle und erstreckt sich bis zu einem Transkriptionsterminator, dessen Sequenz sich an das entsprechende Gen anschließt. Das primäre Transkriptionsprodukt wird in mehreren Reifungsschritten an den 5´- und 3´-Enden prozessiert. Nach Anheftung der 7-Methylguanosin-Kappe erfolgt die Synthese des poly(A)-Endes. Durch Entfernen der Intron-Sequenzen entsteht die mature mRNA, ein Prozess der als *cis*-Spleißen bezeichnet wird. Jedes Gen untersteht der Kontrolle eines Promotors, der die Transkription initiiert. Durch Modulation der Promotoraktivität wird im Allgemeinen die Konzentration an Genprodukt in der Zelle determiniert. Die Kontrolle der Genexpression in höheren Eukaryoten erfolgt damit größtenteils auf transkriptioneller Ebene. Es gibt allerdings auch Mechanismen, die die Menge an Transkripten in einer Zelle während der mRNA-Biogenese (post-transkriptionelle Kontrolle) oder der Proteinproduktion (Translationskontrolle) beeinflussen.

Die hier untersuchten Organismen der Ordnung Kinetoplastida zeigen eine andere Art der Genexpression. Die Gene liegen gruppiert, mit sehr kurzen intergenischen Regionen, im Genom vor. Sie werden ausgehend von einem einzelnen 5´-Promotor in

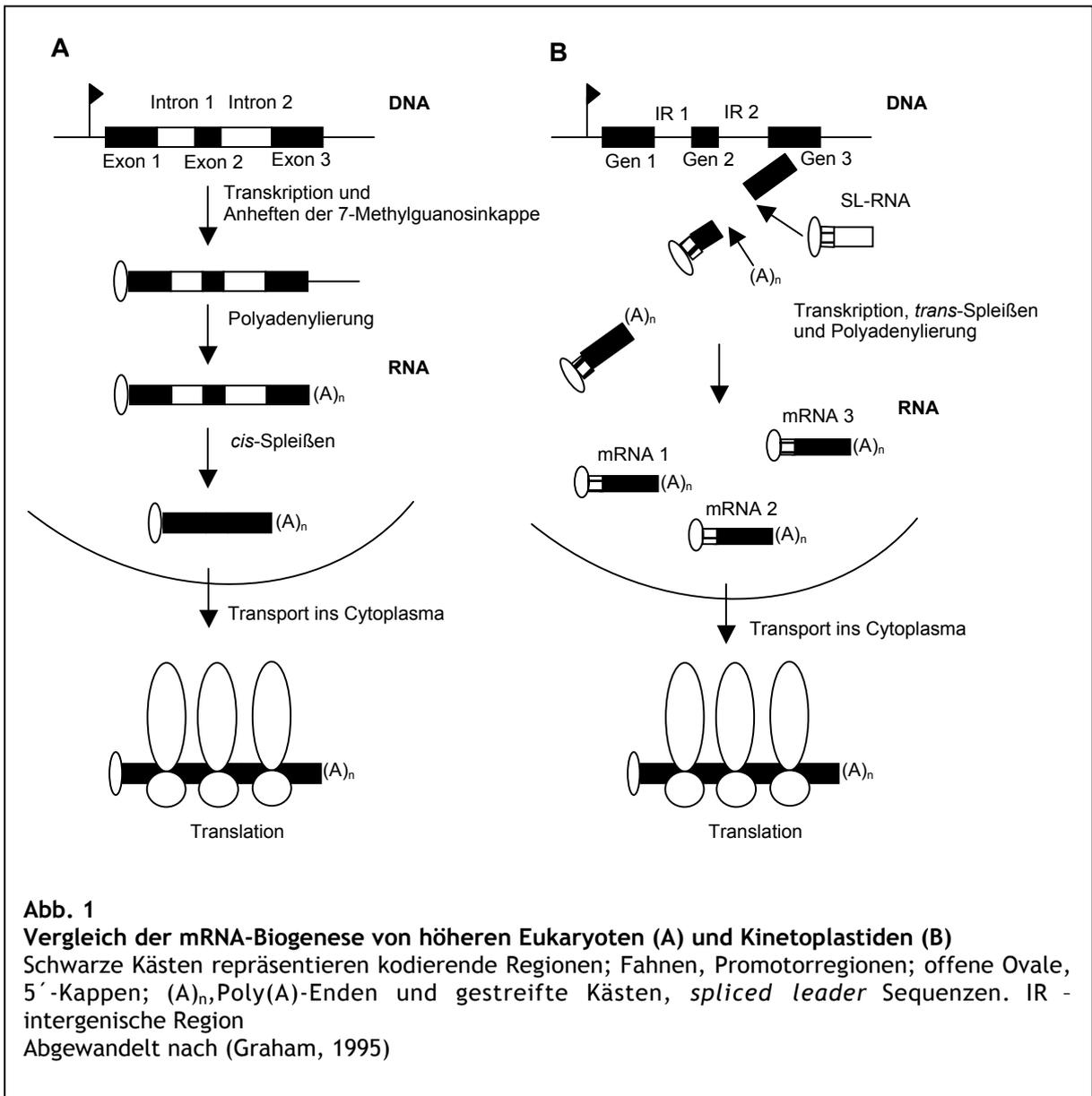
diesen so genannten polycistronischen Einheiten kotranskribiert, wobei eine polycistronische Vorläufer-RNA entsteht. Viele dieser Transkriptionseinheiten beinhalten in tandemartigen Wiederholungen angeordnete Gene, wie z. B. das bereits erwähnte *gp63*-Gen in *Leishmania* (Button *et al.*, 1989). Andere dieser Einheiten bestehen aus verwandten Genen und kodieren beispielsweise für verschiedene Isoformen eines Enzyms, wie die Gene für die Phosphoglyceratkinase in *T. brucei* (Gibson *et al.*, 1988). Wieder andere beinhalten aber auch voneinander völlig unabhängige Gene, wie z. B. der Aldolase-Genlocus in *T. brucei* (Vijayasathy *et al.*, 1990).

Die Gene der Kinetoplastiden weisen keine Introns auf und benötigen deshalb kein *cis*-Spleißen zum Generieren maturer mRNA. Stattdessen werden aus den Vorläufer-Transkripten die einzelnen mRNAs durch den Vorgang des sogenannten *trans*-Spleißens generiert (Agabian, 1990). Jede mRNA erhält ein identisches, 39 Nukleotide langes 5'-Exon (die sogenannte *spliced leader* (SL) Sequenz oder Mini-Exon), das von einem längeren, von der Transkription Protein-kodierender Gene unabhängigen RNA-Molekül (SL-RNA) abstammt. Das *trans*-Spleißen erfolgt kotranskriptionell (Ullu *et al.*, 1993) und endet mit der Polyadenylierung des 3'-Endes der mRNA (Huang and Van der Ploeg, 1991). Diese beiden Prozesse sind miteinander gekoppelt (LeBowitz *et al.*, 1993). Abbildung 1 zeigt eine Gegenüberstellung beider Arten der mRNA-Biogenese.

Bisher konnten bis auf eine Ausnahme keine RNA-Polymerase II Promotoren in Kinetoplastiden gefunden werden (Clayton, 2002). Die Transkription kann an jeder beliebigen Stelle im Genom initiiert werden. Nur die Gene für die SL-RNA haben klar identifizierbare Promotoren, worauf in diesem Zusammenhang aber nicht weiter eingegangen werden soll. Die Regulation einzelner Gene kann also nicht auf Ebene der Transkriptionsinitiation stattfinden, sondern muss auf anderen, post-transkriptionellen Mechanismen beruhen.

Es konnten bisher keine regulierenden Mechanismen auf Transkriptionsebene oder während den Vorgängen der Polyadenylierung und des *trans*-Spleißens nachgewiesen werden. Vielmehr scheinen es Sequenzen der 3'-untranslatierten Bereiche (UTR) und intergenische Regionen (IR) zu sein, die die Menge an vorhandener mRNA bestimmen (Aly *et al.*, 1994; Beetham *et al.*, 1997; Brittingham *et al.*, 2001; Burchmore and Landfear, 1998; Charest *et al.*, 1996; Coughlin *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2001; Quijada *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zilberstein and Shapira, 1994). Diese post-transkriptionelle Regulation beinhaltet die Erhöhung der Transkript-Stabilität und die Beeinflussung der Transkript-Degradation. Sie wird durch labile Proteinfaktoren und ihre Erkennungssequenzen vermittelt (Stiles *et al.*, 1999). Boucher und Mitarbeiter konnten ein 450 Nukleotide (nt) langes Sequenzmotiv identifizieren, das eine stadien-spezifische Regulation vermittelt und innerhalb vieler *Leishmania*-RNAs konserviert ist, von denen für einige bereits eine differenzielle Regulation gezeigt werden konnte (Boucher *et al.*, 2002).

Die tandemartige Anordnung der Gene könnte auch dazu beitragen, die jeweiligen Transkriptmengen zu erhöhen. Gerade in hoher Kopienzahl vorhandene Proteine wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Hitzeschockproteine, Proteasen, Transporter, Flagellenproteine und Oberflächenantigene liegen in solchen Multi-Genfamilien vor (Stiles *et al.*, 1999).



Zudem scheint eine Kontrolle auf Translationsebene sehr wahrscheinlich. Über diese Mechanismen ist bisher aber erst sehr wenig bekannt. Auch weiß man bisher nur wenig über die Auslösemechanismen solcher Differenzierungsprozesse und die Transduktionskaskaden, die diese Signale intrazellulär weiterleiten.

### 1.8 Identifizierung stadien-spezifischer Proteine

Es gibt mehrere Möglichkeiten, stadien-spezifische Proteine zu identifizieren. In der bisher am häufigsten angewandten Methode werden sogenannte cDNA-Bibliotheken nach differentiellen Produkten durchsucht. Hierbei wird die gesamte mRNA eines bestimmten Zeitpunktes der Differenzierung in cDNA überführt, die dann kloniert und mit spezifischen Proben hybridisiert werden kann. Z. B. kann eine genomische Kosmid-Bibliothek eines bestimmten *Leishmania*-Stammes mit spezifisch-markierten cDNA Proben aus

Promastigoten und Amastigoten hybridisiert werden. Der Vergleich der Intensitäten der Hybridisierungssignale ermöglicht eine Identifizierung stadien-spezifischer Gene. Durch dieses Verfahren wurden die meisten der bisher als differenziell exprimiert charakterisierten Gene identifiziert (Bellatin *et al.*, 2002; Charest and Matlashewski, 1994; Coulson and Smith, 1990; Flinn and Smith, 1992; Lamontagne and Papadopoulou, 1999; Liu *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000). Für die meisten Transkripte wurde eine zusätzliche Northern Blot-Analyse durchgeführt, um die unterschiedlichen RNA-Mengen zu bestätigen.

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede im Expressionsmuster bestimmter Gene zu untersuchen, bietet das Verfahren der *microarray*-Technologie. Dabei werden auf Objektträgern immobilisierte Nukleinsäuren mit fluoreszierenden cDNAs, hergestellt aus verschiedenen RNA-Proben, hybridisiert. Diese Technik erlaubt eine Untersuchung der Genexpression im genomischen Maßstab und wurde bereits für die verschiedensten biologischen Fragestellungen angewendet. Differenzierungsprozesse von *L. major* (Almeida *et al.*, 2002; Beverley *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2003) und *L. donovani* (Duncan *et al.*, 2004) wurden bereits mittels *microarray*-Analyse untersucht. Dabei konnten signifikante Unterschiede der Menge vorhandener mRNA für eine Vielzahl von Genen gezeigt werden. Diese Unterschiede waren allerdings im Vergleich zu anderen Studien sehr moderat und die Interpretation der Daten durch die unvollständige Annotation der Genome nur eingeschränkt möglich (Duncan, 2004).

Auf Grund der oben beschriebenen für Kinetoplastiden charakteristischen Art der Genexpression sind die Unterschiede auf mRNA-Ebene nicht so ausgeprägt wie bei anderen Organismen, bei denen die Genregulation auf Transkriptionsebene stattfindet. Es werden nur sehr geringe Unterschiede (1,2-fach bis dreifach) der Transkriptmengen als reproduzierbar publiziert, obwohl die Lebensstadien der Parasiten sehr große Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie und Biochemie aufweisen (Duncan, 2004).

Werden vor der Analyse die aktiv translatierten mRNAs angereichert, indem die an Ribosomen gebundenen Transkripte durch Zentrifugalkraft abgetrennt werden, lassen sich größere Unterschiede in der Genexpression beobachten (Avila *et al.*, 2001). Für das Metazyklogenin-Gen von *T. cruzi* wurde so gezeigt, dass nur in differenzierenden Zellen die entsprechende RNA vorhanden ist. Untersucht man die Gesamt-mRNA ist das Gen sowohl in differenzierenden als auch in proliferierenden Zellen gleichermaßen aktiv.

Ob die vorhandene mRNA-Menge allerdings die Abundanz des entsprechenden Proteins in der Zelle reflektiert, ist bisher ungeklärt und es ist daher sehr wichtig, Unterschiede auch auf Proteinebene zu zeigen. Dies konnte bisher erst für relativ wenige der als stadien-spezifisch charakterisierten Proteine gezeigt werden (Burchmore and Landfear, 1998; Charest and Matlashewski, 1994; Cuvillier *et al.*, 2000; El Fakhry *et al.*, 2002; Ghosh and Mukherjee, 2000; Handman *et al.*, 1995; Krobitch *et al.*, 1998; Noll *et al.*, 1997; Streit *et al.*, 1996; Wiese, 1998; Wiese *et al.*, 2003). Die Unterschiede beziehen sich in diesen Studien auf einen Nachweis der Proteine im Western Blot oder auf die Messung von Enzymaktivitäten.

Eine Möglichkeit, Unterschiede im Expressionsmuster einer Zelle direkt auf Proteinebene zu untersuchen, bietet die vergleichende Proteomanalyse. Diese soll im nächsten Kapitel kurz dargestellt werden.

## 1.9 Vergleichende Proteomanalysen

Die Technik der Proteomanalyse verbindet hochauflösende, zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese zur Separierung und Visualisierung von Proteinen mit massenspektrometrischen Analysen zur Identifizierung dieser Proteine. So können Unterschiede im Proteingehalt verschiedener Proben quantifiziert werden.

Die 2D-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von Proteingemischen anhand zweier Eigenschaften der in ihr enthaltenen Spezies: dem Molekulargewicht sowie dem isoelektrischen Punkt des Proteins. Durch diese Methode können ganze Proteome analysiert werden. Dabei wird als Proteom der Gesamtproteingehalt einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt bezeichnet.

Die Analysetechnik der *matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry* (MALDI TOF MS) (Karas and Hillenkamp, 1988) ermöglicht die Bestimmung der Molekülmassen frei fliegender Ionen im Hochvakuum. Dazu wird in einer Ionenquelle aus einer Substanzprobe, wie z. B. einem Peptidmassengemisch, ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, welche in einem Massenanalysator hinsichtlich des Masse/Ladungs-Quotienten getrennt und in einem Detektor nachgewiesen werden können. Die Ionentrennung erfolgt nach ihrer Flugzeit in einem Messrohr in Verbindung mit einer gepulsten Ionenerzeugung (*Time-of-Flight* (TOF)-Analysator). Das Peptidmassengemisch wird hierbei aus einem enzymatischen Verdau der zu analysierenden Proteine mit Trypsin erhalten. Da dieses Enzym die Spaltung der Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin katalysiert, können die Massen der entstehenden Peptide theoretisch für jeden Eintrag in einer Protein-Datenbank vorhergesagt werden. Diese vorhergesagten Peptidmassen werden dann mit den experimentell ermittelten, aus der MALDI-Analyse erhaltenen, so genannten *Peptid Massenfingerprints* verglichen. Stimmen ausreichend Peptide mit einem Protein in der Datenbank überein, kann das Protein korrekt identifiziert werden.

Diese Technologie wurde bereits sehr erfolgreich in der biomedizinischen Forschung angewandt. Es wurden Herzkrankheiten (Knecht *et al.*, 1994), Krebs (Jungblut *et al.*, 1999b) und neurodegenerative Erkrankungen (Langen *et al.*, 1999) untersucht. Außerdem gibt es viele derartige Studien über klinisch bedeutende Pathogene (Cash, 2000). So konnten z. B. die hauptsächlichen Virulenzfaktoren für *Helicobacter pylori* determiniert (Atherton, 1998; Jungblut *et al.*, 2000) und wichtige Faktoren der Pathogenese von *Haemophilus influenzae* (D'Mello *et al.*, 1997) sowie *Mycobacterium bovis* (Jungblut *et al.*, 1999a) bestimmt werden. Außerdem konnten Proteomanalysen dazu beitragen die Mechanismen von Medikamentenresistenzen aufzuklären (Cash *et al.*, 1999; White *et al.*, 1998).

Viele weitere Studien belegen ebenfalls, wie wertvoll Proteomanalysen bei der Aufklärung komplexer biologischer Prozesse sind. Die Stadiendifferenzierung von *L. donovani* ist durch weitreichende, morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet, und es ist sehr wahrscheinlich, dass eine Vielzahl verschiedener Proteine daran beteiligt sind. Eine Analyse des Proteinmusters der unterschiedlichen Stadien bietet die Möglichkeit, die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zu Grunde liegen, weiter aufzuklären.

## 1.10 Zielsetzung

Organismen der Gattung *Leishmania* kommen in zwei unterschiedlichen Lebensstadien vor. Bei einer Blutmahlzeit der Überträgerinsekten, den Sandmücken, werden die begeißelten promastigoten Stadien auf den Säugetierwirt übertragen. Diese werden im Hautbereich von Makrophagen aufgenommen und wandeln sich intrazellulär in das amastigote Stadium des Parasiten um. Durch Zweiteilung erfolgt eine Vermehrung der Einzeller, bis die Wirtszelle lysiert und neue Zellen invadiert werden können. Eine Umwandlung in das amastigote Stadium ist für das Überleben der Parasiten von essentieller Bedeutung, da nur diese Form an die veränderten Lebensbedingungen im neuen Wirt angepasst ist. Dieses Stadium ist auch verantwortlich für die Symptome der von diesen Pathogenen hervorgerufenen Krankheit, der Leishmaniose. Bei *L. donovani*, der hier untersuchten Spezies, handelt es sich um den Erreger der visceralen Leishmaniose, bei der der Parasit innere Organe, wie z. B. Leber und Milz befällt und die ohne Behandlung in den meisten Fällen tödlich verläuft.

Die Stadiendifferenzierung von *L. donovani* lässt sich *in vitro* nachstellen. Die so produzierten Amastigoten sind den *in vivo* generierten sehr ähnlich, und es lässt sich auf diese Weise genügend Material für eine umfassende Analyse herstellen.

Mit Hilfe einer Proteomanalyse sollten die Proteinsynthesemuster beider Formen der Stadiendifferenzierung untersucht werden. Hierfür sollten 2D-Gele mit Proteinextrakten von promastigoten und amastigoten (Tag 3 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung) Zellen angefertigt, die Muster miteinander verglichen und die differenziellen Proteine massenspektrometrisch analysiert werden. Dabei sollte besonders auf amastigoten-spezifische Proteine geachtet werden, da dieses das für die Pathogenese interessantere Stadium ist. Im Anschluss an diese Untersuchungen sollten verschiedene der in unterschiedlichen Mengen vorhandenen Proteine ausgesucht und in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Diese Proteine sollten rekombinant in *E. coli* synthetisiert und zur Antikörperherstellung verwendet werden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollten die differenziellen Proteinmengen überprüft werden. Außerdem sollten die rekombinanten Proteine nach Möglichkeit biochemisch charakterisiert und für Enzymaktivitätsstudien verwendet werden. Dies bedingte sich aus der Art der identifizierten Proteine. Desweiteren sollte versucht werden, ihre biologische Funktion mittels gezieltem Gen-*knock-out* und Überexpression der Gene in *L. donovani* aufzuklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alexis Biochemicals	DMNQ, GSNO
Amersham Bioscience	NTP-Set, PlusOne Urea
AppliChem BioChemica	Acrylamid 2K-Lösung (30%) Mix 49:1 Acrylamid 2K-Lösung (30%) Mix 32,33:1
Appligene Oncor	X-Gal
Biomol	Tris-gesättigtes Phenol, SDS, Glycerin, DTT, IPTG, HEPES
BIO-RAD	Bradfordreagenz
Calbiochem®	Puromycin Dihydrochlorid, Bleocin, ASB-14, Nitric Oxide Doner Set II NONOates, Sin-1, NOR-3
FCM BioProducts	SEAKEM® GTG Agarose
Fluka	Thiourea, 6-Biopterin
GIBCO BRL Life Technologies	Agarose, TRIzol®-Reagenz, G418- Sulfat (Geneticin), Penicillin- Streptomycin, Lennox L Broth Base, Lennox L Agar, 10x M199-Medium, FCS, RPMI-Medium
Hartmann Analytic	[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP
Promega	NBT, BCIP
Qiagen	Ni-NTA Superflow
Roche Diagnostics	Ampicillin, Cell Proliferation Reagent WST-1
Serva Electrophoresis	EDTA, APS, Haemin

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden über die Firmen Merck, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Amersham Bioscience	CIAP ( <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> )
New England Biolabs	Restriktionsenzyme
Promega	DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)
Roche Diagnostics	Trypsin recombinant, Proteomics Grade

Solis Biodyne  
USB

Taq Polymerase FIREpol  
T4-DNA Ligase

### 2.1.3 Immunreagenzien

Dianova

Cy<sup>TM</sup>2-konjugierte Anti-Huhn IgG (Esel),  
Cy<sup>TM</sup>2-konjugierte Anti-Maus IgG (Esel)

Sigma-Aldrich

AP-konjugierte Anti-Huhn IgG  
(Kaninchen), AP-konjugierte Anti-Maus-  
IgG (Ziege), HRP-konjugierte Anti-Huhn  
IgG (Kaninchen), Anti- $\beta$  Tubulin  
(monoklonal)

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol gelagert. Die Arbeitskonzentration betrug 10 pmol.

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Die markierten Bereiche stellen Schnittstellen für Restriktionsenzyme dar.

Amplifikation von *LdmPrx*:

5`-GAGACATATGCTCCGCCGTCTTTCCA-3`

PRX-S26(Nde)

5`-GAGACTCGAGTCACATGTTCTTCTCGA-3`

PRX-AS27(Xho)

Amplifikation von *LdCAB55364.1*:

5`-GAGACATATGTCAGTGGTGGCTGCCAA-3`

CAB-S27(Nde)

5`-GAGAGGATCCCTATTTGGCCTTCTGAG-3`

CAB-AS27(Bam)

Sequenzierung von *LdCAB55364.1*:

5`-CAAACGTTAGGTCAGTTCAACGAT-3`

CAB-S409-432

5`-ACGACAGGTGAGGAGGACGAC-3`

CAB-S871-891

Amplifikation der *LdmPrx* 5` UTR:

5`-GAGAATTCATTTAAATGGGCGAGGGCACGA-3`

PRX-5` UTR-S30 (E/S)

5`GAGGATCCGGTACCGGTGCTTGCTTTGA-3`

PRX-5` UTR-AS28 (B/K)

Amplifikation der *LdmPrx* 3` UTR:

5`-GAGGATCCTTCCTTTCACCTATACACGTG-3`

PRX-3` UTR-S29 (B)

5`-GAGCATGCATTTAAATCTTGCCACTGCGGCCCTT-3`

PRX-3` UTR-AS34 (SP/S)

Amplifikation der *LdCAB55364.1* 5` UTR:

5`-GAGAATTCATTTAAATCCAAGCAAAGGCGAATACATAT-3`

CAB-5` UTR-S38 (E/S)

5`-GAGGATCCGGTACCGACCAAGTCCACCAATGTACG-3`

CAB-5` UTR-AS37 (B/K)

Amplifikation der *LdCAB55364.1* 3' UTR:

5' -GAGGATCCGCGACAGCATGCCAGCAACACGG-3'

CAB-3' UTR-S31 (B)

5' -GAAAGCTTATTTAAATTCTGCGTGAGCCTGTGTGTGG-3'

CAB-3' UTR-AS37 (H/S)

Sequenzierung der Gene und UTR im TOPO-Vektor:

5' -CGACGTTGTAAAACGACGACGCCAGT-3'

M24F

5' -ACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

M24R

Sequenzierung der Gene im Expressionsvektor pX63pol:

5' -AAACCGCTCGCGGTGTGTT-3'

pXPHEO Sense

5' -TCCCCGCGGTTGGCCGAT-3'

pXPHEO Antisense

### 2.1.5 Marker

Als DNA-Längenstandard wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von MBI Fermentas, als RNA-Längenstandard die 0,24-9,5 kb RNA Ladder von Invitrogen verwendet. Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von MBI Fermentas als Marker eingesetzt.

### 2.1.6 Weitere Materialien

Amersham Bioscience

MicroSpin™ S-300 HR Säulen,  
Immobiline Dry Strips 18 cm pH 4-7, ECL  
plus Western Blot Detection System

Ambion Inc.

RNase-free QuikSpin Columns  
and Elution Tubes

Applied Biosystems

Big Dye Ready Reaction Terminator  
Cycle Sequencing Kit

Biometra

Hybridisierungsröhrchen

Biozym, Gentra Systems

Puregene DNA-Isolierungs Kit

Dako Cytomation

Fluorescent Mounting Medium

Eastman Kodak

Röntgenfilme X-OMAT™AR und  
BIOMAX™MS

Eurogentec

Elektroporationsküvetten

GIBCO BRL Life Technologies

Nylonmembran Biodyne

Invitrogen

TOPO TA Cloning® Kit, TOP10  
One Shot™ Kit

Macherey-Nagel

NucleoSpin®Plasmid,  
NucleoBond® PC2000

MBI Fermentas

6x DNA Ladepuffer

Millipore

ZipTips C18

Merck

LiChrosolv® Wasser für die  
Chromatographie (HPLC-H<sub>2</sub>O)

Molecular Probes	MitoTracker red CMXRos, Hoechst 3328
Nalgene	Cryoröhrchen
Promega	Prime-a-Gene® labeling System
Q-Biogene	GeneClean® Spin Kit
Roche Diagnostics	High-Pure PCR Purification Kit, <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit TMR red
Sarstedt	Gewebekulturflaschen 50ml/250ml ohne Filter, Gewebekulturflaschen 50ml/250ml mit Filter
Schleicher und Schüll	Whatmanpapier, Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 83)
Spectrum Laboratories Inc.	Spectra/Por® Membrane MWCO:6-8000

### 2.1.7 Geräte

BioRad Gene Pulser™  
 Biometra Duo-Therm-Hybridisierungssofen  
 Casy 1-Cell Counter & Analyser (Schärfe System)  
 IPGphor (Pharmacia Biotech)  
 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480  
 RoboCycler Gradient 40 Stratagene  
 Stratagen UV Stratalinker™1800  
 Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF Massenspektrometer

Alle weiteren laborüblichen Geräte werden nicht gesondert aufgeführt.

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

<b>TBE (10x)</b>		<b>TBS (10x)</b>	
Tris	0,89 M	Tris-HCl (pH 7,2)	100 mM
Borsäure	0,89 M	NaCl	1,5 M
EDTA	25 mM		
<b>PBS (10x)</b>		<b>HBSS (10x)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80,6 mM	KCl	53 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,4 mM
NaCl	1,37 M	NaCl	1,4 M
KCl	26,8 mM	NaHCO <sub>3</sub>	40 mM
pH 7,0 bzw. 5,5 einstellen		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,4 mM
		Glukose	55 mM

**MOPS-Puffer (10x)**

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM
pH 7,0 mit NaOH einstellen	

**RNA-Probenpuffer**

1xMOPS-Puffer	72 µl
Formaldehyd (37% v/v)	128 µl
Formamid	360 µl

**Church-Mix**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mM
SDS	7 %
EDTA	1 mM
pH 7,2 einstellen	

**AP-Puffer (Alkalische Phosphatase)**

Tris-HCl pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

**Trenngelpuffer für PAGE**

(4x Tris/SDS pH 8,8)

Trisbase	1,5 M
SDS	0,4 %
ad 500 ml A. dest	
pH 8,8 mit HCl einstellen	
steril filtrieren	

**Probenpuffer (6x) für PAGE**

Tris	1,52 g
Glycerol	20 ml
SDS	2 %

in 40 ml A. dest lösen

pH 6,8 mit HCl einstellen

2 ml Bromphenolblau zugeben

auf 100 ml mit A. dest auffüllen

**Coomassie-Färbelösung**

Methanol	50 %
Coomassie Brilliant Blau	0,05 %

**SSC (20x)**

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH 7,0 mit HCl einstellen	

**RNA-Dye**

Glycerin	50% (v/v)
EDTA, pH 8,0	1 mM
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylene Cyanol FF	0,25% (w/v)

**Church-Wash**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 mM
SDS	1 %
pH 7,2 einstellen	

**Sammelgelpuffer für PAGE**

(4x Tris/SDS pH 6,8)

Trisbase	500 mM
SDS	0,4 %
ad 500 ml A. dest	
pH 6,8 mit HCl einstellen	
steril filtrieren	

**Laufpuffer (10x) für PAGE**

Trisbase	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	1 %

**Coomassie-Entfärber**

Methanol	45 %
Eisessig	10 %

Essigsäure	10 %	A. dest	45 %
A.dest	40 %		

**Elektroporationspuffer**

HEPES pH 7,5	21 mM
NaCl	137 mM
KCl	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,7 mM
Glukose	6 mM
steril filtrieren	

**Bindungspuffer für Chromatographie (8x)**

Tris-HCl pH 7,9	160 mM
NaCl	4 M
Imidazol	40 mM

**Waschpuffer I für Chromatographie (8x)**

Tris-HCl pH 7,9	80 mM
NaCl	4 M
Imidazol	480 mM

**Waschpuffer II für Chromatographie (4x)**

Tris-HCl pH 7,9	80 mM
NaCl	2 M
Imidazol	800 mM

**Elutionspuffer für Chromatographie (4x)**

Tris-HCl pH 7,9	80 mM
NaCl	2 M
Imidazol	4 M

Alle Puffer und Lösungen wurden vor dem Benutzen, soweit nicht anders angegeben, auf eine 1x Konzentration verdünnt.

**2.1.9 Kulturmedien und Medienzusätze****LB-Medium**

20 g Lennox L Broth Base  
ad 1 l A. dest, autoklavieren

**LB-Agar zur Herstellung von Agarplatten**

32 g Lennox Broth Agar  
ad 1 l A. dest, autoklavieren

**M199 pH 7,0**

1x M199- Medium  
25 % Hitze-inaktiviertes FCS (30 min, 56 °C)  
0,2 % Natriumhydrogencarbonat  
20 µg/ml Gentamycin  
5 mM L-Glutamin

**Einfriermedium**

30 % M199-Medium pH 7,0  
 50 % Hitze-inaktiviertes FCS (30 min, 56 °C)  
 20 % DMSO  
 steril filtrieren

**M199 pH 5,5**

1x M199- Medium  
 25 % Hitze-inaktiviertes FCS (30 min, 56 °C)  
 25 mM MES  
 20 µg/ml Gentamycin  
 5 mM L-Glutamin  
 pH 5,5 einstellen  
 steril filtrieren

**modifiziertes M199-Medium pH 7,0**

1x M199-Medium  
 25% Hitze-inaktiviertes FCS (30 min, 56 °C)  
 0,2% Natriumhydrogencarbonat  
 40 mM HEPES (pH 7,4)  
 100 µM Adenin  
 1,2 µg/ml 6-Biopterin  
 10 µg/ml Haemin  
 20 µg/ml Gentamycin  
 5 mM L-Glutamin  
 steril filtrieren

**Kulturmedium für peritoneale Exsudat Zellen**

1x RPMI-Medium  
 10 % FCS  
 5 mM L-Glutamin  
 50 µg/ml Gentamycin

**Medienzusätze**

Antibiotikum	Konzentration/Lösungsmittel	Arbeitskonzentrationen
Ampicillin	100 mg/ml A. dest	100 µg/ml LB-Medium
Kanamycin	50 mg/ml A. dest	50 µg/ml LB-Medium
G418 (Neomycin)	100 mg/ml M199	50 µg/ml M199-Medium
Puromycin B	1mg/ml M199	25 µg/ml M199-Medium
Bleocin	2,5 mg/ml A. dest	7,5 µg/ml M199-Medium

Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

## 2.2 Organismen und Plasmide

### 2.2.1 Organismen

#### Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5 $\alpha$	sup E44, lac U169 ( f80 lacZ M15), hsd R17, rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, rel A1	(Hanahan and Meselson, 1983)
pAPlacI <sup>Q</sup>	[pAPlacI <sup>Q</sup> ]	Dr. O. Fayet, Toulouse
Top10 One Shot™	F- mcr A (mrr-hsd RMS-mcr BC) 80lac Z M 15, lac X74, deoR, rec A1, ara D139 (araleu) 7697, gal K, gal U, rps L(StrR), end A1, nup G	Invitrogen, Groningen Niederlande

#### *Leishmania*-Stämme

Alle Experimente wurden mit *L. donovani* oder *L. major* durchgeführt. Der *L. donovani*-Stamm MHOM/IN/??/Lo8 wurde von Dan Zilberstein (Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa) zur Verfügung gestellt. Für die Experimente mit *L. major* wurde der von der WHO empfohlene Referenzstamm MHOM/SU/73/5ASKH verwendet (David Evans, London School of Hygiene and Tropical Medicine).

### 2.2.2 Plasmide

Nachfolgend sind die Klonierungsvektoren und die Expressionsplasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden aufgeführt.

Vektor	Verwendung	Referenz/Herkunft
TOPO	Klonierungsvektor	Invitrogen
pUC18/19	Klonierungsvektoren	Invitrogen
pJC45	rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	(Clos and Brandau, 1994)
pX63polPHLEO	<i>Leishmania</i> -spezifischer Expressionsvektor	(Freedman and Beverley, 1993)

Die Plasmide liegen in *E. coli* DH5 $\alpha$  als Wirtstamm vor und werden als Bakterienstocks bei -70°C gelagert.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Zellkultur

Die *L. donovani* Zellen wurden als Promastigote unter sterilen Bedingungen in Abwesenheit von Bakterien bei 25°C in Zellkulturflaschen aus Polystyren gehalten.

Als Kulturmedium diente 1x M199 pH 7,0 (siehe 2.1.9). Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde dem Medium das jeweilige Antibiotikum in entsprechender Konzentration zugeführt. Die Zellkulturen wurden zweimal pro Woche verdünnt, um ein logarithmisches Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Die Zelldichte wurde anhand einer Doppelbestimmung mit einem CASY 1-Cell Counter & Analyser analysiert.

### 2.3.2 Einfrieren von Stammkulturen

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (720xg, 10 min, 4°C) und in einem Gemisch aus 500 µl eiskaltem M199-Medium pH 7,0 und 500 µl Einfriermedium (siehe 2.1.9) resuspendiert. Diese Suspension, mit einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml, wurde in vorgekühlte Cryoröhrchen überführt und über Nacht bei -70°C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

### 2.3.3 *In vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

Die *in vitro*-Differenzierung von *L. donovani* zu axenischen Amastigoten erfolgte wie zuvor beschrieben (Krobitsch *et al.*, 1998). Promastigote Zellen (Tag 0) wurden auf eine Zelldichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in M199-Medium pH 7,0 eingestellt und in Zellkulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel bei 37°C in einem Brutschrank mit Kohlendioxid/Luftgemisch-Begasung (5% CO<sub>2</sub>, 95% Luft) für 24 Stunden kultiviert (Tag 1). Nach 24 Stunden hatte sich die Zelldichte auf 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml erhöht; die Zellsuspension wurde sedimentiert (720xg, 10 min, RT) und in dem doppelten Volumen M199-Medium pH 5,5 (siehe 2.1.9) resuspendiert. Die Zellkulturen wurden für weitere 5 Tage bei 37°C inkubiert, wobei nach 4 Tagen das Medium gewechselt wurde (Tag 2-5). Der Differenzierungsprozess wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Gewinnung axenischer amastigoter Parasiten diente ausschließlich zur Herstellung von Zelllysaten.

### 2.3.4 *In vitro*- Infektion von peritonealen Exsudat Zellen

Zur *in vitro*-Infektion wurden peritoneale Exsudat Zellen von 4-6 Wochen alten weiblichen C57black/6 Mäusen eingesetzt. Die Mäuse wurden 4 Tage vor dem Experiment mit 5 % Thioglykolat in PBS behandelt, das in einem Volumen von 1 ml intraperitoneal injiziert wurde. Am vierten Tag wurden die Mäuse getötet, der Bauchraum mit 10 ml PBS gespült und die Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Nach

Sedimentation (690xg, 10 min, 4°C) erfolgte ein Aussäen der Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung in eine 12-well Mikrotiterplatte, bzw.  $5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in eine 24-well Mikrotiterplatte auf *coverslips* in komplementiertem RPMI-Medium (siehe 2.1.9). Zur Adhäsion wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank mit Kohlendioxid/Luftgemisch-Begasung (5% CO<sub>2</sub>, 95% Luft) inkubiert, bevor die Leishmanien zugegeben wurden.

Für die Infektion wurden Leishmanien aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen in modifiziertem M199-Medium pH 7,0 (siehe 2.1.9) gehalten. Unter täglichem Mediumwechsel 2-3 Tage vor der Infektion wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von  $2-5 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert. Die Inkubation der peritonealen Exsudat Zellen mit Leishmanien erfolgte in einem Verhältnis von 1:10. Die gewünschte Anzahl von Leishmanien wurde sedimentiert (720xg, 10 min, RT) und in entsprechender Menge RPMI-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde zu den adhärennten peritonealen Exsudat Zellen gegeben und der gesamte Ansatz für weitere 24 bis 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu den zu untersuchenden Zeitpunkten nach Infektionsbeginn wurde der Überstand entfernt und die Zellen dreimal mit vorgewärmtem RPMI-Medium gewaschen. Die Zellen konnten nun für Immunfluoreszenzmikroskopie-Studien (siehe 2.3.22) verwendet werden.

Sollte die Infektiosität eines bestimmten *Leishmania*-Stammes untersucht werden, wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS pH 7,0 einer 2-minütigen Inkubation in Hoechst 33258 (1:1000 verdünnt in PBS pH 7,0) zum Anfärben der DNA-haltigen Organellen unterzogen. Die Präparate wurden danach in *Mounting Medium* eingebettet und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 plus Immunfluoreszenzmikroskop bei 630-facher Vergrößerung.

Alternativ wurden die Zellen in 100% Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte für 10 Minuten in einer 10%-igen Giemsa-Lösung. Zum Entfärben wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

Es wurde die Anzahl an infizierten peritonealen Exsudat Zellen ausgezählt, sowie die Anzahl an amastigoten Leishmanien pro infizierter Zelle bestimmt.

### 2.3.5 Kultivierung von Bakterien

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium (siehe 2.1.9) aerob bei 37°C in Reagenzgläsern auf einem Rundschüttler angezogen. Um Bakterienstocks anzulegen, wurden die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 1/5 Vol. sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

## 2.3.6 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.3.6.1 Plasmid-Mini-Präparationen

Für die Schnellpräparation geringer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit verwendet. Die Präparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei werden Bakterien mit Hilfe von SDS lysiert und die DNA durch Natriumhydroxid denaturiert. Zugabe von Kaliumacetat neutralisiert die Lösung. Denaturierte Proteine und chromosomale DNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann so isoliert werden.

### 2.3.6.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Für die Transfektion von *L. donovani* wurden größere Mengen hochsauberer Plasmid-DNA benötigt. Hierzu erfolgte die Isolierung mit Hilfe des NucleoBond® PC 2000-Kits nach Anleitung des Herstellers. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Isolation nach dem oben beschriebenen Prinzip der alkalischen Lyse.

Die gewonnene DNA wurde in HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.3.6.3 Isolierung genomischer DNA aus *L. donovani*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *L. donovani* wurde das Puregene® DNA Purification Kit benutzt. Hierfür wurden ca.  $1-2 \times 10^8$  promastigote Zellen sedimentiert (720xg, 10 min, 4°C) und zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen. Das Prinzip der DNA-Extraktion beruht bei dieser Methode auf einer Lyse der Zellen in Anwesenheit eines DNA-Stabilisators, der die DNase-Aktivität einschränkt und so die DNA vor einem vorzeitigen Abbau bewahrt. Nach Entfernung der RNA werden die Proteine ausgefällt; die im Überstand enthaltene DNA wird durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert und in einem Hydrationspuffer mit DNA-Stabilisator aufgenommen. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerprotokoll, wobei die Reagenzienmenge der eingesetzten Zellzahl angepasst wurde. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei 4°C.

### 2.3.6.4 Isolierung von RNA aus *L. donovani*

Es wurden  $1-2 \times 10^8$  promastigote, bzw. *in vitro*-differenzierte amastigote Zellen geerntet und dreimal mit PBS pH 7,0 bzw. pH 5,5 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde sofort 1 ml TRIzol® auf das Sediment gegeben und die resuspendierten Zellen einem viermaligen Einfrieren in Trockeneis/EtOH und anschließendem Auftauen bei 37°C unterzogen. Danach wurden 200 µl Chloroform zugefügt und der Ansatz gut durchmischt. Nach Inkubation für 3 min bei RT wurde für 15 min bei 12.000xg zentrifugiert

und die RNA im resultierenden Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt. Es erfolgte ein Waschschriff mit 70%(v/v) EtOH und Trocknen des Sediments bei 60°C. Anschließend wurde die RNA in 50-100 µl HPLC-H<sub>2</sub>O bei 60 °C resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch. Es wurde die Absorption einer zu bestimmenden Nukleinsäurelösung bei 260 nm in Quarzküvetten gemessen und mit Hilfe des OD-Wertes die Konzentration in µg/µl nach folgender Formel berechnet

$$OD_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (DNA) bzw. } 40 \text{ (RNA)}/1000$$

Es wurde für eine OD von 1 bei doppelsträngiger DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA von 40 µg/ml angenommen.

Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm sowie bei 280 nm ließ sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  Wert von 1,8; eine reine RNA-Lösung von 2,0.

## 2.3.7 Enzymatische Modifikationen von DNA

### 2.3.7.1 Restriktionanalysen von DNA

Restriktionsanalysen wurden zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Molekülen eingesetzt. Dazu wurde doppelsträngige DNA mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs enzymatisch gespalten und die entstandenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.8) getrennt. Die Enzyme wurden in den mitgelieferten Puffersystemen bei den angegebenen Temperaturen eingesetzt. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 1-2 µg DNA und für einen präparativen Ansatz 20 µg DNA eingesetzt und mit 3-10 U Enzym/µg DNA für 2 h inkubiert.

### 2.3.7.2 Dephosphorylierung freier 5`-Enden von DNA

Bei einem Restriktionsverdau entstehen freie 3`OH- Enden und freie 5`Phosphatgruppen an den Schnittstellen. Damit es bei den folgenden Ligationsansätzen (siehe 2.3.7.3) nicht zu einer Religation des Vektors kommen konnte, wurden die freien 5`Phosphatgruppen mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase abgespalten. Ein 50 µl Reaktionsansatz wurde mit 1 U *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) in dem entsprechenden Puffersystem für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Alkalischen Phosphatase wurde eine Chloroformextraktion (siehe 2.3.9.3) durchgeführt.

### 2.3.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Enzymatische Ligationen von zu klonierenden DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA wurden mit dem T4-DNA-Ligase-System durchgeführt. Die molaren Verhältnisse lagen in diesen 15 µl Ansätzen bei 1:3 (Vektor-DNA:DNA-Fragment), wobei ca. 100 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Ligationen sehr großer DNA-Fragmente (>2000Bp) und *blunt end*-Ligationen wurden 5 U Enzym eingesetzt, ansonsten wurde mit 1 U Enzym ligiert.

PCR-Produkte (siehe 2.3.12) mit Adenosinüberhängen konnten direkt ohne vorherigen Restriktionsverdau mit Hilfe des TOPO®TA Cloning Kits subkloniert werden.

### 2.3.7.4 Fill-in Reaktionen

Bei einem Restriktionsverdau können Schnittstellen mit 5`Überhängen entstehen. Wurde zu Klonierungszwecken ein *blunt end* benötigt, mußten diese Überhänge aufgefüllt werden. 20 µg DNA wurden in einem 40 µl (Endvolumen) Reaktionsansatz mit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in einem dazu gehörigen Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl dNTP-Mix (je 25 µM) zugegeben und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Synthesereaktion wurde der Ansatz auf 100 µl mit HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und einer Chloroformextraktion (siehe 2.3.9.3) unterzogen.

### 2.3.7.5 Radioaktive Markierung von DNA

Zum Markieren von DNA-Sonden zur Hybridisierung von Nukleinsäuren (siehe 2.3.11.3) wurde das *Prime-a-Gene*® Labeling System nach Herstellerangaben eingesetzt. 25 ng eines linearen DNA-Fragments wurden in 30 µl A. bidest für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach der Abkühlung auf Eis wurden 1x *labeling*-Puffer, 40 µg/ml BSA, je 20 µM dCTP, dGTP und dTTP, 50 µCi [ $\alpha^{32}$ P] dATP und 5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 25 °C inkubiert und die freien Nukleotide anschließend über eine Gelfiltrationssäule (MicroSpinTMS-300 HR Column) abgetrennt. Während die Nukleotide auf der Säule verblieben, befand sich die markierte DNA im Durchfluss. Vor dem Einsatz wurde sie nochmals für 5 min bei 95°C denaturiert.

### 2.3.8 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese in horizontalen Agarosegalkammern dient der Auftrennung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente zu analytischen sowie zu präparativen Zwecken. Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,7-3% (w/v) in TBE-Puffer eingesetzt, in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Zur späteren Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht enthielten die Gele 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die mit einem entsprechenden Volumen an DNA-Ladepuffer versetzte, negativ geladene DNA wandert in dem angelegten Spannungsfeld (80-120V) von der Kathode zur Anode. Die DNA-

Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden die in 2.1.5 aufgeführten Längenstandards mit aufgetragen.

## 2.3.9 Reinigen und Fällern von DNA

### 2.3.9.1 Elution aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelstückchen erfolgte mit Hilfe von *QuickSpin Columns* und Elutionsreaktionsgefäßen. Die zu eluierende DNA-Bande wurde aus einem Agarosegel bei UV-Lichtbestrahlung der Wellenlänge 366 nm ausgeschnitten, in ein *QuickSpin Column* plaziert und bei 15000xg für 20 min zentrifugiert.

Die DNA befindet sich dann im Durchfluss und wurde mit NaAcetat/EtOH gefällt (siehe 2.3.9.4). Zur besseren Ausbeute wurde das Reaktionsgefäß mit dem Gelstück vor der Elution mindestens 3 h bei -20°C eingefroren.

Lineare DNA-Fragmente, die für eine Transfektion von *L. donovani* eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe des GeneClean® Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die isolierte DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft und ihre Konzentration bestimmt (siehe 2.3.6.5).

### 2.3.9.2 Reinigung von PCR-Amplifikaten

PCR-Produkte wurden mit dem High-Pure PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

### 2.3.9.3 Chloropanextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde eine Chloropanextraktion durchgeführt. Chloropan ist ein Gemisch aus 1 Vol. Tris-gesättigtem Phenol und 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Der Reaktionsansatz wurde mit 1 Vol. Chloropan versetzt, durch Vortexen gut gemischt und anschließend zur besseren Phasentrennung bei 2000xg für 10 min zentrifugiert. Die DNA befindet sich danach in der oberen wässrigen Phase, die Proteine werden mit Hilfe des Phenols denaturiert und sammeln sich in der Interphase. Es erfolgte ein weiterer Extraktionsschritt der oberen Phase mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und Fällung der DNA mit NaAcetat (siehe 2.3.9.4).

### 2.3.9.4 Fällern von Nukleinsäuren mit NaAcetat oder Isopropanol

In Gegenwart monovalenter Kationen bildet DNA, bzw. RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Hierzu wurden die Ansätze mit 0,7-0,8 Vol. Isopropanol oder 1/10 Vol. 3 M NaAcetat (pH 4,6 für DNA und pH 5,2 für RNA) und 2,5 Vol. 99% (v/v) EtOH versetzt, für 15 min bei 15.000xg

und RT zentrifugiert und anschließend zweimal mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, um die mitgefällten Salze zu entfernen. Die getrocknete DNA bzw. RNA wurde in HPLC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.3.10 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Damit Bakterien in der Lage sind fremde DNA-Moleküle mit großer Effizienz aufzunehmen, gibt es die Möglichkeit die Zellen durch Behandlung mit hohen Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub>, kompetent zu machen. Hierzu wurden *E.coli* DH5 $\alpha$  oder pAPlacI<sup>Q</sup> Bakterien in 40 ml Kulturen in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden bei 350xg für 10 min sedimentiert und in 20 ml kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> (steril filtriert) resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (15 min, 350xg, 4°C), das Sediment wurde in 4 ml kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und die Zellsuspension bei 4°C gelagert. Diese Bakterien wurden 7 Tage für die Transformation verwendet. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei -70°C aufbewahrt.

Zusätzlich zu den kompetenten DH5 $\alpha$  Bakterien wurden außerdem die käuflich erworbenen OneShot™ TOP10 Zellen verwendet. Hier erfolgte die Transformation nach Anleitung des Herstellers. Dieses Klonierungssystem ermöglichte eine Blau-Weiß-Selektion durch den Zusatz von 50  $\mu$ l 2% X-Gal zum Transformationsansatz.

Die Transformation der kompetenten DH5 $\alpha$  Bakterien erfolgte ebenfalls nach der Hitzeschockmethode. 200  $\mu$ l Zellen wurden mit 3  $\mu$ l Ligationsansatz (siehe 2.3.7.3) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 60 s Hitzeschock bei 42°C, die Bakterien wurden kurz auf Eis abgekühlt und 800  $\mu$ l LB-Medium zugegeben. Nach 60 min Schütteln bei 37°C wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.11 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen und Hybridisierung von DNA-Sonden

#### 2.3.11.1 Northern Blot-Analysen

Als Northern Blot-Analyse bezeichnet man den Transfer von RNA auf eine Nylonmembran. Hierzu wurde die RNA vorher in einem denaturierenden 0,8%igem Agarosegel (SEAKEM® GTG Agarose) getrennt. Durch den Zusatz von 6,7% (v/v) Formaldehyd wurde die Ausbildung von Sekundärstrukturen weitgehend verhindert. Das Agarosegel wurde in MOPS-Puffer angesetzt, welcher ebenfalls als Laufpuffer diente. 20  $\mu$ g RNA in einem Volumen von maximal 28  $\mu$ l wurden mit 28  $\mu$ l RNA-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l RNA-Dye und 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (1mg/ml) wurden die Proben über Nacht bei 1 V/cm getrennt.

Danach erfolgte die Dokumentation unter UV-Licht. Geblottet wurde, indem mehrere Lagen Papiertücher, 2 Lagen Whatmanpapier, eine Nylonmembran, das Gel und

wiederum 2 Lagen Whatmanpapier übereinandergestapelt wurden. Die Whatmanfilter und die Membran wurden vorher in 20xSSC getränkt, als Pufferreservoir während des Blotvorganges diente ein in 20xSSC getränkter Schwamm. Der Transfer fand für mindestens 3 h bis über Nacht bei RT statt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 kJ, UV Stratalinker<sup>TM</sup> 1800) wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden. Sie konnte nun bei RT gelagert oder direkt für die Hybridisierung (siehe 2.3.11.3) eingesetzt werden.

### 2.3.11.2 Southern Blot-Analysen

Die Methode des Transfers von DNA auf eine Membran wird als Southern Blot-Analyse bezeichnet. Es wurden 20 µg chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Die Ansätze wurden in einem 0,7%igen präparativen Agarosegel getrennt und unter UV-Licht dokumentiert. Nach dem Lauf wurde das Gel nacheinander 15 min in 0,2 M HCl und 1 Stunde in 0,2 M NaOH/1,5 M NaCl geschwenkt. Der Blotaufbau, Fixierung der DNA und Aufbewahrung der Membran erfolgte wie unter 2.3.11.1 beschrieben. Als Blotpuffer diente hierbei 0,2 M NaOH/1,5 M NaCl.

### 2.3.11.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Blotmembranen aus 2.3.11.1 und 2.3.11.2 wurden in Hybridisierungsröhrchen überführt und für mindesten 30 min mit *Church-Mix* bei 50°C bzw. 70°C in einem Hybridisierungsofen prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe 2.3.7.5) zugefügt und über Nacht bei 50 °C bzw. 70°C hybridisiert. Danach wurden die Membranen für 30 min bei 50°C bzw. 70°C mit *Church-Wash* gewaschen und in Folie eingeschweißt. Die Dokumentation der Signale erfolgte über die Belichtung eines Röntgenfilms. Die Inkubationszeit variierte hierbei in Abhängigkeit der Stärke des Signals von 1 h bis zu mehreren Tagen bei -70°C.

## 2.3.12 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen, die durch die Wahl der Matrizen-DNA und der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt wird. Eine Reaktion besteht aus mehreren Abfolgen, während denen sich drei Schritte zyklisch wiederholen:

1. Denaturierung des DNA-Moleküls
2. *Annealing* (Hybridisierung der Oligonukleotide)
3. DNA-Synthese (Amplifikation)

50 µl-Ansatz für das Taq Polymerase System der Firma Solis Biodyne:

10x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
Oligonukleotid 1	2 µl

Oligonukleotid 2	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
FIREPol	0,2 µl
DNA	0,1-0,5 µg
HPLC-H <sub>2</sub> O	ad. 50 µl

Die Denaturierung erfolgte für 1 min bei 95 °C, die Synthesereaktion in Abhängigkeit von der Fragmentgröße zwischen 1 min 30 s bis zu 4 min bei 72 °C. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge und Spezifität der Oligonukleotide. Sie darf allerdings die Schmelztemperatur  $T_m$  nicht überschreiten. Diese berechnet sich aus der Formel:  $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ . Die Zeit für die Hybridisierung der Oligonukleotide betrug zwischen 1 min bis zu 1 min 30 s. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt und die Zyklen 30- oder 35-fach wiederholt. Die Amplifikation wurde gelelektrophoretisch überprüft. Für die Klonierung in den TOPO<sup>®</sup>-Vektor muss das PCR-Produkt Adenosinüberhänge enthalten. Dieses wurde durch einen 10 minütigen abschließenden Inkubationsschritt bei 72 °C im Anschluss an das jeweilige PCR-Programm erreicht.

### 2.3.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden anhand einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* durchgeführt (Sanger *et al.*, 1980). Der Kettenabbruch erfolgte hierbei durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Es wurde das *Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die 20 µl Ansätze enthielten 1 µg DNA, 10 pmol Oligonukleotid (M24F oder R, bzw. spezifische Oligonukleotide) und 4 µl *Terminator Ready Reaction Mix*. Die Reaktion war in drei Schritte unterteilt: 10 s bei 96 °C, 5 s bei 50 °C, 4 min bei 60 °C, welche 25-fach wiederholt wurden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl HPLC-H<sub>2</sub>O versetzt und einer Fällung mit NaAcetat und EtOH unterzogen (siehe 2.3.9.4). Die Trennung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und die Datenanalyse erfolgten mit Hilfe eines *ABIPRISM<sup>™</sup> 377-DNA-Sequencers* der Firma Perkin Elmer.

### 2.3.14 Transfektion von *L. donovani* durch Elektroporation und Selektion rekombinanter Zellpopulationen

Bei der Elektroporation werden die Leishmanien in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die DNA in die Leishmanien gelangen kann. Die Methode zur Transfektion von *Leishmania*-Zellen wurde von Kapler *et al.* etabliert (Kapler *et al.*, 1990).

Es wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und zweimal in sterilem, kaltem PBS pH 7,0 gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 10 min bei 720xg und 4 °C. Anschließend wurde nochmal mit kaltem Elektroporationspuffer

gewaschen und das Sediment dann in Elektroporationspuffer resuspendiert, so dass eine Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht wurde. Gleich im Anschluss wurden die Zellen für die Transfektion eingesetzt. Diese erfolgte, indem  $400 \mu\text{l}$  ( $4 \times 10^7$  Zellen) der vorbereiteten Zellsuspension und  $5 \mu\text{g}$  lineare DNA für eine Integration durch homologe Rekombination, bzw.  $100 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA (in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$ ) für eine episomale Etablierung der DNA, in Elektroporationsküvetten gemischt wurden und bei  $1,5 \text{ kV}$  ( $3750\text{V/cm}$ ),  $25 \mu\text{F}$  und einem Widerstand von  $200 \text{ Ohm}$  dreimal hintereinander elektroporiert wurden. Die resultierenden Zeitkonstanten betragen zwischen  $0,5\text{-}1,2 \text{ ms}$ . Sofort nach dieser Behandlung wurden die Zellen für  $10 \text{ min}$  auf Eis gelagert und dann in  $10 \text{ ml}$  frischem, modifiziertem M199 pH  $7,0$  (siehe 2.1.9) aufgenommen. In Abhängigkeit der Antibiotikaresistenzen wurde  $24 \text{ h}$  nach der Transfektion durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums ins Kulturmedium mit der Selektion rekombinanter Zellen begonnen.

### 2.3.15 Vereinzlung von Zellpopulationen

Die Vereinzlung von Zellpopulationen aus einer Transfektion (siehe 2.3.14) zu Einzelklonen erfolgte in *96-well* Mikrotiterplatten. Dazu wurde zunächst die Zellpopulation auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und dann in einer seriellen Verdünnung auf eine Endkonzentration von  $5 \text{ Zellen/ml}$  gebracht. Die Verdünnung erfolgte in modifiziertem M199-Medium pH  $7,0$  mit dem Selektionsantibiotikum. Danach wurden die Vertiefungen einer *96-well* Mikrotiterplatte mit  $200 \mu\text{l}$  dieser Suspension befüllt. Theoretisch befand sich in jeder Vertiefung eine Zelle. Waren nach  $2\text{-}3$  Wochen Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  ein Drittel bis die Hälfte aller *wells* der Mikrotiterplatte bewachsen, wurde davon ausgegangen, dass Einzelklone selektiert wurden. Diese wurden daraufhin in ein größeres Kulturvolumen überführt.

### 2.3.16 Zellaufschluss von Leishmanien

#### 2.3.16.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus *L. donovani* für die eindimensionale Gelelektrophorese

*L. donovani* promastigote bzw. *in vitro*-differenzierte amastigote Zellen wurden geerntet, zweimal mit PBS pH  $7,0$  bzw. pH  $5,5$  gewaschen und das Zellsediment in heißem SDS-Probenpuffer aufgenommen, so dass eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ $20\mu\text{l}$  entstand. Diese Suspension wurde dann  $10 \text{ min}$  bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Um eine Degradation des Proteinextraktes zu verhindern wurde während des Zellaufschlusses der Proteinaseinhibitor E-64 ( $10 \mu\text{M}$ ) zugesetzt. Danach wurde der Extrakt aliquotiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.16.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus *L. donovani* für die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese

Für ein Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes 2D Gel wurden  $5 \times 10^8$  promastigote bzw. *in vitro*-differenzierte amastigote *Leishmania*-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und zweimal mit PBS pH 7,0 bzw. pH 5,5 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 50  $\mu$ l Lysepuffer (40 mM Tris pH 9,5; 1 mM EDTA; 0,1 mM E-64) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch viermaliges Einfrieren in Trockeneis/EtOH und anschließendem Auftauen bei 37°C. Zur Solubilisierung wurde die Probe danach mit 150  $\mu$ l Rehydrierungspuffer (8M Urea; 2M Thiourea; 4% CHAPS; 2,4% ASB-14) versetzt und 15 min bei RT auf einem Rollenschüttler inkubiert. Es folgte eine 45-minütige Zentrifugation bei 10.000xg, um die löslichen Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und bei -70°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### 2.3.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

#### 2.3.17.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte im diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli, 1970). Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich die Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Massen trennen. Es wurden Gelvorrichtungen mit der Abmessung 6x18 cm benutzt. Je nach gewünschtem Trennungsbereich wurden 8-12%ige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen

	Trenngele			Sammelgel
	8	10	12	4
Acrylamidkonzentration (%)	8	10	12	4
4x Gelpuffer (ml)	1,88	1,88	1,88	1,25
Acrylamid 2K-Lsg (30%) 32,33:1 (ml)	2,25	2,5	3,0	0,65
A. bidest (ml)	3,6	3,1	2,6	3,05
APS (25%w/v) ( $\mu$ l)	25	25	25	25
TEMED ( $\mu$ l)	5	5	5	5

Die Angaben beziehen sich auf ein Gel.

Zuerst wurde die Gelapparatur mit 70 % EtOH gereinigt und zusammen gebaut, dann das Trenngel gegossen und zur Erhaltung einer geraden Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und darauf das Sammelgel gegossen, in welches ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt wurde.

Die Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, mit 1 Vol. SDS-Probenpuffer gemischt und mit DTT (10 mM Endkonzentration) versetzt. Vor dem Auftragen wurden sie für 5 min

bei 95 °C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 25 mA/Gel, als Laufpuffer diente Elektrophoresepuffer, die Größenbestimmung erfolgte anhand der in 2.1.5 aufgeführten Längenstandards.

Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferriert (siehe 2.3.19).

### **Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung**

Die Proteingele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und am nächsten Tag durch Schwenken in Entfärber-Lösung der Hintergrund entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar waren (die Lösung wurde mehrfach gewechselt). Danach wurden die Gele mit A. dest gespült, in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C aufbewahrt.

## **2.3.17.2 Zweidimensionale (2D) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

In einem Proteingemisch, wie z. B. dem Gesamtproteinextrakt einer Zelle können diverse Proteinspezies mit identischem Molekulargewicht vorhanden sein, die bei der üblicherweise verwendeten eindimensionalen Gelelektrophorese (siehe 2.3.17.1) nicht getrennt werden können. Die zweidimensionale Gelelektrophorese indes erlaubt die Trennung von Proteingemischen anhand von zwei Eigenschaften. In der ersten Dimension werden die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Dies erfolgt in einem Gelstreifen, der einen immobilisierten pH-Gradienten enthält. Der isoelektrische Punkt ist dabei der pH Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins Null ist. Danach wird der Gelstreifen auf ein Polyacrylamidgel appliziert, die Proteine wandern nach Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Gelstreifen in das Gel ein und werden zusätzlich in Abhängigkeit ihrer Molekulargewichte getrennt. Als Ergebnis erhält man ein Polyacrylamidgel in dem jede Proteinspezies eines Gemisches als einzelner Punkt anfärbbar ist.

Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurden alle Schritte der 2D-Gelelektrophorese (Probenvorbereitung, Rehydrierung und Auftrennung in der ersten Dimension, Äquilibrierung und Gelelektrophorese in der zweiten Dimension sowie die Anfärbung der Proteine) immer exakt nach Protokollangaben durchgeführt.

### **Erste Dimension (Rehydrierung und isoelektrische Fokussierung)**

Zellextrakte wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit Rehydrierungspuffer (8M Urea; 2M Thiourea; 4% CHAPS; 2,4% ASB-14; 1% DTT) auf ein Volumen von 340 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden das Gemisch mit 0,5% IPG-Puffer des zu untersuchenden pH-Bereichs versehen. Der IPG-Puffer enthält Ampholine, bei denen es sich um kleine Carriermoleküle mit einem definierten isoelektrischen Punkt handelt, die die Auftrennung des Proteingemisches entlang des pH-Gradienten erleichtern sollen. Die Probe wurde in die Gelstreifenhalter überführt und ein Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten vorsichtig und luftblasenfrei auf die Probe appliziert. Der gesamte Ansatz wurde mit 1 ml Mineralöl (*coverfluid*) überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Aufsetzen des Deckels wurde der Gelstreifenhalter auf die Elektrode des IPGphor-Gerätes

überführt. Die Rehydrierung und isoelektrische Fokussierung wurden nach Folgendem Protokoll durchgeführt

Spannung (Volt)	Dauer (Stunden)
0	2
30	12
500	1
1000	1
2000	1
4000	1
8000	12

20° C, 100µA/Gelstreifen

Nachdem eine Voltstundenzahl von mindesten 94.000 erreicht war, wurde der Lauf abgebrochen und die Gelstreifen sofort für die zweite Dimension vorbereitet.

#### Zweite Dimension (Äquilibration und SDS-Gelelektrophorese)

Für die gelelektrophoretische Trennung der nun nach ihrem isoeletrischen Punkt separierten Proteine mussten die Gelstreifen zunächst in einem für die SDS-Gelelektrophorese benötigten Puffer äquilibriert werden. Die Gelstreifen wurden mit einer Pinzette in eine unten verschlossene Plastikpipette überführt und zweimal für 15 min bei RT in je 10 ml Äquilibrationpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Urea; 30% Glycerol; 2% SDS; 0,03% Bromphenolblau) inkubiert. Im ersten Schritt wurde dem Äquilibrationpuffer 100 mg DTT zugefügt, um den Denaturierungszustand der Proteine aufrecht zu erhalten. Im zweiten Schritt wurde 250 mg Iodacetamid zugefügt, um durch Alkylierung eine Reoxidation zu Disulfidbrücken zu verhindern. Das im Äquilibrationpuffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine, lagert sich im Überschuss an diese an und bildet so negativ geladene SDS/Proteinkomplexe. Die Eigenladung der Proteine ist somit zu vernachlässigen und die Trennung erfolgt in der zweiten Dimension ausschließlich nach der Größe der Proteine.

Es wurden Gelvorrichtungen mit den Abmessungen 18x20 cm gebraucht, in denen 12,5%-ige SDS-Gel angefertigt wurden. Die Zusammensetzung war wie folgt

1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (ml)	15
Acrylamid 2K-Lösung (30%) Mix 49:1 (ml)	25
SDS (10%w/v) (µl)	600
A.bidest (ml)	19
APS (10%w/v) (µl)	300
TEMED (µl)	20

Die Angaben beziehen sich auf ein Gel

Anstatt eines Sammelgels wurde auf das Trenngel ein ca. 2-3 cm breiter Streifen einer Agarose-Bett-Lösung (Elektrophoresepuffer; 0,5% Agarose) pipettiert, in die mit Hilfe zweier Pinzetten der äquilibrierte Gelstreifen überführt wurde. Als Laufpuffer diente Elektrophoresepuffer, die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Stromspannung von 15mA pro Gel bei 4°C. Nachfolgend wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Größenbestimmung erfolgte anhand der in 2.1.5 aufgeführten Längenstandards.

#### **Kolloidale Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung**

Zum Anfärben von 2D-Gelen wurde die wesentlich sensitivere kolloidale Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung gewählt. Hierzu wurden die Gele in 100 ml Färbelösung (1,4% Phosphorsäure; 8% Ammoniumsulfat; 20% Methanol; 0,12% Coomassie-Brilliant-Blau G-250) über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Gel mit 25% Methanol entfärbt und nach ausreichender Entfärbung bis zur weiteren Analyse in 25% Ammoniumsulfat gelagert.

#### **2.3.18 Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS)**

##### **Probenvorbereitung, massenspektrometrische Messungen und Datenbankanalyse**

Mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie wurden die in den 2D-Gelen getrennten Proteine analysiert und identifiziert. Dazu wurden die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Proteine mit einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze aus dem Gel ausgestochen, auf einer vorher mit 70%-igem EtOH gereinigten Glasplatte mit einem Skalpell zerkleinert und in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Gelstückchen wurden in 50% v/v Acetonitril in 25 mM Ammoniumbikarbonat gewaschen und anschließend in 100% Acetonitril dehydriert. Nach erneuter Rehydrierung der Gelstückchen in 10 µl 5 mM Ammoniumbikarbonat wurden die Proteine einem tryptischen Verdau unterzogen. Dem Ansatz wurden wiederum 10 µl 5 mM Ammoniumbikarbonat zugeführt, in denen 300 ng Trypsin enthalten waren. Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Um die Peptide aus den Gelstückchen zu extrahieren wurden 20 µl 0,3% v/v TFA in Acetonitril zu dem Ansatz gegeben und die Lösung in einem Ultraschallbad für 10 min beschallt. Zur Verringerung des Flüssigkeitsvolumens wurde der Reaktionsansatz einer Vakuumzentrifugation unterzogen und die Peptide wurden anschließend in 8 µl 0,1% v/v TFA; 5% v/v Acetonitril in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Reinigung der Peptide für die anschließende Massenspektrometrie erfolgte über eine C18 Revers-Phasen-Minisäulenchromatographie in einer Mikropipettenspitze (ZipTip C18) nach Angaben des Herstellers. Zur Durchführung der MALDI-TOF MS wurden die Peptide mit 2,5 µl Matrix-Lösung (7 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure in 60% v/v Acetonitril/0,12% v/v TFA) eluiert und auf eine goldbeschichtete Platte aufgebracht.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden auf einem *Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF* Massenspektrometer durchgeführt. Es wurde im

Reflektiermodus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, einer 70%-igen Netzspannung und einer Verzögerung von 200 ns gemessen. Jedes Spektrum bestand aus durchschnittlich 256 Laserschüssen. Die Massenspektren wurden mit Hilfe von bekannten autokatalytischen Trypsin-Fragmenten kalibriert. Die Peptidmassen wurden als monoisotopische Massen gemessen und die resultierenden Spektren mit der *Data Explorer Software* (IBM) manuell prozessiert.

Zur Identifizierung der Proteine wurde eine Datenbank-Analyse mit den erhaltenen Peptidmassen durchgeführt. Es wurden die Datenbanken *NCBI* und die *Leishmania major GeneDBproteindatabase*([ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/database/L.major\\_sequences/LEISHP](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/database/L.major_sequences/LEISHP) EP) mit Hilfe der Programme *MS-Fit* (<http://prospector.ucsf.edu>) und *MASCOT* (Matrix Science; [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) durchsucht. Die Suchparameter waren dabei wie folgt:

Es wurde die Modifikation von Propionamid an Cysteinresten und eine Methioninoxidation erlaubt, sowie eine Missspaltung des Trypsins zugelassen. Es wurden ausschließlich die monoisotopischen Massen untersucht und eine Massentoleranz von 0,07 Da erlaubt. Mindestens 4 Peptide sollten mit den Datenbankeinträgen übereinstimmen und bei den identifizierten Proteinen sollte es sich um solche anderer *Leishmania*- oder sehr nah verwandter Spezies handeln.

### 2.3.19 Western Blot-Analysen und immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen

Den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran, um deren immunologischen Nachweis zu ermöglichen, bezeichnet man als Western-Blot-Analysen. Es wurde die Technik des *Semi-Dry-Blottings* verwendet. Als Transferpuffer diente Elektrophoresepuffer. Auf die Kathodenseite der Blotkammer wurden drei in Elektrophoresepuffer getränkte Whatmanfilterpapiere gelegt, darauf das Gel, dann die ebenfalls getränkte Membran und wiederum drei feuchte Whatmanpapiere. Die Bildung von Luftblasen wurde dabei nach Möglichkeit vermieden. Der Transfer erfolgte nach Auflegen der Anodenplatte für 1,3 h bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup>.

#### Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen

Auf Membranen immobilisierte Proteine können durch spezifische Antikörperreaktionen indirekt nachgewiesen werden. Dazu wurden freie Proteinbindungsstellen auf einer Western Blot-Membran durch eine mindestens halbstündige Inkubation mit einer Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS/0,05% Tween 20) gesättigt. Anschließend erfolgte die spezifische Bindung des ersten Antikörpers (entsprechend verdünnt in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen (10 min) in TBS/0,05%Tween 20 wurde der zweite Antikörper (ebenfalls in Blockierlösung verdünnt) zugegeben und für 1 h damit inkubiert. Es folgten nochmals drei Waschschritte mit TBS/0,05%Tween 20 und dann wurde die Membran mit AP-Puffer äquilibriert. Die Antikörperbindung wurde durch Inkubation in AP-Entwicklerlösung

(66 µl NBT(5% w/v in 70% DMF) + 33 µl BCIP (5%w/v in DMF) ad 10 ml AP-Puffer) sichtbar gemacht. Die Entwicklung wurde durch A. dest gestoppt. Alle Inkubationen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei RT auf einem Schüttler.

Alternativ wurden die immobilisierten Proteine durch Chemolumineszenz nachgewiesen. Hierbei ist der zweite Antikörper Peroxidase-konjugiert. Zur Entwicklung wurde das *ECL Detection System* nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Nachweis mit Peroxidase ist ca. 10-20mal sensitiver als der Nachweis mit alkalischer Phosphatase.

Antikörper	Verdünnung
Anti- <i>LdmPrx</i> polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 10000
Anti- <i>LdDC2</i> polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 500
Anti-HSP70 polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 1000
Anti-HSP90 polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 1000
Anti-HSP100 polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 1000
Anti-βTubulin, monoklonal	1 : 500
Anti-A2-Proteine, monoklonal	1 : 50
sekundärer Ak Anti-Maus IgG, AP-konjugiert	1: 1500
sekundärer Ak Anti-Huhn, AP-konjugiert	1: 1000
sekundärer Ak Anti-Huhn, HRP-konjugiert	1: 1500

Die Antiseren gegen HSP70, HSP90, HSP100 und die A2-Proteine wurden freundlicherweise von Dr. Joachim Clos zur Verfügung gestellt.

### 2.3.20 Herstellung rekombinanter *L. donovani* Proteine

#### 2.3.20.1 Überexpression in *E. coli*

Die Herstellung der rekombinanten *L. donovani* Proteine *LdmPrx* und *LdDC2* erfolgte in pAPlacI<sup>Q</sup>-Zellen. Die PCR-amplifizierte kodierende Region wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pJC45 ligiert. Dieser Vektor erlaubt eine Reinigung der Proteine mit Hilfe eines N-terminalen His-tags, bestehend aus 10 Histidinen. Die entstandenen Plasmide *LdmPrx*:pJC45 und *LdDC2*:pJC45 wurden in pAPlacI<sup>Q</sup>-Zellen transformiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone von den LB-Amp-Agarplatten in 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 100 µg/ml Kanamycin) plus 50 ml 20% Glukose überführt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Die Synthese der Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Bakterien weitere 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie 20 min bei 8000xg zentrifugiert und das Sediment bei -20°C gelagert.

### 2.3.20.2 Reinigung der rekombinanten Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie über eine Säule mit Ni-NTA *superflow* gereinigt. Das Bakteriensediment wurde dafür in 12 ml Bindungspuffer aufgenommen und die Zellen durch eine Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (15000xg, 45 min, 4°C) wurden die unlöslichen *inclusion bodies* von den löslichen Proteinen im Überstand getrennt und diese dann mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Bei dieser Methode binden die Proteine über ihren N-terminalen Histidin-*tag* an eine mit Nickelionen beladene Säulenmatrix. Nach dem Entfernen der ungebundenen Proteine erfolgt die Elution durch Steigerung der Imidazol-Konzentration, wodurch das gebundene Protein kompetitiv von der Säulenmatrix verdrängt wird. Die Säulenmatrix wurde hierbei mit dem 10-fachen Volumen an Bindungspuffer äquilibriert bevor sie mit Proteinlösung beladen wurde. Es folgte ein Waschschriff mit dem 10-fachen Volumen an Waschpuffer I, danach wurden die Zielproteine mit 20 ml Waschpuffer II und 12 ml Elutionspuffer in 1 ml Aliquots eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft. Die Eluate mit dem höchsten Gehalt an Protein wurden vereinigt und direkt für die Immunisierung von Hühnern eingesetzt (siehe 2.3.22) oder für die Durchführung von Enzymtests dialysiert (siehe 2.3.23).

### 2.3.21 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau von 465 zu 595 nm. Durch den Vergleich mit einer Eichgeraden kann anhand der Extinktionsänderung unbekannter Lösungen deren Proteinkonzentration bestimmt werden.

5-100 µl Proteinlösung wurden in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 µl Bradfordreagenz für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0-0,5 mg/ml) aufgenommen.

### 2.3.22 Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY)

Zur Gewinnung von Antiseren wurden Hühner mit rekombinantem Protein immunisiert. Die Reinigung der Antikörper aus dem Eigelb (IgY) erfolgte durch fraktionierende Polyethylenglykol-Fällung (Polson *et al.*, 1980). Zuvor wurde aus den Eiern ein Präimmunserum (wie nachfolgend beschrieben) hergestellt und dieses im Western Blot auf eine Reaktion mit *Leishmania*-Zellextrakten getestet. Hat eine Reaktion stattgefunden, konnte das Huhn nicht eingesetzt werden. Zur Immunisierung wurden 200-300 µg rekombinantes Protein verwendet. Nach Mischung mit komplettem Freudschem Adjuvanz im Verhältnis 1+1 wurde die Emulsion subcutan in den Halsbereich der Hühner injiziert.

Zwei und vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgten zwei *booster* Immunisierungen, bei denen die gleiche Menge Antigen im Verhältnis 1+1 mit inkomplettem Freudschem Adjuvanz gemischt und injiziert wurde.

Zur Gewinnung der Antisera wurde das Eigelb vom Eiweiß getrennt und nach Entfernen der Dotterhaut mit 1 Vol. Kaliumphosphatpuffer (10 mM  $K_2PO_4$ , pH 7,2; 100 mM NaCl) gemischt. Durch Zugabe von 1 Vol. Kaliumphosphatpuffer mit 7% Polyethylenglykol (PEG) 6000 und 30-minütiger Inkubation auf einem Rollenschüttler bei 4°C wurden kontaminierende Lipidverbindungen bei einer Endkonzentration von 3,5% PEG ausgefällt und im Anschluss abzentrifugiert (8000xg, 10 min, 4°C). Nach Filtrieren des Überstandes wurden die Antikörper durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 12%) unter ständigem Mischen ausgefällt und sedimentiert (8000xg, 10 min, 4°C). Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 1 Vol. Kaliumphosphatpuffer unter Rühren resuspendiert. Durch Zugabe von 1 Vol. Kaliumphosphatpuffer mit 24% PEG 6000 wurden die Antikörper nochmals bei einer Endkonzentration von 12% PEG 6000 gefällt und abzentrifugiert (8000xg, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 5 ml Kaliumphosphatpuffer gelöst und in einem letzten Zentrifugationsschritt (8000xg, 45 min, 4°C) erfolgte die Abtrennung ungelösten Materials. Die klare Antikörperlösung wurde in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 0,02% Natriumazid bei -20°C gelagert. Die Qualität der Antisera wurde im Western Blot überprüft.

### **2.3.23 Bestimmung der Enzymaktivität des rekombinanten Peroxiredoxins von *L. donovani***

#### **2.3.23.1 Dialyse des rekombinanten Proteins**

Das rekombinante Peroxiredoxin wurde nach seiner Reinigung für mindestens 15 h bei 4°C im 250-500-fachen Volumen 50 mM HEPES pH 7,2 dialysiert. Es wurde hierfür ein *Spectra/Por®Membrane MWCO:6-8000* Dialyseschlauch verwendet.

#### **2.3.23.2 DNA-Nicking-Assay**

Die Fähigkeit des rekombinanten Peroxiredoxins, DNA vor Hydroxylradikal-induzierten Einzelstrangbrüchen zu schützen, wurde mit Hilfe eines DNA-Nicking-Assays getestet (Lim *et al.*, 1993; Sauri *et al.*, 1995). Der Reaktionsansatz enthielt hierbei 0,1 mM HEPES (pH 7,2); 3,3 µM  $FeCl_3$ ; 10 mM DTT; 5 mM EDTA (pH 8) und verschiedene Konzentrationen an rekombinantem *LdmPrx* in einem Volumen von 50 µl. Dieser Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µg superspiralisierte Plasmid-DNA (pUC18) zugefügt und für weitere 1-3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA in einem 1%-igen Agarosegel getrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (siehe 2.3.8). Alle Lösungen wurden immer frisch angesetzt.

### 2.3.23.3 Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von DTT

Die Fähigkeit des rekombinanten Peroxiredoxins,  $H_2O_2$  und t-BOOH in Gegenwart von DTT zu entgiften, wurde mit der Ferrithiocyanat-Methode getestet (Thurman *et al.*, 1972). Der Reaktionsansatz betrug 1 ml. Verschiedene Mengen an rekombinantem LdmPrx wurden mit 3 mM DTT 10 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 625  $\mu M$   $H_2O_2$  oder 700  $\mu M$  t-BOOH für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend mit 80  $\mu l$  100% TCA gefällt und die verbleibende Menge an Peroxid nach Zugabe von 100  $\mu l$  2,5 M Kaliumthiocyanat und 200  $\mu l$  10 mM Eisenammoniumsulfat photometrisch bei 480 nm bestimmt.

## 2.3.24 Mikroskopie

### 2.3.24.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zum Anfärben des schlauchförmigen Mitochondriums von *Leishmania*-Zellen wurden  $1 \times 10^7$  spät-logarithmisch wachsende promastigote *L. donovani* Zellen mit 1 nM *MitoTracker red CMXRos* in M199-Medium pH 7,0 für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit M199-Medium pH 7,0 gewaschen und das Zellsediment in 100  $\mu l$  M199-Medium pH 7,0 resuspendiert. 20  $\mu l$  dieser Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen, getrocknet und die Zellen mit 3,7% Formaldehyd in M199-Medium pH 7,0 fixiert. Alternativ wurden unbehandelte promastigote *L. donovani* Zellen auf Objektträger aufgebracht und fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit PBS pH 7,0, erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit PBS/0,2% Triton-X100 für 15 min. Danach folgten erneute Waschschrte in PBS pH 7,0 und anschließend wurden die Zellen für 30 min in PBS/10% FCS inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in PBS/10% FCS für 1 h bei RT. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, verdünnt in PBS/10% FCS, wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS pH 7,0 ebenfalls für 1 h bei RT durchgeführt. Als letztes folgte nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS pH 7,0 eine 2-minütige Inkubation der Proben in Hoechst 33258 (1:1000 verdünnt in PBS pH 7,0), zum Anfärben der DNA-haltigen Organellen. Die Präparate wurden in *Mounting Medium* eingebettet und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 plus Immunfluoreszenzmikroskop bei 630-facher Vergrößerung und der *Improvision software*.

Intrazelluläre amastigote *L. donovani* Zellen, generiert durch Infektion von murinen peritonealen Exsudat Zellen (siehe 2.3.4), wurden ebenfalls für Immunfluoreszenz-Studien eingesetzt. Die peritonealen Exsudat Zellen wurden zu diesem Zweck auf *coverslips* ausgesät, was ein weiteres Prozessieren der Zellen ermöglichte. Die Zellen wurden mit 1 nM *MitoTracker red CMXRos* in RPMI-Medium für 30 min bei RT inkubiert, gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS pH 7,0 fixiert. Nach anschließender Permeabilisierung mit eiskaltem Methanol wurden die weiteren Färbeschritte wie oben beschrieben ausgeführt.

Antikörper	Verdünnungen
Anti- <i>LdmPrx</i> polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 1000
Anti- <i>LdDC2</i> polyklonales Antiserum (Huhn)	1 : 500
Anti- $\beta$ Tubulin, monoklonal	1 : 500
sekundärer Ak anti-Huhn IgG, Cy <sup>TM</sup> 2-konjugiert	1:1000
sekundärer Ak anti-Maus IgG, Cy <sup>TM</sup> 2-konjugiert	1:1000

### 2.3.24.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

$1 \times 10^7$  Leishmanien wurden sedimentiert (720xg, 10 min, 4°C), zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h in 2% Paraformaldehyd/0,025% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Die Proben wurden danach in aufsteigender Ethanolkonzentration von 30%-99% für jeweils 30 min entwässert. Im Anschluss erfolgte über Nacht eine Inkubation in 90% Ethanol mit 10% L.R.White, danach wurde in vier Schritten die Ethanolkonzentration verringert, bzw. die L.R.White-Konzentration erhöht, bis die Proben in 100% L.R.White vorlagen. Anschließend wurden die Proben in Gelatine kapseln überführt und nach Aushärtung erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut-E). Die Schnitte wurden auf *grids* gezogen und über Nacht getrocknet.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben für 1 h mit 3%BSA/0,1% Tween 20 in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:500 in 3%BSA/0,1% Tween 20 in PBS) über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden wiederum dreimal gewaschen und für 1 h mit einem aus Kaninchen gewonnenen anti-Huhn-IgY (1:1500 in 3%BSA/0,1% Tween 20 in PBS) behandelt. Danach erfolgte eine Behandlung mit Protein A-Goldpartikeln und zur Kontrastierung eine Inkubation der Schnitte in einer gesättigten Uranylacetatlösung. Danach konnten die Präparate mit einem Philips TEM 301-Gerät mikroskopisch untersucht werden. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Manfred Krömer durchgeführt.

### 2.3.24.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Es wurden  $1 \times 10^8$  *L. donovani* Zellen sedimentiert (720xg, 10 min, 4°C), zweimal in PBS gewaschen, in 2% Gutaraldehyd in Natriumcacodylat-Puffer fixiert und anschließend in 1% Osmium postfixiert. Die Proben wurden in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen von 30%-100% entwässert. Nach *critical point*-Trocknung wurden die Proben mit Gold behandelt und in einem Philips SEM 500 Elektronenmikroskop mikroskopiert. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Anne MacDonald durchgeführt.

### 2.3.25 Viabilitäts-Assay

Die Resistenz verschiedener rekombinanter *Leishmania*-Stämme gegenüber oxidativem oder nitrogenem Stress wurde mit Hilfe des Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 bestimmt. Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein Tetrazolium Salz, das von mitochondrialen Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen zu einem farbigen Produkt (Formazan) umgewandelt wird. Dieser Farbumschlag lässt sich photometrisch bestimmen. Hierzu wurden  $5 \times 10^6$  *Leishmania*-Zellen, aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase, in 100  $\mu$ l *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden verschiedenen Stressoren ausgesetzt, wobei die Inkubationsdauern den Halbwertszeiten der unterschiedlichen Chemikalien angepasst wurden. Als Peroxide wurden  $H_2O_2$  und t-BOOH eingesetzt; als Induktoren von nitrogenem Stress dienten MAHMA NONOate, PAPA NONOate, Spermin NONOate, NOC-7, NOC-9, NOC-12 und GSNO; Sin-1 erzeugt Stickoxide und Superoxid-Anion-Radikale; NOR-3 ist zellpermeabel und setzt intra- und extrazellulär Stickoxide frei; DMNQ induziert eine intrazelluläre Bildung von Superoxid-Anionen. Die untersuchten Konzentrationen reichten von 0-5 mM. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit dem Proliferations-Reagenz WST-1 inkubiert und die Bildung von Formazan durch Messung der Absorption bei 440 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, um Messungenauigkeiten auszumitteln. Als Kontrolle diente eine Inkubation der Zellen in HBSS allein. Die prozentuale Viabilität wurde nach folgender Formel berechnet

$$OD_{440nm} (\text{Stressor}) / OD_{440nm} (\text{Kontrolle}) \times 100$$

Um die unterschiedlichen Viabilitäten besser vergleichen zu können, wurden die Kontrollwerte gleich eins und die Messwerte im Verhältnis dazu gesetzt.

### 2.3.26 *In situ*-Markierung von DNA-Fragmenten

Apoptotische Zellen zeichnen sich unter anderem durch das Vorhandensein von fragmentierter DNA in ihren Zellkernen aus. Diese Fragmente können mit Hilfe der TUNEL-Technik (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick-End-Labeling*) detektiert werden. Hierzu wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* nach Angaben des Herstellers benutzt.  $1 \times 10^7$  promastigote, rekombinante *Leishmania*-Zellen aus der früh-logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert und das Sediment in frischem M199-Medium pH 7,0 aufgenommen. In den Vertiefungen einer 24-well Mikrotiterplatte wurden diese Zellen 3 h verschiedenen Konzentrationen an  $H_2O_2$  (1-3 mM) ausgesetzt. Dies führte zur Induktion von Apoptose. Kontrollzellen wurden in PBS pH 7,0 inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und mit 4% Paraformaldehyd in PBS pH 7,0 fixiert. Es folgte ein 2-minütiger Permeabilisierungsschritt in 0,1% Triton-X100/0,1% Natriumcitrat nach dem die Zellen für 1 h in dem TUNEL-Reaktionsgemisch, das die Terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) und *TMR red* markierte Nukleotide enthielt, bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der DNA-haltigen Organellen mit Hoechst 33258 (1:1000 verdünnt in PBS pH 7,0). Die Präparate wurden in *Mounting Medium* eingebettet und bei

4 °C im Dunkeln gelagert. Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Zeiss Axioskop 2 plus Immunfluoreszenzmikroskop bei 630-facher Vergrößerung untersucht. Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten gezählt. Alle Zählungen erfolgten nach vorheriger Kodierung der Proben, um Voreingenommenheit zu verhindern.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Proteomanalyse der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

##### 3.1.1 *In vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

Während Zelltransformationsprozessen kommt es im Allgemeinen zu Veränderungen im Proteinmuster der sich differenzierenden Zelle. Die Stadiendifferenzierung von *L. donovani* vom promastigotem zum amastigotem Stadium ist ein Prozess, bei dem es zu gravierenden morphologischen und biochemischen Umstrukturierungen in der Zelle kommt, die auf eine enorme Veränderung im Expressionsmuster schließen lassen. Diese Stadiendifferenzierung lässt sich *in vitro*, in der Zellkultur, nachstellen und kann somit relativ leicht untersucht werden. Die Zellen wurden wie in 2.3.3 beschrieben kultiviert. Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden Zellextrakte von Tag 0 (T0 = promastigotes Stadium) und Tag 3 (T3 = repräsentativ für das amastigote Stadium) der Differenzierung verwendet. Am dritten Tag der Differenzierung haben beide Auslösemechanismen für die *in vitro*-Stadiendifferenzierung, Hitzeschock und pH-Veränderung, bereits stattgefunden. Die größten Veränderungen sollten zu diesem Zeitpunkt vollzogen sein.

##### 3.1.2 Darstellung der Proteome mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung der molekularen Unterschiede der oben beschriebenen *in vitro*- Stadiendifferenzierung wurde eine vergleichende Proteomanalyse durchgeführt. Hierbei werden die Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle synthetisiert werden, mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese getrennt und die Muster der zu untersuchenden Proben miteinander verglichen. In einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung können diese Proteine identifiziert werden.

Die Art der Herstellung von Zellextrakten ist bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese sehr wichtig. Bei dem hier verwendeten Protokoll wurde Gesamtproteinextrakt aus Zellen der beiden Zeitpunkte der Stadiendifferenzierung eingesetzt. Da auf Grund der Verwendung von Harnstoff und Thioharnstoff eine verlässliche Proteinbestimmung nicht möglich war, wurden immer gleiche Zellzahlen ( $5 \times 10^8$  Zellen für ein Gel) für die Herstellung der Extrakte eingesetzt. Das Protokoll wurde dahingehend optimiert, dass eine Reproduzierbarkeit der Proteinmuster beider untersuchter Zeitpunkte gewährleistet war. Für die isoelektrische Fokussierung wurden die pH-Gradienten 4-7 und 5-6 ausgewählt. Voruntersuchungen zeigten, dass der isoelektrische Punkt der meisten mit Coomassie-Brilliant-Blau anfärbbaren Proteine des *L. donovani* Proteoms in diesem pH-Bereich liegt. Die Gele wurden ausschließlich mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt, was eine weitere Analyse der Proteine mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie erlaubte. Außerdem sind die Färbungsintensitäten der Protein-*spots* in einem gewissen Rahmen

proportional zu ihrer Abundanz und lassen sich so hinsichtlich ihrer Regulation verlässlicher miteinander vergleichen. Abb. 2 zeigt jeweils zwei Gele beider zu vergleichenden Tage der Stadiendifferenzierung mit einer isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich 4-7 (A,B,E,F) sowie jeweils ein Gel der Proben von T0 bzw. T3 in denen die Proteine mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 5 und 6 noch weiter separiert wurden (C,G). Die charakteristischen *spot*-Muster und Intensitäten der Protein-*spots* auf den Gelen A und B (T0), bzw. E und F (T3) sind reproduzierbar und können gut miteinander verglichen werden. Es wurden mindestens drei Gele mit Zellextrakten aus verschiedenen Probenaufbereitungen von jedem Zeitpunkt angefertigt. Insgesamt konnten ca. 500 Proteine in den 2D-Gelen mit einem pH-Gradienten von 4-7 und ca. 200 Proteine in dem engeren Bereich pH 5-6 separiert werden.

### 3.1.3 Vergleich der Proteinmuster

Die Proteinmuster der zu vergleichenden Proben wurden manuell verglichen. Zusätzlich zu dem Vergleich der beiden Zeitpunkte der Stadiendifferenzierung wurden außerdem die Gele gleicher Proben mit verschiedenen pH-Gradienten untersucht. Abb. 2 D und H zeigen Vergrößerungen aus den in A,E,C und G gekennzeichneten Gelbereichen. Die *spot*-Muster sind in den jeweiligen Ausschnitten identisch und MALDI-Analysen der markierten Proteine zeigten, dass es sich bei den *spots* 3 und 15 um dieselben Proteine handelt (siehe Tabelle 2 und 3 in 3.1.4). Dieser Vergleich identischer *spots* aus Gelen unterschiedlicher pH-Bereiche wurde für vier Proteine durchgeführt, wobei es bei allen untersuchten Proben zur Identifizierung von Peptidmassen-*fingerprints* kam, die auf desselben Protein schliessen lassen.

In Abb. 3 sind vergrößerte Ausschnitte aus den zu vergleichenden Gelen von T0 und T3 dargestellt. Eine Auswahl der als differenziell identifizierten Protein-*spots* sind mit Nummern markiert. Es wurden zusätzlich zu in einem Stadium ganz neu synthetisierten bzw. überhaupt nicht mehr vorhandenen Proteinen solche ausgewählt, die eine offensichtliche Regulation in die eine oder andere Richtung zeigten. Diese konnten auf Grund der Änderung ihrer Färbungsintensität identifiziert werden. *Spot* Nr. 10 und Nr. 27 sind beispielsweise nur in dem einen oder dem anderen Stadium vorhanden (Nr. 10 an T0 und Nr. 27 an T3), wohingegen *spot* Nr. 6 und Nr. 23 eine Regulation aufweisen. Die Intensität von Nr. 6 nimmt im Verlauf der Differenzierung ab, Nr. 23 hingegen weist eine erhöhte Intensität auf. Es wurde zwischen einer schwachen und einer starken Regulation unterschieden, wobei Nr. 6 und 23 als relativ stark reguliert eingestuft wurden, im Vergleich zu Nr. 11 und 24, die als eher schwach reguliert identifiziert wurden. Die unterschiedlichen Intensitäten der Protein-*spots* lassen sich auch in den Gelen der pH-Bereiche 5-6 wiederfinden. Die in den Ausschnitten in Abb. 2 D und H markierten Proteine Nr. 3 und 15 weisen eine zu den ihnen entsprechenden Homologen auf den Gelen der pH-Bereiche 4-7 korrespondierende Regulation auf.

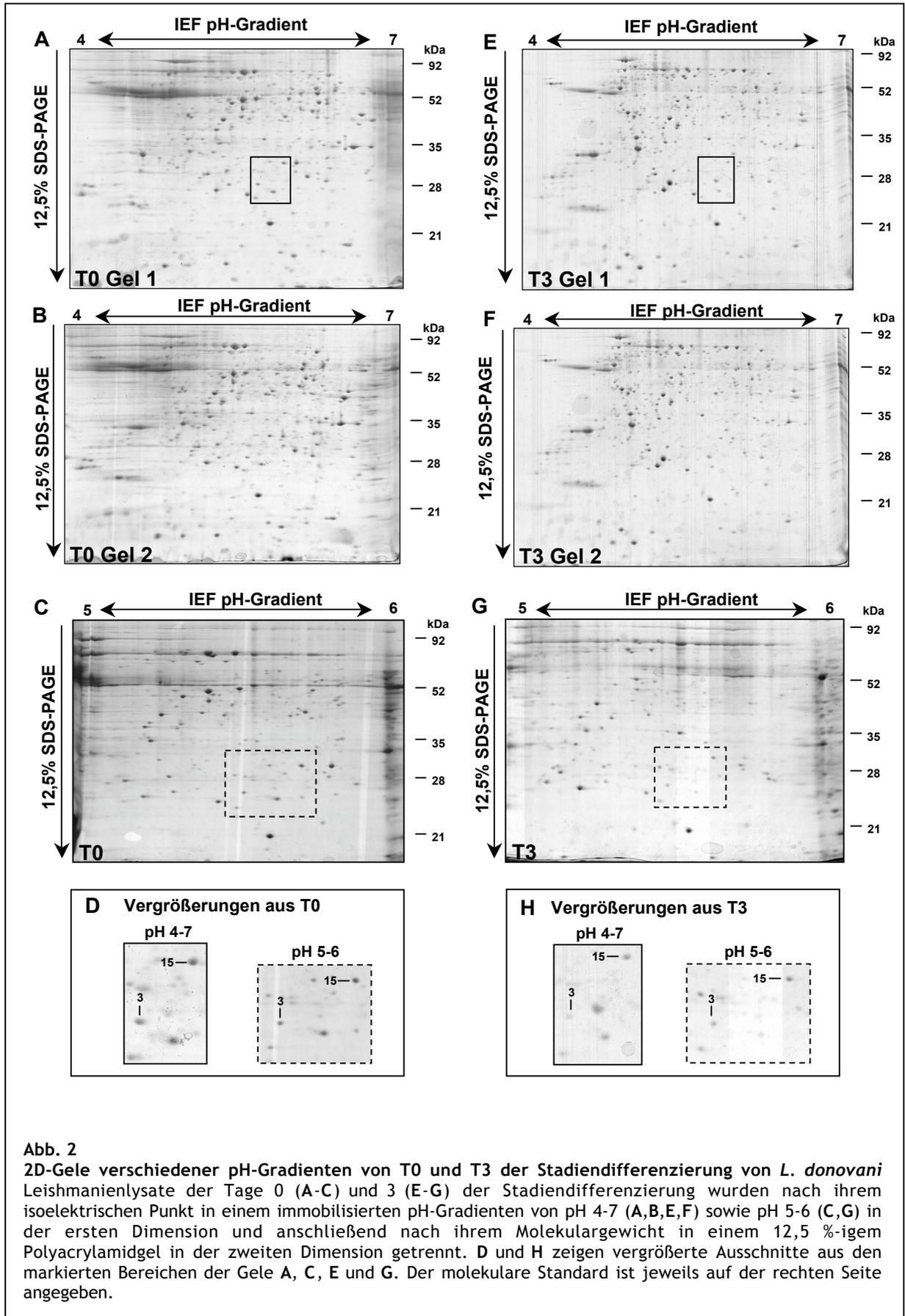


Abb. 2

2D-Gele verschiedener pH-Gradienten von T0 und T3 der Stadiendifferenzierung von *L. donovani* Leishmanienlysate der Tage 0 (A-C) und 3 (E-G) der Stadiendifferenzierung wurden nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem immobilisierten pH-Gradienten von pH 4-7 (A,B,E,F) sowie pH 5-6 (C,G) in der ersten Dimension und anschließend nach ihrem Molekulargewicht in einem 12,5 %-igem Polyacrylamidgel in der zweiten Dimension getrennt. D und H zeigen vergrößerte Ausschnitte aus den markierten Bereichen der Gele A, C, E und G. Der molekulare Standard ist jeweils auf der rechten Seite angegeben.

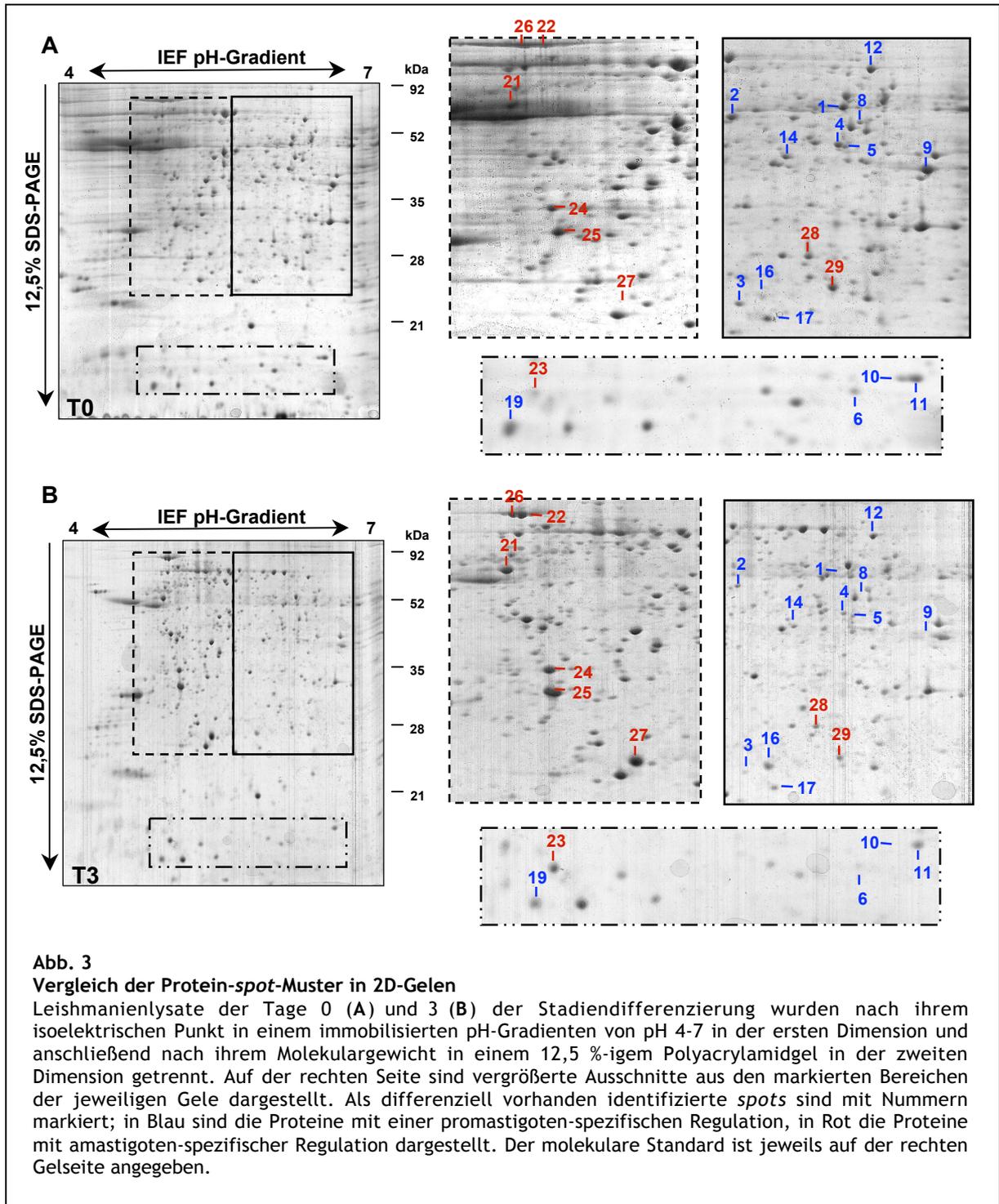


Abb. 3

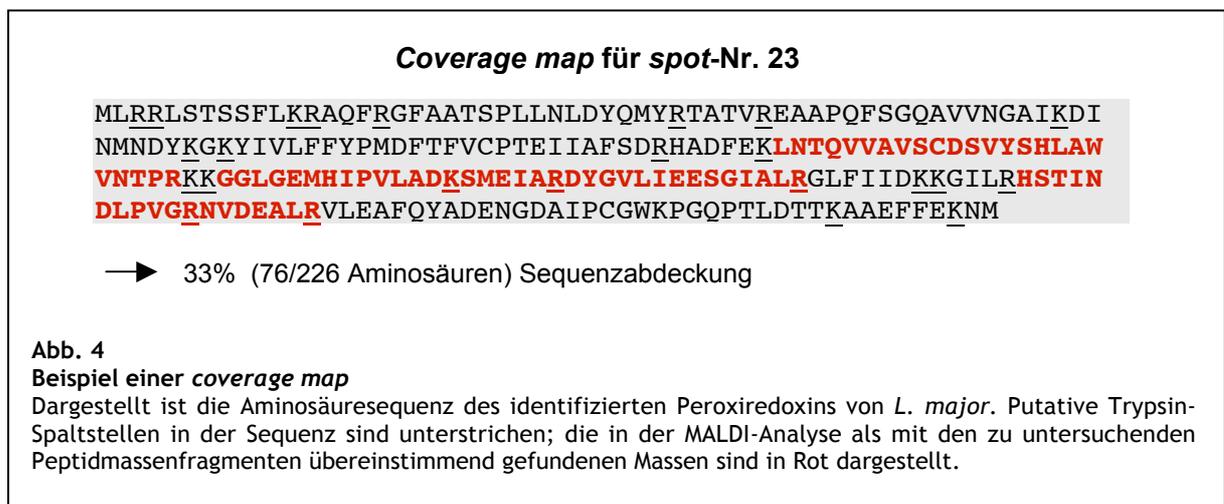
**Vergleich der Protein-spot-Muster in 2D-Gelen**

Leishmanienlysate der Tage 0 (A) und 3 (B) der Stadiendifferenzierung wurden nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem immobilisierten pH-Gradienten von pH 4-7 in der ersten Dimension und anschließend nach ihrem Molekulargewicht in einem 12,5 %-igem Polyacrylamidgel in der zweiten Dimension getrennt. Auf der rechten Seite sind vergrößerte Ausschnitte aus den markierten Bereichen der jeweiligen Gele dargestellt. Als differenziell vorhanden identifizierte spots sind mit Nummern markiert; in Blau sind die Proteine mit einer promastigoten-spezifischen Regulation, in Rot die Proteine mit amastigoten-spezifischer Regulation dargestellt. Der molekulare Standard ist jeweils auf der rechten Gelseite angegeben.

**3.1.4 Identifizierung der stadien-spezifischen Proteine und Analyse der Aminosäuresequenzen**

Die im Verlauf der Analyse als stadien-spezifisch charakterisierten Proteine wurden mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. Es wurden insgesamt 41 Protein-spots aus den 2D-Gelen bearbeitet. Hierbei wurden auch eine Reihe derselben spots von zwei verschiedenen Gelen analysiert, um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um

dieselben Proteine handelt. Für alle analysierten Proteine wurden im Verlauf der MALDI-Analyse auswertbare Peptidmassenspektren erhalten. Die Auswertung ergab eine eindeutige Zuordnung von 33 dieser Spektren zu Einträgen in der NCBI- bzw. der *L. major* GeneDB-Datenbank. In Abb. 4 ist als Beispiel die so genannte *coverage map* des identifizierten Peroxiredoxins (*spot* Nr. 23) dargestellt. Dabei handelt es sich um die Darstellung des Anteils der übereinstimmenden Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins und des untersuchten Peptidmassenspektrums. In diesem Fall stimmten die Massen von 6 der insgesamt 32 bei der MALDI-MS analysierten Peptidfragmente mit den theoretisch errechneten Massen der bei einem tryptischen Verdau des *L. major* Peroxiredoxins entstehenden Peptidfragmenten überein. Damit entsprechen 33% der Aminosäuren einander, was für eine eindeutige Identifizierung ausreichend ist.



Die Tabellen 2 und 3 zeigen, dass es sich bei den 33 identifizierten Proteinen um 21 verschiedene Moleküle handelte. Teilweise ergab die Analyse zwei verschiedener *spots* die Identifizierung desselben Proteins.

**Tabelle 2: Promastigoten-spezifische Proteine**

spot Nr.	Regulation der Expression	identifiziertes Protein/Organismus/ Sequenz-Motive	Accession Nr.	MW theor/ exp	pI theor/ exp	übereinstimmende Massen	Signalsequenz /TMD
1	+++	Adenosylhomocysteinase <i>L. donovani</i>	1710837	47/65	5,7/6,1	16/43	-
2	++	S-Adenosylmethionin-synthase <i>L. infantum</i>	6016549	43/50	5,5/5,4	8/28	-

3	++	Adenylatkinase <i>L. major</i>	1231122	23/28	5,8/5,7	5/29	-
4	++	nicht identifiziert		*/50	*/6,1		
5	+	Aldolase Epimerase verwandtes Protein 2 <i>L. major</i>	9954713	41/50	5,9/6,1	12/48	-
6	++	hypothetisches Protein der Hit- Familie; <i>L. major</i>	8744988	15/20	6,1/6,2	6/33	-
7	+	aktiviertes Proteinkinase C Rezeptor Homolog LACK <i>L. donovani</i>	2654167	30/34	6,6/6,3	13/56	-
8	+++	Replikationsfaktor A 51 kDa Untereinheit <i>C. fasciculata</i>	Q23696	52/50	6,3/6,3	8/22	-
9	+++	nicht identifiziert		*/45	*/6,6		
10	+++	nicht identifiziert		*/20	*/6,3		
11	+	nicht identifiziert		*/20	*/6,4		
12	+	nicht identifiziert		*/80	*/6,3		
13	+	nicht identifiziert		*/65	*/6,3		
14	++	Glutaminsynthase <i>L. major</i>	Lmj F06.0370 <sup>1)</sup>	60/50	6,6/5,9	6/27	
15	+	hypothetisches Protein <i>L. major</i>	Lmj F36.1770 <sup>1)</sup>	12,3/30	9,9/5,9	4/47	M, 1 TMD
16	++	nicht identifiziert		*/30	*/5,8		
17	++	nicht identifiziert		*/27	*/5,8		
18	+	Cdc27 verwandtes Kerngerüst Protein <i>L. major</i> 2 TPR-Motive	Lmj F05.0410 <sup>1)</sup>	99/35	6,8/6,2	7/62	-
19	++	hypothetisches Protein <i>L. major</i>	Lmj F27.1860 <sup>1)</sup>	91/18	6,5/4,8	5/37	M

<sup>1)</sup> Accession Nr. der *L. major* GeneDB Proteindatenbank

\* kein theoretischer Wert vorhanden

+++ nur an T0 detektierbar

++ stark reguliert

+ schwach reguliert

M mitochondriale Signalsequenz

TMD Transmembrandomäne

TPR-Motiv Protein/Protein-Interaktions-Motiv

**Tabelle 3: Amastigoten-spezifische Proteine**

spot Nr.	Regulation der Expression	identifiziertes Protein/Organismus/ Sequenz-Motive	Accession Nr.	MW theor/ exp	pl theor/ exp	übereinstimmende Massen	Signalsequenz /TMD
20	+	CAB55364; <i>L. major</i> Ca <sup>2+</sup> -Bindungsmotiv	5852119	70/36	5,1/5,2	8/34	-
21	++	ATPase β-Untereinheit <i>T. brucei brucei</i>	11908130	55/60	5,28/5	15/43	M
22	++	Hitzeschockprotein 83 <i>L. infantum</i>	6016263	80/90	5,05/5	13/54	-
23	++	Peroxiredoxin <i>L. major</i>	6066432	25/20	6,4/5,1	6/32	M
24	+	Poly-Zink-Finger Protein 1; <i>T. cruzi</i>	3661541	20/40	8,9/5,1	4/24	-
25	+	α-Tubulin <i>L. donovani</i>	606648	49/30	4,8/5,1	10/28	-
26	++	putatives poly(A)-Bindungsprotein <i>L. major</i> 4 RRM-Motive	Lmj F25.0080 <sup>1)</sup>	60/90	8,9/5	7/50	-
27	+++	hypothetisches Protein <i>L. major</i>	Lmj F17.1180 <sup>1)</sup>	97/26	8,5/5,5	7/53	M
28	++	hypothetisches Protein <i>L. major</i>	Lmj F36.0520 <sup>1)</sup>	49/30	7,5/6	5/43	-
29	++	hypothetisches Protein <i>L. major</i>	Lmj F04.0720 <sup>1)</sup>	75/30	8,4/6,2	4/28	-

<sup>1)</sup> Accession Nr. der *L. major* GeneDB Proteindatenbank

\* kein theoretischer Wert vorhanden

- +++ nur an T3 detektierbar
- ++ stark reguliert
- + schwach reguliert
- M mitochondriale Signalsequenz
- TMD Transmembrandomäne
- RRM-Motiv RNA-Bindungs-Motiv

Für den Großteil der identifizierten Proteine korrelierten die theoretisch und experimentell ermittelten Werte für Masse und pI sehr gut. Es gab 10 Ausnahmen, die eine Abweichung des Molekulargewichtes von mehr als 10 kDa zeigten. Nr. 18, 19, 20, 25, 27, 28 und 29 zeigten ein geringeres Molekulargewicht, als das theoretisch errechnete. Bei den hypothetischen Proteinen könnte dies eventuell auf eine falsche Annotation der Proteine in den Datenbanken zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass es sich bei diesen Molekülen um Bruchstücke handelt, die bei der Probenaufbereitung oder aber auch während des normalen Zellstoffwechsels entstanden sind. Hierfür spricht außerdem, dass die *coverage maps* dieser Analysen eine N- oder C-terminale Häufung der übereinstimmenden Peptidfragmente zeigten. Bei Nr. 15, 24 und 26 war das theoretisch errechnete Molekulargewicht größer als das experimentell ermittelte. Das Poly-Zink-Finger Protein (Nr. 24) z.B. hat eine errechnete Masse von 20 kDa, die experimentell ermittelte hingegen liegt bei 40 kDa. Untersuchungen des homologen Poly-Zink-Finger Proteins (TcPZFP) von *T. cruzi* zeigten ebenfalls, dass ein gegen das rekombinante Protein generiertes Antiserum im Western Blot eine 40 kDa Bande erkennt (Espinosa *et al.*, 2003). TcPZFP scheint *in vivo* demnach in einer dimerisierten Form vorzuliegen.

Mit Hilfe der Programme SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), DGPI (<http://dgpi1.pathbot.com>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), MitoProtII (<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>) und TargetP (<http://cbs.dtu.dk/services/TargetP>) wurden die identifizierten Proteine auf vorhandene Signalsequenzen, GPI-Anker, Transmembrandomänen und ihre intrazelluläre Lokalisierung (z.B. Mitochondrien) untersucht. Diese Analyse zeigte, dass fünf der Proteine eine mitochondriale Signalsequenz besitzen (Nr. 15, 19, 21, 23 und 27), sowie eins von ihnen zusätzlich eine Transmembrandomäne aufweist (Nr. 15).

Die hypothetischen Proteine wurden einem BLAST-*search* unterzogen, um eventuelle konservierte Domänen oder Homologien zu bereits identifizierten Proteinen anderer Organismen zu finden. Diese Analyse ergab keine Ergebnisse für die promastigoten-spezifischen hypothetischen Proteine (Nr. 6, 15 und 19). Für das amastigoten-spezifische Protein Nr. 20 konnte ein Calcium-Bindungsmotiv identifiziert werden, außerdem zeigte die Sequenz Homologie zu einem Protein des *outer dynein arm docking complex* (ODA-DC) von *Chlamydomonas reinhardtii*. Das putative poly(A)-Bindungsprotein (Nr. 26) weist 4 sogenannte RRM-Motive auf. Hierbei handelt es sich um RNA-Bindungs-Motive. Für die drei weiteren hypothetischen Proteine (Nr. 27-29) konnten keine konservierten Domänen oder Homologien identifiziert werden.

### 3.1.5 Auswahl amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen

Im Folgenden sollten interessante amastigoten-spezifische Proteine ausgewählt werden, die einer weiterführenden Untersuchung bezüglich ihrer Funktion innerhalb des Parasiten unterzogen werden sollten. Aus Gründen die in 4.1.2 diskutiert werden, wurde ein amastigoten-spezifisches mitochondriales Peroxiredoxin sowie das hypothetische Protein Nr. 20 (CAB55364) ausgesucht.

## 3.2 Das mitochondriale Peroxiredoxin von *L. donovani* (*LdmPrx*)

### 3.2.1 Klonierung des Gens und Analyse der Aminosäuresequenz

Mit Hilfe der von der Sequenz des im Verlauf der MALDI-Analyse identifizierten *L. major* Peroxiredoxins abgeleiteten Oligonukleotide PRX-S26(Nde) und PRX-AS27(Xho) wurde das entsprechenden Gen aus *L. donovani* genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Das 679 Bp große Fragment wurde sequenziert und die Nukleotidsequenz zeigte eine Identität von 98% zu dem entsprechenden *L. major* Gen. In Abb. 5 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des hier untersuchten *L. donovani* Peroxiredoxins, Peroxiredoxinen ausgewählter *Leishmania*-Spezies sowie der entsprechenden Proteine einiger anderer Organismen dargestellt. Das klonierte *L. donovani* Gen kodiert für ein Protein bestehend aus 226 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 25.000 sowie einem berechneten pI von 6,4. Es verfügt über eine 27 Aminosäuren lange mitochondriale Signalsequenz. Dieser Sequenzabschnitt zeigt eine 90%-ige Identität zu den mitochondrialen Signalsequenzen der Peroxiredoxine von *L. infantum* und *L. major* sowie eine 47%-ige Sequenzidentität zu dem *T. brucei* Homolog. Die Homologien der gesamten Sequenz reichen von 55-60% (höhere eukaryotische Organismen wie *Sacharomyces cerevisiae*, *Cenorabhditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*) bis zu über 97% zu anderen *Leishmania*-Spezies, wie *L. infantum* und *L. major*.

*LdmPrx* ist ein 2-Cys Peroxiredoxin. Klassische 2-Cys Peroxiredoxine sind charakterisiert durch zwei hochkonservierte Cysteinreste (Hofmann *et al.*, 2002). Das N-terminale Cystein ist in einem typischen VCP-Motiv (siehe Abb. 5) eingebettet und ist essentiell für die Aktivität verschiedenster untersuchter Peroxiredoxine (Hofmann *et al.*, 2002). Das zweite redox-aktive Cystein ist in der Nähe des C-Terminus lokalisiert und ist normalerweise ebenfalls in ein VCP-Motiv integriert. Im Falle des *LdmPrx* allerdings ist dieses Motiv etwas abgewandelt und besteht aus der Aminosäureabfolge IPC. Dasselbe Motiv findet man ebenfalls bei den homologen Proteinen von *L. infantum*, *L. major*, *T. brucei* und *T. cruzi* (siehe Abb. 5). Alle diese Proteine sind putative Peroxiredoxine mit einer mitochondrialen Signalsequenz. Bei drei dieser Moleküle konnte die vorhergesagte intrazelluläre Lokalisierung bestätigt werden (Castro *et al.*, 2002a; Tetaud *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2000). Auf Grund dieser Tatsachen scheint *LdmPrx* zusammen mit den homologen Proteinen aus *L. infantum*, *L. major*, *T. brucei* und *T. cruzi* zu einer Unterfamilie der Peroxiredoxine zu gehören, die sich von den cytosolischen Enzymen dieser Organismen unterscheidet. Diese zeigen C-terminal ebenfalls das typische VCP-Motiv. Allerdings scheint dieser Sequenzunterschied die enzymatische Aktivität der mitochondrialen Peroxiredoxine nicht zu beeinflussen (Castro *et al.*, 2002a; Castro *et al.*, 2002b; Tetaud *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2000). Das Hefe-Peroxiredoxin ScTSA weist ebenfalls Sequenzunterschiede in dieser Region auf (siehe Abb. 5), zeigt aber trotzdem Peroxiredoxin-spezifische katalytische Aktivität (Chae *et al.*, 1994).

<i>Ld</i> mPRX	MLRRLSTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLDYQMYRTATVR-----EAAPQFSGQAVV-N 52
<i>Li</i> mTXNPx	MLRRLPTSCFLKRSQFRGFAATSPLLNLDYQMYRTATVR-----EAAPQFSGQAVV-N 52
<i>Lm</i> mPrx	MLRRLSTSSFLKRAQFRGFAATSPLLNLDYQMYRTATVR-----EAAPQFSGQAVV-N 52
<i>Tb</i> mTryP	MLRRFSMLPLSGGIARRSFFRTAPLFNLDYQAYRTATVR-----EAAPEFAGKAVV-D 52
<i>Tc</i> MPX	MFRRMAVTSLOKGLSRRAFNTLRLNLDYQAYKTATVR-----EAPEWAGKAVV-N 52
<i>Ce</i> Prx1	-----MFSSAVRALCRTVPVATRQLSTSRALLSLRPLGPKNTVPAFKGTAVV-D 49
<i>Lm</i> TryP	-----MSCGNAKIN-----SPAPSFEEVALMPN 23
<i>Li</i> cTXNPx	-----MSCGDAKIN-----CPAPPFEEVALMPN 23
<i>Dm</i> TPx1	-----MPQLQ-----KPAPAFAGTAVV-N 18
<i>Ov</i> TPx	-----MTLAGSKAFIG-----QPAPNFKTTAVV-N 24
<i>Ce</i> Prx2	-----MSKAFIG-----KPAPQFKTQAVV-D 20
<i>Hs</i> PRDX2	-----MASGNARIG-----KPAPDFKATAVV-D 22
<i>Sc</i> TSA	-----MVAQVQ-----KQAPTFKKTAVV-D 19
<i>Ld</i> mPRX	GAIKEINMNDYKGYIVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSDRHADFEKLTQVAVSCDSVYS 112
<i>Li</i> mTXNPx	GAIKDINMNDYKGYIVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSDRHADFEKLTQVAVSCDSVYS 112
<i>Lm</i> mPrx	GAIKDINMNDYKGYIVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSDRHADFEKLTQVAVSCDSVYS 112
<i>Tb</i> mTryP	GKIKDISMNDYKGYIVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIVSFSDSHAEFEKLTQVAVSCDSVYS 112
<i>Tc</i> MPX	GKIQDISLNDYKGYVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEITAFSDAQAEFDKINTQVAVSCDSVYS 112
<i>Ce</i> Prx1	GDFKVISDQDYKGLVLMFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAYGDRANEFRLSGAEVAVSCDSVYS 109
<i>Lm</i> TryP	GSFKKISLSSYKGLWVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEVIAFSDSVSRFNELNCEVLACSIDSEYA 83
<i>Li</i> cTXNPx	GSFKKISLAAAYKGLWVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSENVSRFNELNCEVLACSMDSEYA 83
<i>Dm</i> TPx1	GVFKDIKLSDYKGYIVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSESAAEFRKINCEVICSTDSQFT 78
<i>Ov</i> TPx	GDFKEISLNQFKGYVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSDRISEFKLDVAVMCAVSCDSVYS 84
<i>Ce</i> Prx2	GEFVDVSLSDYKGYVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSDRAEEFKAVTAVVLAASVSVFS 80
<i>Hs</i> PRDX2	GAFKEVKLSDYKGYVVLFFYPMDFTF <b>VCP</b> TEIIAFSNRAEDFRKLGCEVLGVSVDSQFT 82
<i>Sc</i> TSA	GVFDEVSLDKYKGYVVLAFIPLAF <b>VCP</b> TEIIAFSEAAKFEEQGAQVLFASVSDSEYS 79
<i>Ld</i> mPRX	HLAWGNTPRKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLEESGIALRGLFIIDKKGILRHST 172
<i>Li</i> mTXNPx	HLAWVNTPRKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLEESGIALRGLFIIDKKGILRHST 172
<i>Lm</i> mPrx	HLAWVNTPRKKGGLGEMHIPVLADKSMEIARDYGVLEESGIALRGLFIIDKKGILRHST 172
<i>Tb</i> mTryP	HLAWVETPRKKGGLGEMKIPLLSDF <b>TKE</b> ISRDIYGVLEEQGLSLRALFVIDDKGILRHST 172
<i>Tc</i> MPX	HLAWINTPRKKGGLGEMSIIVLSDLTKEIARDYGVLEEQGISLRLGLFIIDKKGILRHIT 172
<i>Ce</i> Prx1	HLAWVNTPRKDGGLGMDIPLLADFNKKIADSFGLVDKESGLSYRGLFLIDPSGTVRHST 169
<i>Lm</i> TryP	HLQWTLQDRKKGGLGTMAIPLADTKTSIARSYGVLEESRGVAYRGLFIIDPHGMLRQIT 143
<i>Li</i> cTXNPx	HLQWTLQDRKKGGLGAMAIPLADTKTSIARAYGVLAEKQGVAYRGLFIIDPNGMVRQIT 143
<i>Dm</i> TPx1	HLAWINTPRKQGGGLGSMIDIPLLADKSMKVARDYGVLEDEETGIPFRGLFIIDDKQNLRQIT 138
<i>Ov</i> TPx	HLAWVNTTEKWVGLGQMNIPIPLADTNHAIKAYGVLEKEDEGIAIRGLFIIDSKGILRQIT 144
<i>Ce</i> Prx2	HLAWINQPRKHGGLGEMNIIVLADTNHQISRDIYGVLEKEDEGIAFRGLFIIDPSQNLRQIT 140
<i>Hs</i> PRDX2	HLAWINTPRKEGGLGPLNIPLADVTRRLSEDIYGVLEKEDEGIAIRGLFIIDKKGILRQIT 142
<i>Sc</i> TSA	LLAWTNIPRKEGGLGFINIPLADTNHSLSRDIYGVLEEEGVALRGLFIIDPKGIVRHIT 139
<i>Ld</i> mPRX	INDLPVGRNVDEALRVLEAFQYADENGDA <b>IPC</b> GWKPGQPTLDTT--KAGE-FFEKNM- 226
<i>Li</i> mTXNPx	INDLPVGRNVDEALRVLEAFQYADENGDA <b>IPC</b> GWKPGQPTLDTT--KAGE-FFEKNM- 226
<i>Lm</i> mPrx	INDLPVGRNVDEALRVLEAFQYADENGDA <b>IPC</b> GWKPGQPTLDTT--KAAE-FFEKNM- 226
<i>Tb</i> mTryP	INDLPVGRNVDEVLRVVQAFQYADFTGDV <b>IPC</b> NWRPGKETMKVE--AAKE-YFEKNL- 226
<i>Tc</i> MPX	VNDLPVGRNVDEVLRVVQAFQYVDKNGDV <b>IPC</b> NWRPGKPTMKTE--KANE-YFEKNA- 226
<i>Ce</i> Prx1	CNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYSDKHGE <b>VCP</b> ADWHEDSPTIKPGVATSKE-YFNKVNK 226
<i>Lm</i> TryP	VNDMPVGRSVDEVLRLLEAFQFVEKHGE <b>VCP</b> ANWKKGAPTMKPEPKASVEGYFSKQ-- 199
<i>Li</i> cTXNPx	VNDMPVGRNVDEVLRLLEAFQFVEKHGE <b>VCP</b> ANWKKGAPTMKPEPKASVEGYFSKQ-- 199
<i>Dm</i> TPx1	VNDLPVGRSVDETLRLVQAFQYTDKYGE <b>VCP</b> ANWKPQKTMVADPTKSKE-YFETTS- 194
<i>Ov</i> TPx	VNDLPVGRSVDETLRLIQAQFQVFNHGE <b>VCP</b> ANWQPGSETIKPEVKESKE-YFGKH-- 199
<i>Ce</i> Prx2	INDLPVGRSVDETLRLVQAFQFVEKHGE <b>VCP</b> AGWTPGSDTIKPGVKESQE-YFKKH-- 195
<i>Hs</i> PRDX2	VNDLPVGRSVDEALRLVQAFQYTDHEHGE <b>VCP</b> AGWKPQSDTIKPNVDSKE-YFSKH- 198
<i>Sc</i> TSA	INDLPVGRNVDEALRLVEAFQWTDKNGT <b>VLP</b> CNWTPGAATIKPTVEDSKE-YFEAANK 196

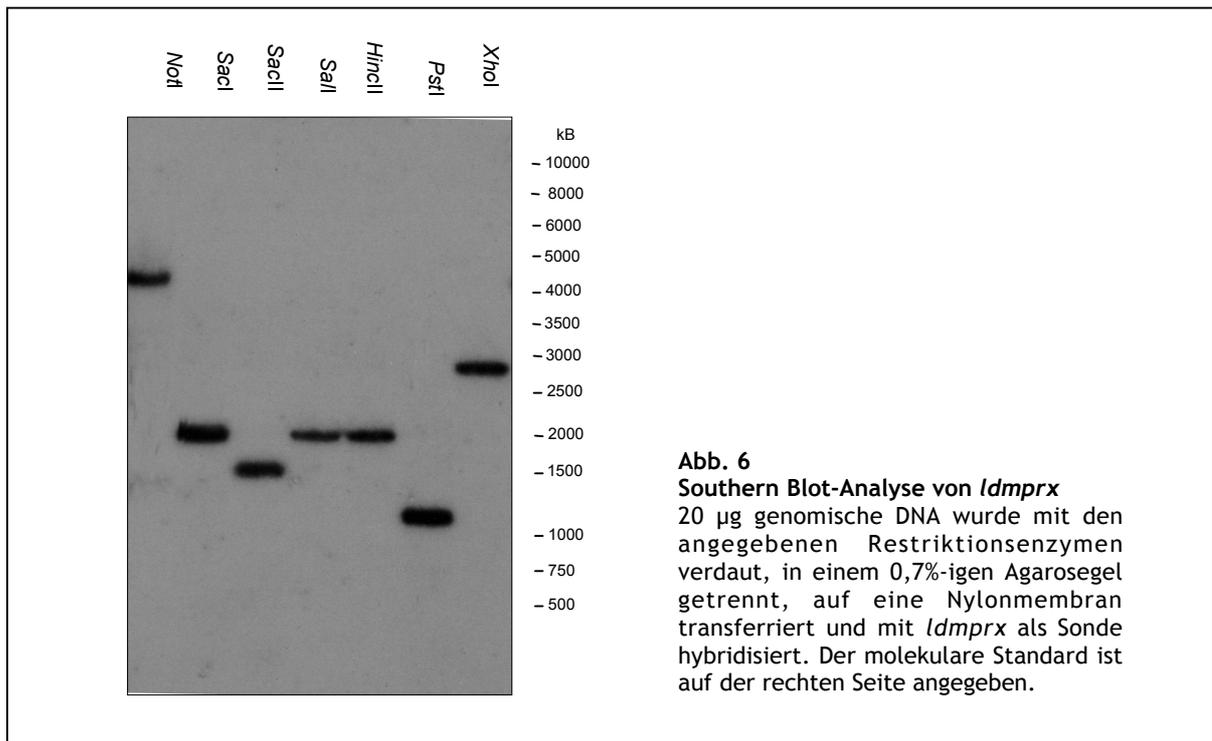
Abb. 5

Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Peroxiredoxine

Dargestellt ist der Vergleich der Peroxiredoxine von *L. donovani* mPrx (Accession Nr. AY941074); *L. infantum* mTXNPx (Acc.Nr. AY058209) und cTXNPx (Acc.Nr. AY058210); *L. major* mPrx (Acc.Nr. 6066432) und TryP (Acc.Nr. AF069386); *T. brucei* Tryp2 (Acc.Nr. AF196570); *T. cruzi* MPX (Acc.Nr. AJ006226); *C. elegans* Prx1 (Acc.Nr. R07E5.2) und Prx2 (Acc.Nr. F09E5.15); *D. melanogaster* TPx1 (Acc.Nr. Q9V3P0); *O. volvulus* TPx (Acc.Nr. AAC48312); *H. sapiens* PRDX2 (Acc.Nr. CAG29352); *S. cerevisiae* TSA (Acc.Nr. A47362) auf Aminosäureebene. Die mitochondrialen Signalsequenzen sind Grau hinterlegt, die konservierten Motive sind in Rot dargestellt.

### 3.2.2 Genomische Organisation von *ldmprx*

Um zu überprüfen in wie vielen Kopien das *ldmprx*-Gen im *L. donovani* Genom vorkommt, wurde genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*NotI*, *SacI*, *SacII*, *Sall*, *HincII*, *PstI* und *XhoI*) verdaut und eine anschließende Southern Blot-Analyse durchgeführt. Es wurde die kodierende Region des *ldmprx*-Gens als Sonde verwendet. Keines der ausgewählten Enzyme weist eine Restriktionsschnittstelle innerhalb des Gens auf. Abb. 6 zeigt, dass für jeden Verdau nur ein einzelnes DNA-Fragment mit der Sonde hybridisiert. Dies bedeutet, dass das untersuchte Gen nur in einer Kopie im Genom vorliegt.

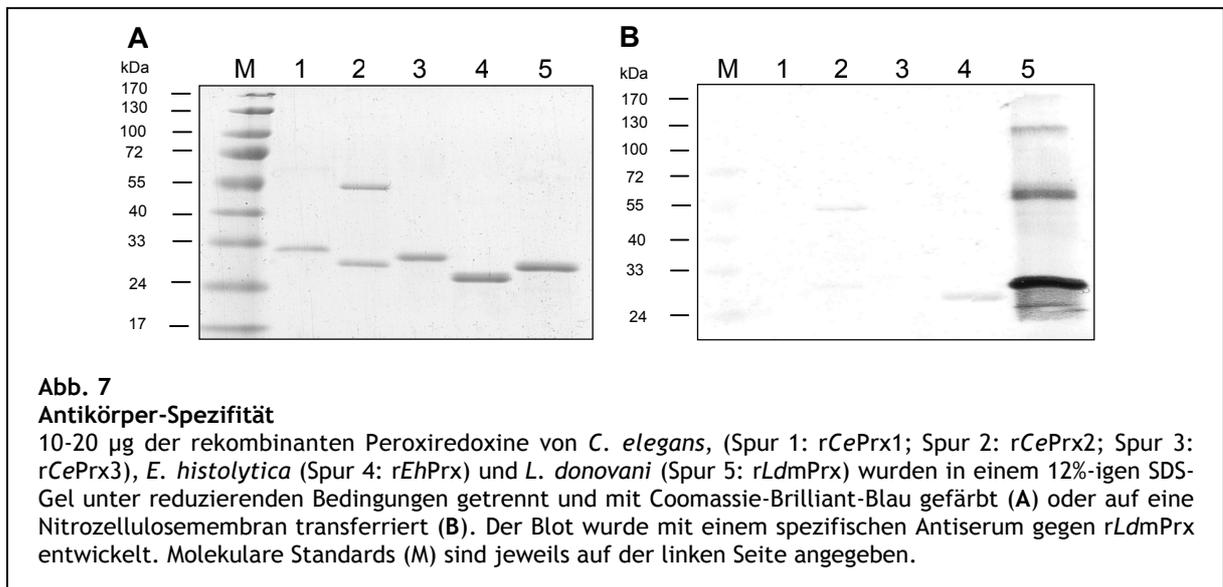


### 3.2.3 Rekombinante Expression von *ldmprx* in *E. coli* und Antikörperproduktion

Um das *LdmPrx* näher zu charakterisieren und seine enzymatischen Fähigkeiten zu untersuchen, wurde es mit einem N-terminalen His-tag rekombinant in *E. coli* Zellen synthetisiert. Das rekombinante Protein wurde anschließend über eine Nickelsäule aus der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenats isoliert. Es sollten außerdem Antikörper gegen dieses rekombinante Protein generiert werden. Das gereinigte Protein zeigte in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa (siehe Abb. 7 A Spur 5). Dies stimmt nach Abzug des Molekulargewichts des His-tags von ca. 3 kDa mit dem theoretisch erwarteten überein. Zusätzlich wurde in einer weiteren MALDI TOF-Analyse die Identität des rekombinanten Proteins bestätigt. Das rekombinante *LdmPrx* (*rLdmPrx*) wurde für eine Immunisierung von Hühnern verwendet und nach zweifachen *booster*-Injektionen konnte ein sehr spezifisches Antiserum aus den Eidottern gewonnen werden. Abb. 7 B zeigt eine Western Blot-Analyse, in der dieses Antiserum gegen

verschiedene rekombinante Peroxiredoxine (aus *C. elegans* und *Entamoeba histolytica*) getestet wurde. Nur rLdmPrx (Spur 5) wird von dem Antiserum erkannt, die Reaktionen mit den anderen Peroxiredoxinen sind im Vergleich dazu zu vernachlässigen.

Das generierte Antiserum war ebenfalls in der Lage, in einem Zelllysate von *L. donovani* promastigoten Zellen der spät-logarithmischen Wachstumsphase eine spezifische Bande von ca. 28 kDa zu erkennen. In Abb. 8 A ist eine Western Blot-Analyse von *L. donovani* Zellextrakten unter reduzierenden (+DTT) und nicht reduzierenden (-DTT) Bedingungen dargestellt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ändert sich die Größe der erkannten Bande auf ca. 50 kDa, was auf eine Dimerisierung des Proteins schließen lässt. Die Fähigkeit von Peroxiredoxinen, Dimere zu bilden, ist schon früher beschrieben worden und wird durch die beiden Cysteine in den konservierten Bereichen vermittelt (Chae *et al.*, 1994; Ellis and Poole, 1997).



### 3.2.4 Enzymatische Aktivität des LdmPrx

#### 3.2.4.1 DNA-Nicking Assay

Peroxiredoxine sind in der Lage, DNA gegen reaktive Sauerstoffspezies zu schützen. Diese Fähigkeit kann in einem so genannten DNA-Nicking Assay überprüft werden. Die reaktiven Sauerstoffspezies werden hierbei generiert, indem DTT mit  $\text{Fe}^{3+}$  inkubiert wird. Dies katalysiert die Reduktion von  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durch die Fenton-Reaktion wird es weiter zu Hydroxylradikalen umgewandelt (Lim *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 1994). Diese Hydroxylradikale sind in der Lage, Einzelstrangbrüche sowie chemische Veränderungen der Basen und Desoxyribosen von DNA hervorzurufen (Cochrane, 1991). Plasmide liegen größtenteils in einer Struktur vor, die als superspiralisiert (*supercoiled*) bezeichnet wird. Durch Einzelstrangbrüche des DNA-Doppelstrangs kommt es zu einer Konformationsänderung, die als *nicked* Form bezeichnet wird. Beide Formen zeigen ein

unterschiedliches Laufverhalten in Agarosegelen, was sich bei dem DNA-Nicking Assay zu Nutze gemacht wird. Abb. 8 B zeigt, dass in Anwesenheit von DTT und Fe<sup>3+</sup> ein Teil des eingesetzten Plasmides pUC18 nach 1 h Inkubationszeit in die *nicked* Form überführt wurde (siehe Abb. 8 B Spur 3). Die Zugabe von *rLdmPrx* verhinderte diesen Effekt (siehe Abb. 8 B Spur 7). Der Einsatz von BSA hingegen zeigte überhaupt keine Auswirkungen (siehe Abb. 8 B Spur 8). Spur 4-6 zeigen, dass der Grad der Protektion mit der eingesetzten Menge an *rLdmPrx* korreliert.

### 3.2.4.2 Thiol-Peroxidase-Aktivität

Der mögliche Abbau von Peroxiden durch *rLdmPrx* wurde anhand der Ferrithiocyanat-Methode in Anwesenheit von DTT untersucht. Wie in Abb. 8 C gezeigt wird war *rLdmPrx* in der Lage, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und t-BOOH in Anwesenheit von 3 mM DTT zu reduzieren. Die Konzentrationsabnahme der Peroxide ist abhängig von der eingesetzten Menge an rekombinantem *LdmPrx*.

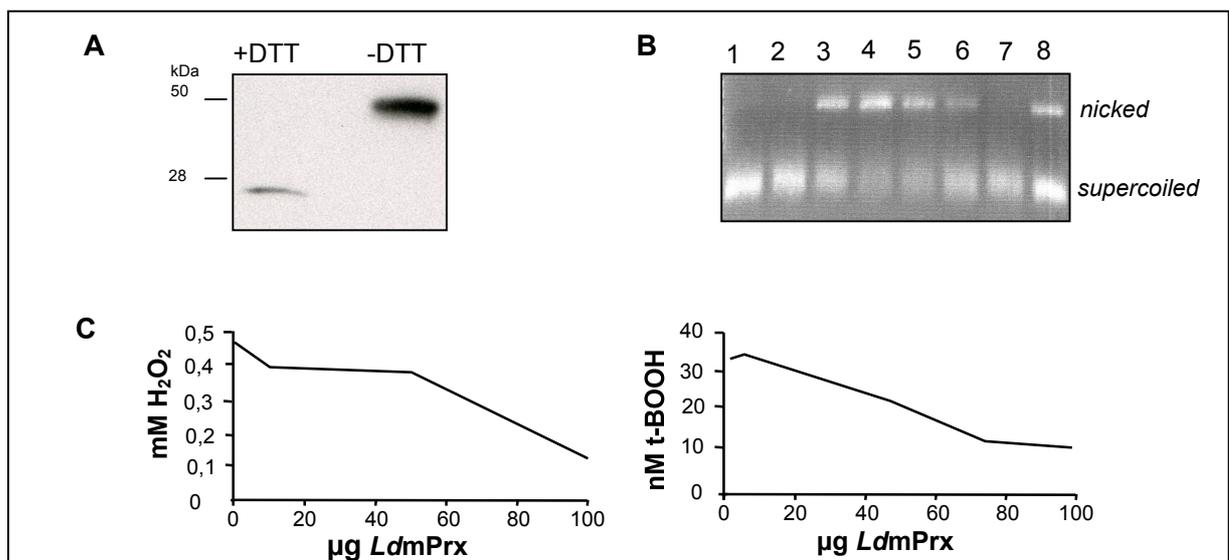


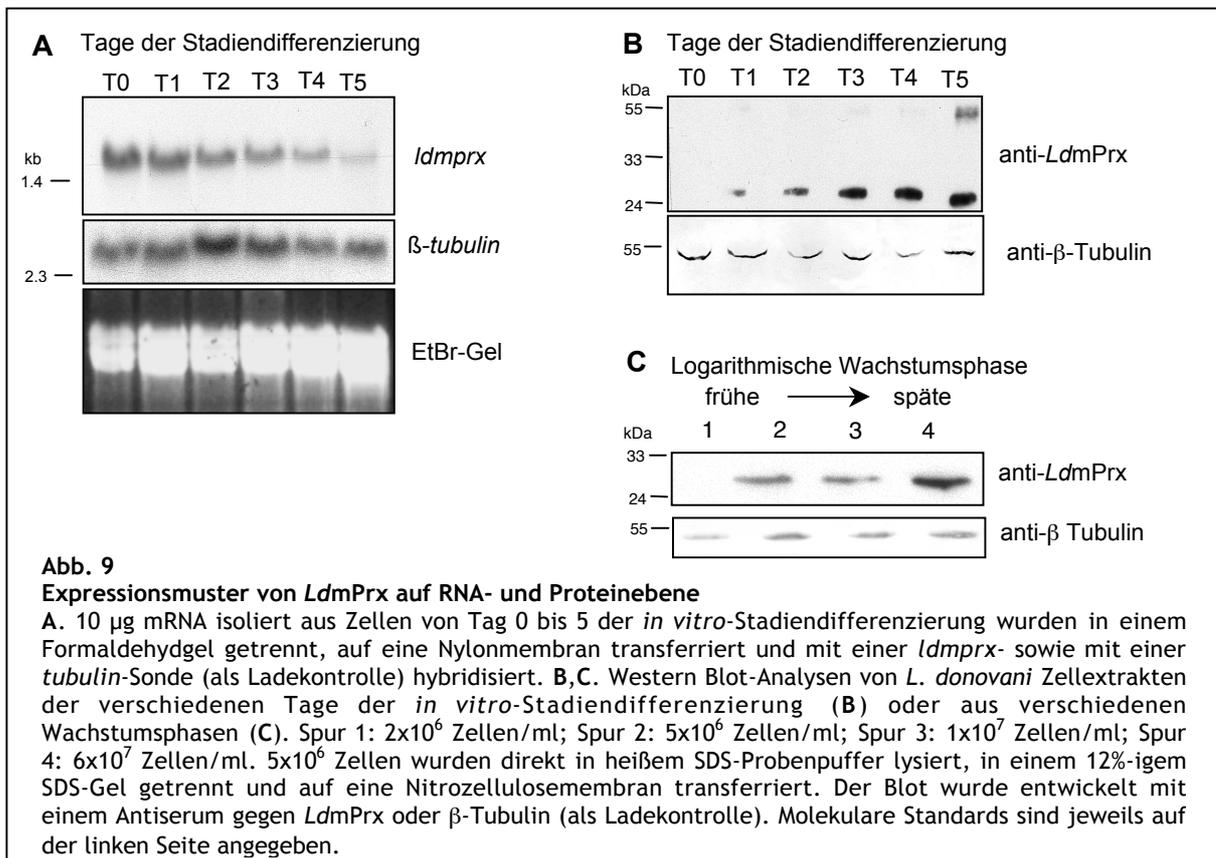
Abb. 8

**Biochemische Charakterisierung von *LdmPrx***

A. Western Blot mit *L. donovani* Zellextrakten. 5x10<sup>6</sup> promastigote Zellen aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden direkt in heißem SDS-Probenpuffer unter reduzierenden (+DTT) und nicht reduzierenden (-DTT) Bedingungen lysiert, in einem 12%-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot wurde mit einem Antiserum gegen *LdmPrx* mit einer Verdünnung von 1:500 entwickelt. Molekulare Standards sind auf der linken Seite angegeben. B. DNA-Nicking-Assay. Das Reaktionsgemisch bestehend aus 0,1 mM HEPES (pH 7,2), 3,3 µM FeCl<sub>3</sub>, 10 mM DTT, 5 mM EDTA (pH 8) und verschiedenen Konzentrationen von *rLdmPrx* wurden in einem 50 µl Reaktionsvolumen für 3 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde 1 µg superspiralierter pUC18 Plasmid-DNA zugefügt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einem 1%-igen Agarosegel getrennt. Spur 1: nur DTT; Spur 2: nur FeCl<sub>3</sub>; Spur 3: DTT+FeCl<sub>3</sub>; Spur 4: DTT+FeCl<sub>3</sub>+*rLdmPrx* (25µg/ml); Spur 5: DTT+FeCl<sub>3</sub>+*rLdmPrx* (50µg/ml); Spur 6: DTT+FeCl<sub>3</sub>+*rLdmPrx* (100µg/ml); Spur 7: DTT+FeCl<sub>3</sub>+*rLdmPrx* (250µg/ml); Spur 8: DTT+FeCl<sub>3</sub>+BSA (250µg/ml). C. Thiol-Peroxidase-Aktivität. Die Reaktionsgemische (1ml Reaktionsvolumen) bestehend aus 25 mM HEPES (pH 7,0) und *rLdmPrx* Protein (5-100 µg) wurden 10 min bei 37°C mit 3 mM DTT prä-inkubiert. Anschließend wurden 480 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 700 nM t-BOOH hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TCA gestoppt und die verbleibende Menge an Peroxid mit Hilfe der Ferrithiocyanat-Methode bestimmt.

### 3.2.5 Expressionsmuster von *Ldmprx*

Um das Expressionsmuster von *Ldmprx* im Verlauf der Transformation vom promastigoten zum amastigoten Stadium zu untersuchen, wurde RNA von allen Tagen der *in vitro*-Stadiendifferenzierung aus *L. donovani* isoliert. Eine Northern Blot-Analyse dieser RNA mit der kodierenden Region von *Ldmprx* als Sonde zeigte ein einzelnes Transkript von ca. 1,5 kB für alle Tage der Differenzierung mit einer leicht abnehmenden Intensität hin zu Tag 5 (siehe Abb. 9 A). Die Untersuchung des Expressionsverlaufes auf Proteinebene bestätigte im Gegensatz dazu die Ergebnisse der Proteomanalyse. Abb. 9 B zeigt eine Western Blot-Analyse, angefertigt mit Zellextrakten von Tag 0 bis 5 der Stadiendifferenzierung. Der Blot wurde entwickelt mit dem in 3.2.3 beschriebenen polyklonalen Antiserum und zeigt eine deutliche Zunahme der Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung. Die eingesetzte Konzentration an DTT reichte nicht aus, um die gesamte Menge an Protein, die an Tag 5 vorhanden war, zu reduzieren. Dieses wird deutlich durch das Vorhandensein der dimerisierten Form von *LdmPrx* mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Um zu überprüfen, ob sich die Proteinmenge von *LdmPrx* während der Zellkultur promastigoter Zellen im Verlauf der einzelnen Wachstumsphasen verändert, wurde eine zusätzliche Western Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des logarithmischen Wachstums geerntet. In Abb. 9 C ist die Proteinmenge von *LdmPrx* während der verschiedenen Wachstumsphasen gezeigt. Die Proteinmenge nimmt im Kulturverlauf deutlich zu. Diese Ergebnisse zeigen, dass *LdmPrx* eine klare Regulation erfährt und die Proteinmenge in verschiedenen Stresssituationen (Hitzeschock und pH-Erniedrigung, sowie dichter werdende Zellkultur) zunimmt.

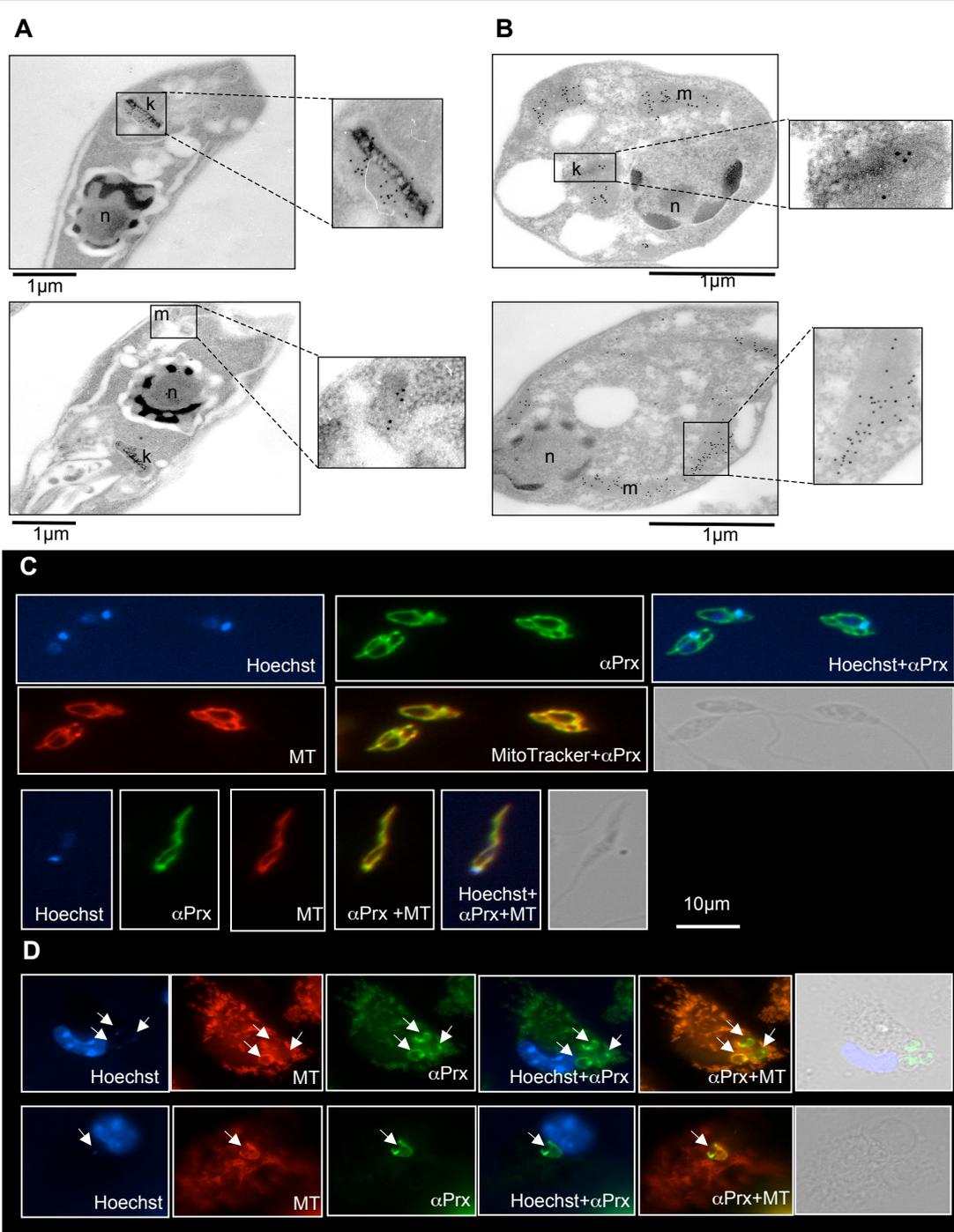


Die intrazelluläre Lokalisierung von *LdmPrx* wurde mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz-Studien überprüft. Die elektronenmikroskopische Analyse, durchgeführt mittels Immunogold-Markierung mit dem spezifischen *LdmPrx* Antiserum an Ultradünnschnitten von *L. donovani* Promastigoten und *in vitro* induzierten amastigoten Zellen, zeigte eine Lokalisierung des Proteins innerhalb des schlauchförmigen Mitochondriums (siehe Abb. 10 A und B). *Leishmania*-Zellen und andere Trypanosomatiden besitzen ein einzelnes großes Mitochondrium. Das mitochondriale Genom ist in einem elektronendichten Abschnitt zwischen Zellkern und Flagellartasche lokalisiert, dem Kinetoplast. Promastigote Zellen weisen nur innerhalb dieser Region eine Markierung auf (Abb. 10 A, Vergrößerungen), wohingegen amastigote Zellen Markierungen zeigen, die über das gesamte Organell verteilt (Abb. 10 B, Vergrößerungen) und in einer weitaus größeren Menge vorhanden sind. Dies bestätigt nochmals die in der Proteomanalyse beobachtete Erhöhung der Proteinmenge. Immunfluoreszenz-Analysen verdeutlichten noch einmal den korrekten Transport des Proteins in das Mitochondrium. Die Färbung der Parasiten mit dem spezifischen *LdmPrx* Antiserum kolokalisiert einwandfrei mit dem *MitoTracker*-Signal (siehe Abb. 10 C und D). Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff der spezifisch die Mitochondrien anfärbt. Promastigote aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 10 C) und *in vivo*-induzierte amastigote Zellen (Abb. 10 D) zeigen eine Färbung über das gesamte Mitochondrium, die speziell bei den promastigoten Zellen besonders stark in der Region um den Kinetoplast zu beobachten war. Dies wird durch eine Übereinanderlagerung der *LdmPrx*- und Hoechst-Färbung deutlich.

### 3.2.7 Versuch der Generierung einer *Δmprx knock-out* Mutante

#### 3.2.7.1 DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination

Eine Möglichkeit, die Funktion eines bestimmten Proteins in einem Organismus *in vivo* zu untersuchen, ist die des gezielten Gen-*knock-outs*. Hierbei werden über homologe Rekombination die beiden Allele eines Gens nacheinander durch Selektionsmarker ersetzt, die den transfizierten Zellen eine Resistenz gegenüber den entsprechenden Antibiotika verleihen. Für Parasiten der Ordnung Kinetoplastida wurde dies zum ersten Mal 1990 beschrieben (Cruz and Beverley, 1990). Wie in 3.2.2 gezeigt liegt das *ldmprx*-Gen in nur einer Kopie im Genom vor und kann daher theoretisch in zwei Transfektionsrunden durch die eingesetzten Selektionsmarker ersetzt werden. In Abb. 11 ist der Aufbau der verwendeten DNA-Konstrukte schematisch dargestellt. Es wurden die 5`- und 3`-untranslatierten Bereiche (UTR) des entsprechenden Gens aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide wurden mit den angegebenen Restriktionsschnittstellen versehen und als Konstruktionsvektor diente das Plasmid pUC19. Nacheinander wurden erst die 5`-UTR, über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI*, und dann die 3`-UTR, über die Schnittstellen *BamHI* und *HindIII* in das entsprechend behandelte Plasmid ligiert.



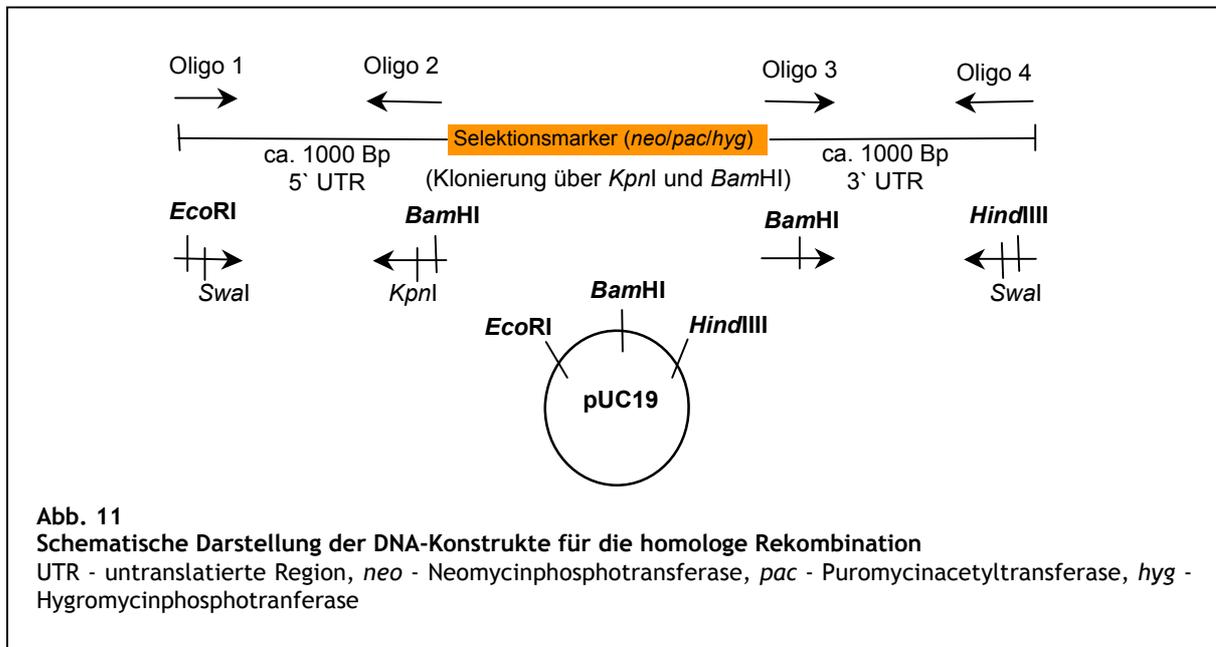
**Abb. 10**

**Intrazelluläre Lokalisierung von *LdmPrx***

Das Peroxiredoxin wurde mittels Immun-Elektronenmikroskopie lokalisiert. Promastigote *L. donovani* Zellen (A) und *in vitro*-induzierte amastigote Zellen (B) wurden mit einem spezifischen *LdmPrx* Antiserum analysiert. n, Zellkern; k, Kinetoplast; m, Mitochondrium.

*L. donovani* Promastigote (C) und intrazelluläre Amastigote (D) wurden mit einem spezifischen Mitochondrien-Farbstoff (*MitoTracker*, MT) inkubiert und einer Immunfluoreszenz-Analyse mit einem spezifischen *LdmPrx* Antiserum unterzogen. DNA-haltige Organellen wurden mit Hoechst angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung photographiert. Intrazelluläre Amastigote in D sind mit Pfeilen markiert.

Als letzter Schritt erfolgte die Ligation der Selektionsmarker mit Hilfe der Restriktionsenzyme *KpnI* und *BamHI*. Es wurden die Gene für die Neomycinphosphotransferase (*neo*), die Puromycinacetyltransferase (*pac*) bzw. die Hygromycinphosphotransferase (*hyg*) verwendet. Für die Transfektionen wurden lineare DNA-Fragmente eingesetzt, die durch den Verdau der jeweiligen Konstrukte mit dem Enzym *SwaI* erhalten wurden.



### 3.2.7.2 Amplifikation der 5`-und 3`-UTR

Da in den Datenbanken nur die genomischen Sequenzen der untranslatierten Bereiche von *L. major* vorhanden waren, sollte versucht werden mit aus diesen Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden (siehe 2.1.4) die entsprechenden UTR des *mprx*-Gens aus *L. donovani* zu amplifizieren. Gleichzeitig wurden ebenfalls die entsprechenden DNA-Abschnitte aus *L. major* DNA amplifiziert. Es konnte schon vorher gezeigt werden, dass es möglich ist, mit den *L. major* Sequenzen ein Rekombinationsereignis in *L. donovani* hervorzurufen (Krobitch and Clos, 2000).

Die Amplifikation von *L. donovani* DNA mit aus *L. major* Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden war nur für die 3`-UTR möglich. Für die 5`-UTR konnte trotz wiederholter Versuche und Optimierung der PCR-Bedingungen kein Amplifikat der richtigen Sequenz erhalten werden. Die aus *L. donovani* amplifizierte 3`-UTR des *mprx*-Gens zeigte eine Identität von 82,8% (siehe Abb. 12) zu der entsprechende *L. major* Sequenz. Letztendlich war es nur möglich, Vektoren bestehend aus 3`-und 5`-UTR des *L. major mprx*-Gens und den jeweiligen Selektionsmarkern (*neo*, *pac* und *hyg*) zu konstruieren. Diese Vektoren werden im Folgenden als  $\Delta lmmprx:neo$ ,  $\Delta lmmprx:pac$  und  $\Delta lmmprx:hyg$  bezeichnet.

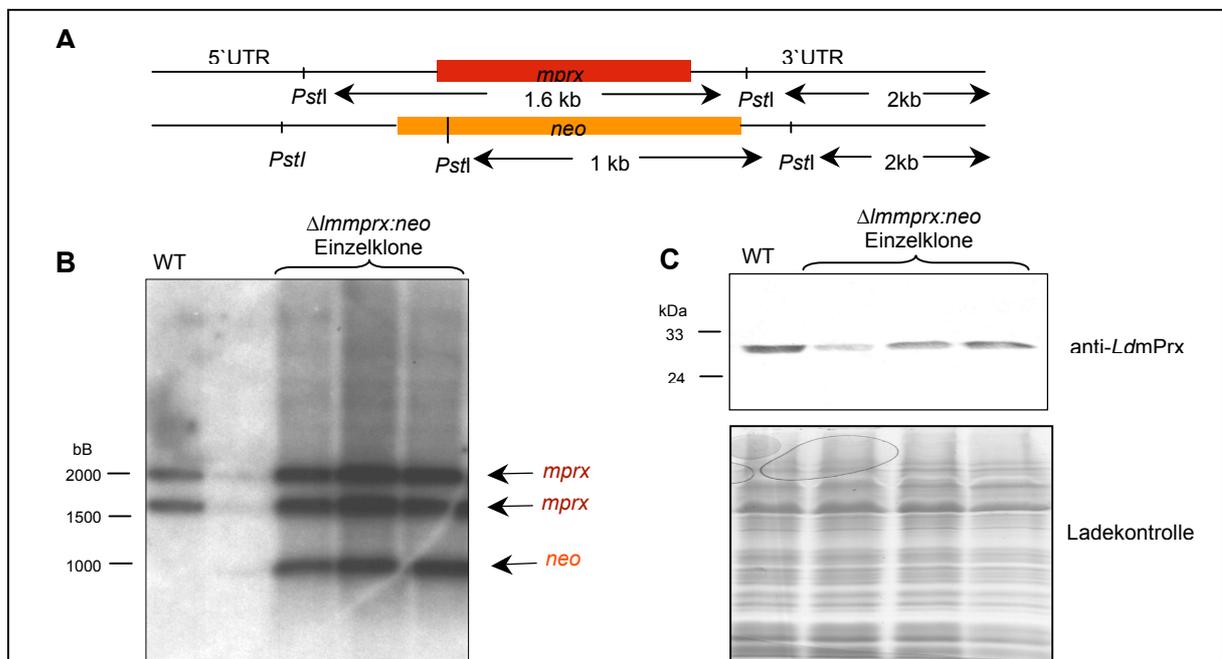
<i>L. donovani</i>	TTCCTTTACCTATACACGTGCTTATATATATTCTCGGCTTCTCTCTGAGAGAGGAAAGA	60
<i>L. major</i>	TTCCTTTACCTATACACGTGTTTATATATATTATCGGCTTTTACTCTGAGAGAGCAAAGA	60
<i>L. donovani</i>	AAGCTTTTGTGAAAGAAAAACGTAAACGCGCTGATAGGGGAGAGAAACAAAAACAACCG	120
<i>L. major</i>	AAGCTTATTAGC-ACGGAAAAACGTAAATGTGCTGATAGGGGAAGAAACAAAAACAACCG	119
<i>L. donovani</i>	CAGCCGAGACATTTT-----TTCGAGGAGGTAGAGAAAACCCATCGGTGTCTAGAAGG	173
<i>L. major</i>	CAGCCGAGACATTTTGTTTGTGTTGGAGGAAGTAGAGGAGGCCCATCGGTGTCTAGAAGA	179
<i>L. donovani</i>	CAATACCGCACTGTGGGACAGTGACAGAGGTCGGAGAGGAGAG--AGGGGGAAGCTAAAG	231
<i>L. major</i>	CAATACCGCAGTGTGAGACAGTGACAGAGGTCGGCAGAGGAGAGGTAGGGGGAAGCTCAAA	239
<i>L. donovani</i>	TGAGTGCTGCATCATGTGTGCATGTCTCTCTGGCTGCTTCTCAACTTTTTCGTCCGGCTT	291
<i>L. major</i>	TGAGTGCTGTATCATGTATGCATGTCTCTCTGGCTGCTTCTCAGCTTTTTCGTCCGGCTT	299
<i>L. donovani</i>	TCACTCGACTGTGCTCCTGCTTCAGACCTTCTTCTTGGGATCATTCGACGTGCTTTTCTT	351
<i>L. major</i>	CCACTGGACTGTGGCCTGCTCCAACCTTCGACGTGGGATGATTCGATG-----	349
<i>L. donovani</i>	TTGGCACTTTTCTTTTATCAGTGACTGATACGGACGCTGTGCTGCAGAGAATCAAGAGG	411
<i>L. major</i>	-----ACTCTTTCTTTTATCAGTGACTGATACCGATACTGTGCTGCAGAGAATCGAGAAA	404
<i>L. donovani</i>	AAAAGCAGAACAGCGGCAGGGCGTGGATGGCCAATCCTTTA-TTGCCTCTTTCAGTGGT	470
<i>L. major</i>	AAAAGCGAAAGGCGGCAGGGCTCGATGGCCAATCGTTAGTTGTGTGTCTCAGTGAT	464
<i>L. donovani</i>	GCCTCTCTAAGTGGCGGAGTGA--CTGCACGTGATGGATGACG---TAACAATAAGCA	525
<i>L. major</i>	GCCTCTCTAGGTGGCGGAGTGGGCTGCACGTGATGGACGACGACGTAGCGCAATAACGG	524
<i>L. donovani</i>	CCCCAG-----ATCAAACAGTCACCGTGTCTT-TTTTAAATATCCTTGGCCAAACCTCCT	577
<i>L. major</i>	CTTCAGTCGACAGATCGAACAAAGCACCGTGTGGTTTTCAGTATCCCTGGCCACTCTCCT	584
<i>L. donovani</i>	GTTTGGGGCGCGCTGAATGCGAGCTTTTG----AGCTCCACTTGTCTCCTCATCAAACGA	633
<i>L. major</i>	GGTATGGGGCGCTTGAATGCGAGCTTTTGTTTGGAGCTCCACTTGTCTGCTCATCAAATGG	644
<i>L. donovani</i>	CTACACTCCGACCTTCTTGTCTCTTTTCTCTCACTTCTGTGGCACCTGTGTCTTTG	693
<i>L. major</i>	CCACACTCCGACCTCCCTTGTCTTTTTTTTGTG-CACTTTGTGGCACCTGTGTCTTTG	703
<i>L. donovani</i>	CTCTCCGCCGTTGTCAACTTCAACAGGAGGAGAAACCCTCTGCTGTAGAAATCACGAG	753
<i>L. major</i>	CTGTCCGTTCTTCCAACTTCAACAGGAGGAGAAACCCTGACTGTAGCAATCACGAT	763
<i>L. donovani</i>	TCAGTGGGGAAAAAGGAGACGAGGTGCCAAGTGCCTTTTCGCGCATCGGAATGTCTCGT	813
<i>L. major</i>	CCAGTGGGG-ACAAAGGAGACGAGGTGTCGAGTGCCATTTTCGACGATCGGAATGTCTCGT	822
<i>L. donovani</i>	ATGAGCGTCCCGCCGAAGGTCGGGCAGCGCCCCGGCATTGCTGTTGAGAAGCGACCAAT	873
<i>L. major</i>	ACGAGCGTCCCGCCGAAGGTCGGGCAGCGCCCCGGCATTGGTGTGAGAAGACGACCAAT	882
<i>L. donovani</i>	CCAAAGGTATTTTTCGATATCAGCATTGACAACAAGGCAGCCGGCGCATGGTCATGGAG	933
<i>L. major</i>	CCAAAGGTATTTTTCGATATCAGCATTGACAACAAGGCAGCTGGCCGCATGTGTCATGGAG	942
<i>L. donovani</i>	CTGTACGCCGACACAGTTCCCAAGACGGTCGAGAATTTCCGGGCTCTGTGCACGGGGAG	993
<i>L. major</i>	CTGTACGCCGACACGGTTCCCAAGACGGCCGAGAATTTCCGGGCTCTGTGCACGGGAGAG	1002

**Abb. 12**  
**Sequenzvergleich der 3`-untranslatierten Regionen des *mprx*-Gens von *L. donovani* und *L. major***  
 Die sich unterscheidenden Nukleotide sind in Rot, identische in Schwarz dargestellt.

### 3.2.7.3 Generierung eines Ein-Allel *knock-out* des *mprx*-Gens in *L. major*

Nach Transfektion von *L. donovani* mit den aus *L. major* DNA amplifizierten Konstrukten konnten trotz wiederholter Versuche keine viablen Zellen generiert werden. Da nicht klar war, ob dies auf eine eventuelle Letalität auch schon eines Ein-Allel Gen-*knock-outs* oder auf die Sequenzunterschiede der verwendeten UTR zurückzuführen war,

wurde außerdem versucht, die entsprechende *knock-out* Mutante in *L. major* zu generieren. Transfektion von *L. major* Zellen mit dem Konstrukt  $\Delta lmmprx:neo$  führten zu dem erfolgreichen Austausch eines Allels des *mprx*-Gens. Nach Selektion und Vereinzlung der Zellen konnten mehrere Klone dieser Mutanten angezogen werden, die im Folgendem  $\Delta mPrx^{+/n}$  genannt werden. In Abb. 13 B ist die erfolgreiche Integration der DNA-Kassette in den *mprx*-Genlocus dargestellt. Die Restriktionskarte dieses Locus (siehe Abb. 13 A) zeigt die darin enthaltenen *Pst*I Schnittstellen und die Größen der bei einem Verdau mit diesem Enzym entstehenden Fragmente. Eine Southern Blot-Analyse der *Pst*I verdauten DNA von *L. major* WT und  $\Delta mPrx^{+/n}$  Zellen zeigte bei Hybridisierung mit einer *mprx* 3'-UTR Sonde die entsprechenden Signale für das WT-Allel (1,6 und 2 kb), sowie bei den  $\Delta mPrx^{+/n}$  Mutanten eine zusätzliche Bande bei 1000 Bp, die ausschließlich bei erfolgreicher Integration der DNA-Kassette entsteht (siehe Abb. 13 B). Western Blot-Analysen von Extrakten dieser Zellen wiesen eine deutliche Verringerung der Proteinmenge im Vergleich zum WT auf (siehe Abb. 13 C). Um das relativ schwache Signal des mPrx Proteins in promastigoten Zellen sichtbar zu machen, wurde die doppelte Proteinmenge (das Äquivalent von  $1 \times 10^7$  Zellen) und eine wesentlich schwächere Antikörperverdünnung (1:500) im Vergleich zu den anderen Analysen dieser Arbeit eingesetzt. Bei dem Versuch in einer weiteren Transfektionsrunde das zweite Allel des *mprx*-Gens zu ersetzen, konnten leider trotz wiederholter Versuche mit keinem der beiden eingesetzten Konstrukte ( $\Delta lmmprx:pac$  und  $\Delta lmmprx:hyg$ ) überlebensfähige Zellen angezogen werden.



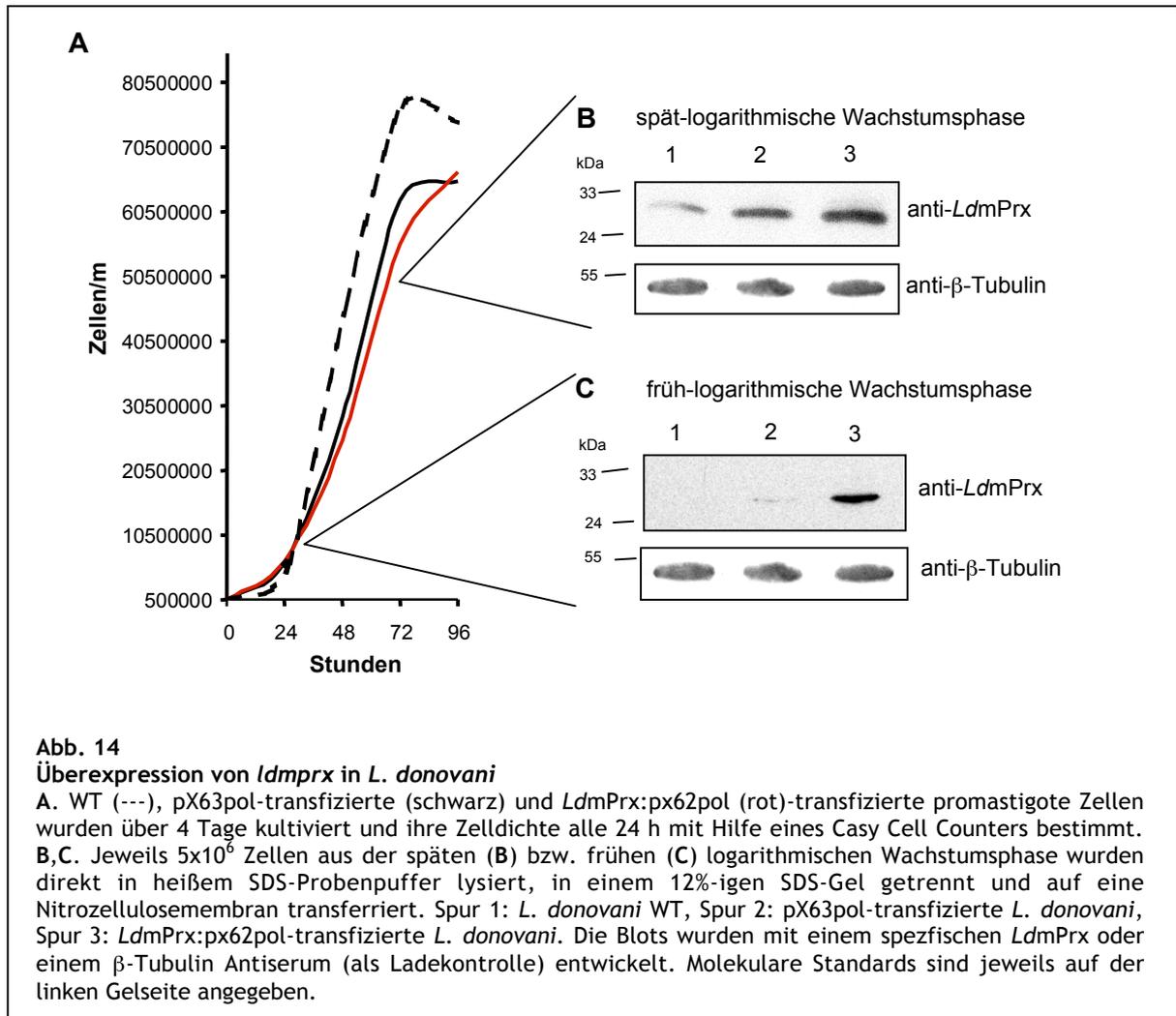
**Abb. 13**  
**Ein-Allel *knock-out* des *mprx*-Gens in *L. major***

**A.** Restriktionskarte des *mprx*-Genlocus. mPrx (rotes Rechteck) und Neomycinphosphotransferase (oranges Rechteck) werden von links nach rechts transkribiert. (UTR - untranslatierte Region, *neo* - Gen für die Neomycinphosphotransferase) **B.** Genomische DNA von *L. major* WT und  $\Delta mPrx^{+/n}$  Zellen wurde mit *Pst*I verdaut, in einem 0,7%-igem Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *mprx* 3'-UTR Sonde hybridisiert. **C.**  $1 \times 10^7$  promastigote *L. major* WT bzw.  $\Delta mPrx^{+/n}$  Zellen wurden direkt in heißem SDS-Probenpuffer lysiert, in einem 12%-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot wurde mit einem spezifischen LdmPrx Antiserum bei einer Verdünnung von 1:500 entwickelt. Molekulare Standards sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

### 3.2.8 Überexpression von *ldmprx* in *L. donovani*

#### 3.2.8.1 Klonierung des Vektors, Transfektion und Kontrolle der Überexpression

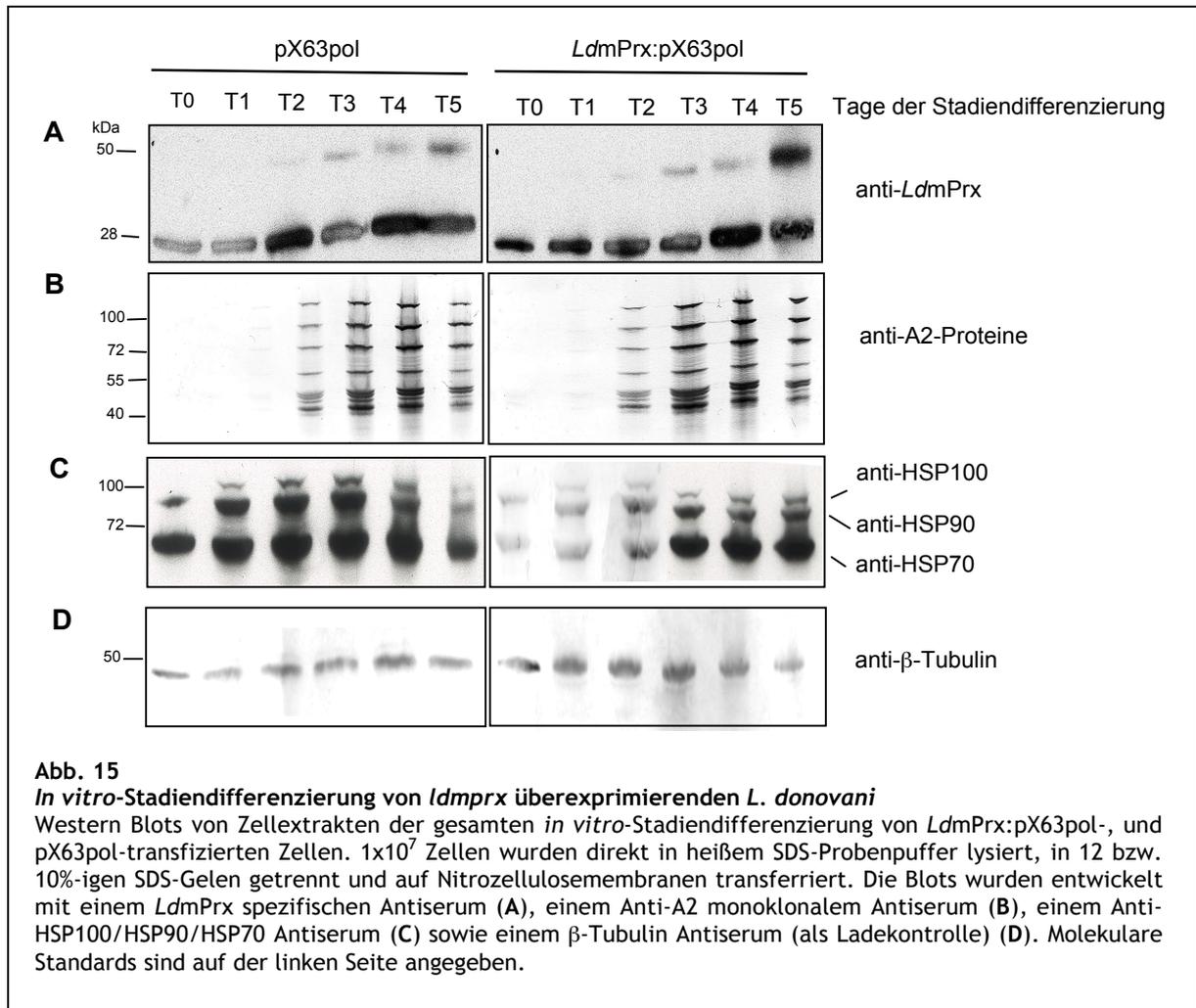
Da der gezielte Gen-*knock-out* von *mprx* weder in *L. donovani* noch in *L. major* Zellen möglich war, sollte die Funktion des Proteins nun anhand von überexprimierenden Zellen untersucht werden. Dazu wurde der Leishmanien-spezifische Expressionsvektor pX63polPHLEO verwendet. Dieser Vektor wird episomal in den Leishmanien etabliert, verleiht ihnen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Bleocin und erlaubt eine konstitutive Synthese der entsprechenden Proteine. Das in 3.2.1 amplifizierte *ldmprx*-Gen wurde ebenfalls zur Klonierung dieses Vektors verwendet. Die 5'-Überhänge, die bei einem Verdau des amplifizierten Produkts mit *NdeI* und *XhoI* entstehen, wurden in einer *Fill-In* Reaktion aufgefüllt und in einer *blunt end*-Ligation in die *EcoRV* Schnittstelle der *multiple cloning site* des pX63polPHLEO Vektors ligiert. Die richtige Orientierung des Gens wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Nach Transfektion von *L. donovani* promastigoten Zellen mit dem entstandenen Vektor *LdmPrx*:pX63pol wurden die Zellen vereinzelt und die Überexpression von *ldmprx* im Western Blot überprüft. Es wurde nur mit dem Klon weitergearbeitet, der die höchste Syntheserate des Proteins zeigte. Zusätzlich wurden Zellen mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert, die im Folgenden als Kontrollzellen verwendet werden. In Abb. 14 A sind die Wachstumsraten der transfizierten Zellen im Vergleich zum WT dargestellt. Es sind keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zu erkennen. Abb. 14 B und C zeigen die vorhandenen Proteinmengen von *LdmPrx* in den transfizierten sowie auch in den WT Zellen. WT Zellen aus der früh-logarithmischen Wachstumsphase zeigen wie erwartet überhaupt keine Synthese des Proteins (Abb. 14 C Spur 1), die Transfektion von pX63pol führt zu einer leichten Erhöhung der Proteinmenge (Abb. 14 C Spur 2), wohingegen bei den *LdmPrx*:pX63pol transfizierten Zellen eine deutliche Steigerung zu erkennen ist (Abb. 14 C Spur 3). Zellen aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase dagegen zeigen ein anderes Muster. Es ist wie auch schon in 3.2.5 beschrieben eine leicht erhöhte Synthese des Proteins im WT zu erkennen (Abb. 14 B Spur 1). Diese Menge nimmt dann noch einmal deutlich zu bei Transfektion der Zellen mit pX63pol (Abb. 14 B Spur 2) und nachfolgender Selektion. Sie zeigt ebenfalls noch eine Steigerung nach Transfektion mit *LdmPrx*:pX63pol (Abb. 14 B Spur 3). Diese Untersuchungen zeigen eine weitere Stresssituation (Antibiotikaselektion), zusätzlich zu den in 3.2.5 bereits erwähnten, unter denen die Expression von *ldmprx* hochreguliert wird. Um sicher zu sein, dass eventuelle Unterschiede bei den nachfolgenden Untersuchungen auf die veränderte Expression von *ldmprx* zurückzuführen sind, wurde im Folgenden ausschließlich mit transfizierten Zellen aus der früh-logarithmischen Wachstumsphase weitergearbeitet.



### 3.2.8.2 Auswirkung der Überexpression von *LdmPrx* auf andere stadienspezifische Proteine

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *LdmPrx* eine Auswirkung auf die Synthese anderer stadienspezifischer Proteine hatte, wurde eine *in vitro*-Differenzierung mit *LdmPrx*:pX63pol sowie pX63pol-transfizierten Parasiten unter kontinuierlicher Antibiotikaselektion durchgeführt. Western Blot-Analysen von Zellextrakten dieser *in vitro*-Stadiendifferenzierung zeigten, dass die Synthese von *LdmPrx* über den gesamten Prozess deutlich erhöht ist (siehe Abb. 15 A). Die Mitglieder der *L. donovani* A2-Genfamilie sind bereits als amastigoten-spezifisch exprimiert bekannt (Charest and Matlashewski, 1994). Ihre Genprodukte dienen als Marker-Proteine für dieses Stadium der Parasiten. Während der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani* sind sie von Tag 2 bis Tag 5 zu detektieren. Die Überexpression von *LdmPrx* zeigt keine Auswirkungen auf die Expression dieser Genfamilie im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abb. 15 B). Hübel et al. konnten zeigen, dass die Expression von *hsp100* im promastigoten Stadium von *L. donovani* nicht nachzuweisen ist, wohl aber nach dem Hitzeshock während der *in vitro*-

Stadiendifferenzierung (Hubel *et al.*, 1997). Auch bei diesem Protein zeigten die überexprimierenden Zellen keinerlei Veränderung im Synthesemusters (siehe Abb. 15 C). Die Überexpression von *ldmprx* in *L. donovani* zeigte keinen Einfluss auf die Syntheseprofile der untersuchten anderen stadien-spezifischen Proteine.



### 3.2.8.3 Auswirkung der Überexpression von *ldmprx* auf den Schutz vor oxidativem Stress

Wie in 3.2.4 gezeigt wurde war das rekombinante *LdmPrx* in der Lage, verschiedene Peroxide zu entgiften. Um zu überprüfen, ob eine Überexpression des Gens in *L. donovani* zu einem Schutz der Parasiten gegenüber oxidativem Stress *in vivo* führt, wurden die mit pX63pol bzw. *LdmPrx*:pX63pol-transfizierten Zellen mit verschiedenen Stressoren inkubiert und ihre Überlebensfähigkeit mit Hilfe eines sogenannten Viabilitäts-Assays getestet. Tabelle 4 zeigt die Verhältnisse der Überlebensraten der überexprimierenden Zellen, verglichen mit Kontrollzellen, nach der Induktion von oxidativem Stress. Weder die Behandlung mit verschiedenen Peroxiden ( $H_2O_2$  und t-BOOH), noch mit diversen Stickoxiden (MAHMA NONOate, PAPA NONOate, Spermin NONOate, GSNO, NOC-7, NOC-9, NOC-12 und Sin-1) hatte einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der *ldmprx*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch nach Inkubation mit zellpermeablen

Substanzen wie z. B. DMNQ oder NOR-3, durch die eine intrazelluläre Produktion von Superoxidanionradikalen und Stickoxiden hervorgerufen wird, konnte kein signifikant protektiver Effekt durch die Überexpression von *ldmprx* beobachtet werden.

**Tabelle 4: Verhältnisse der Überlebensraten von *LdmPrx:pX63pol* transfizierten- und Kontrollparasiten nach Inkubation mit verschiedenen Stressoren**

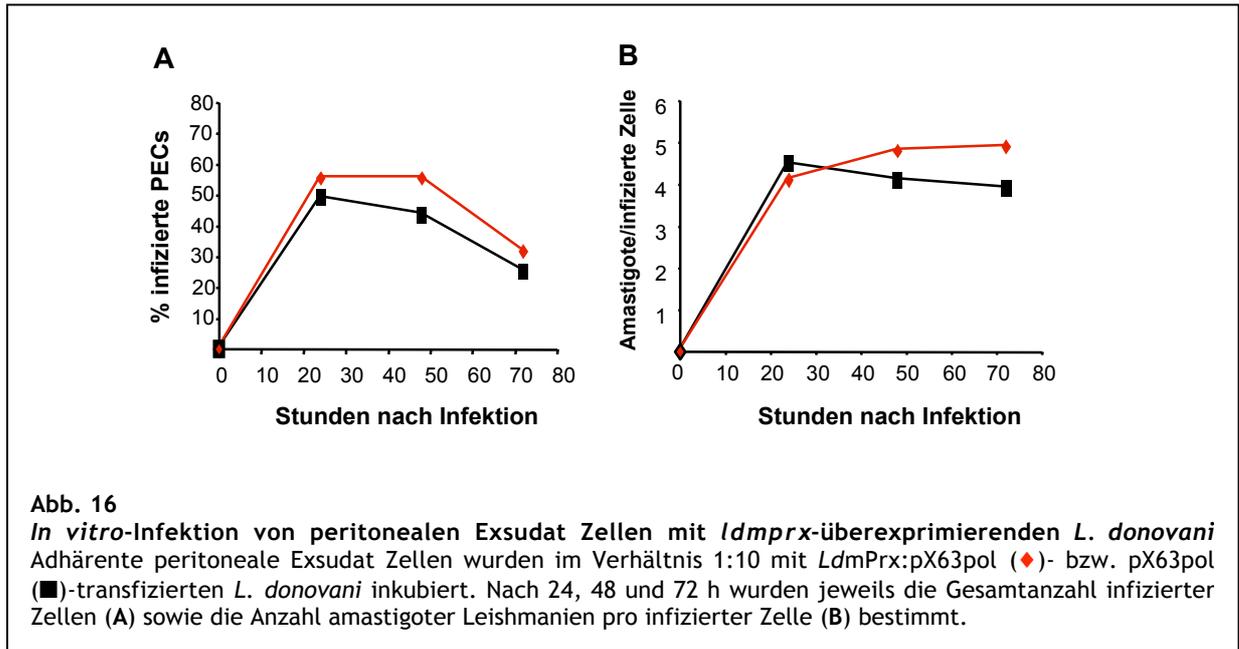
Stressor (Konzentration)		Verhältnis der Überlebensraten
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(0,5 mM)	1,04
t-BOOH	(2 mM)	0,97
MAHMA NONOate	(2 mM)	1,07
PAPA NONOate	(0,5 mM)	1,00
Spermin NONOate	(0,3 mM)	1,07
DMNQ	(2 mM)	1,04
GSNO	(2 mM)	1,52
Sin-1	(0,3 mM)	0,54
NOR-3	(0,3 mM)	1,02
NOC-7	(0,3 mM)	0,71
NOC-9	(0,8 mM)	0,71
NOC-12	(1 mM)	1,12

>1 Schutz

<1 kein Schutz

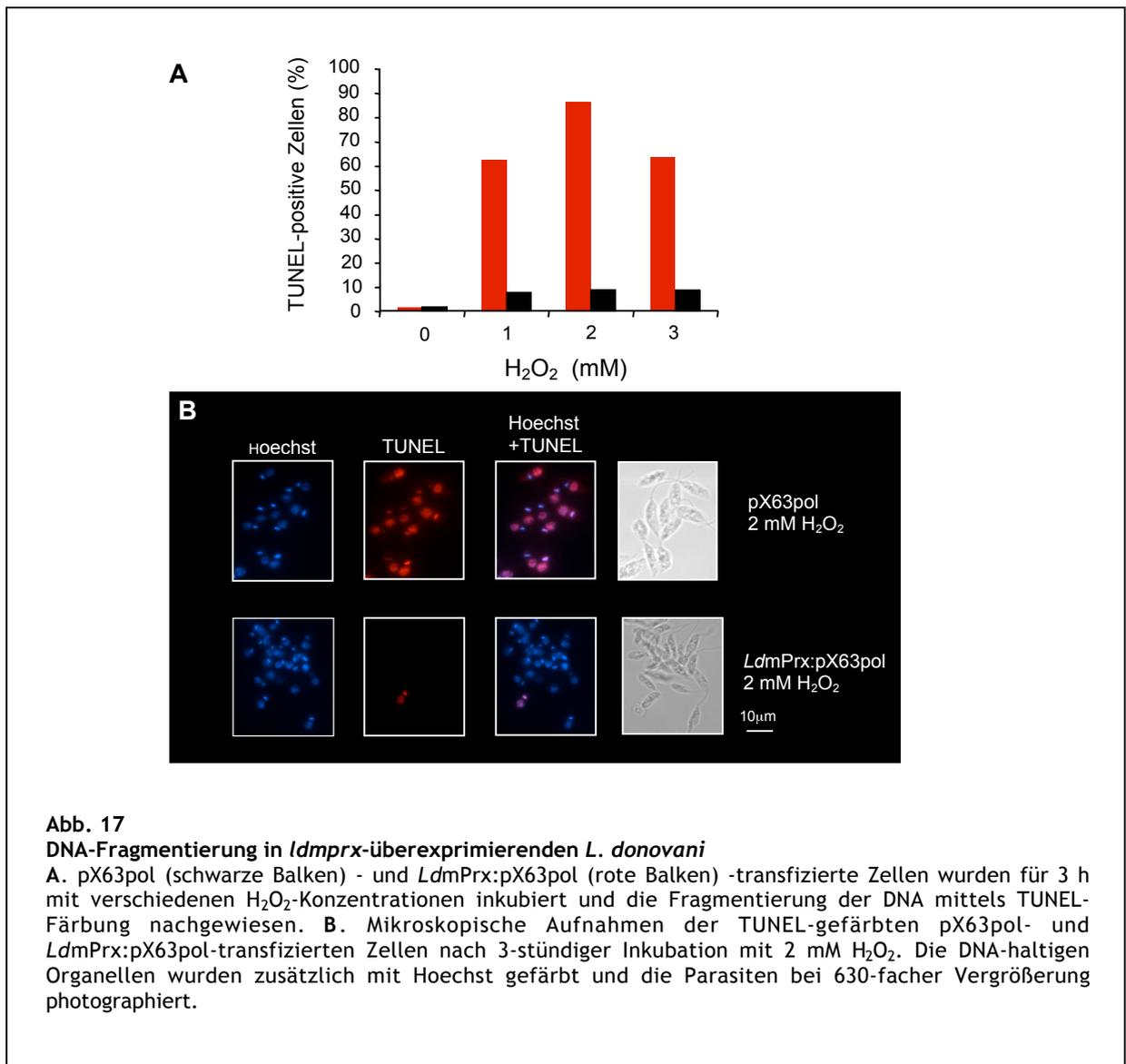
### 3.2.8.4 Auswirkung der Überexpression von *ldmprx* auf die *in vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *ldmprx* eine Auswirkung auf die Infektiosität der Parasiten hatte, wurde eine *in vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen mit px63pol-sowie *LdmPrx:pX63pol*-transfizierten Zellen durchgeführt. In Abb. 16 sind die Ergebnisse dieser Infektionsexperimente dargestellt. Der Infektionsverlauf wurde über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Die Gesamtanzahl infizierter Zellen war für die Infektion mit *LdmPrx:pX63pol*-transfizierten Parasiten im Vergleich zu der Kontrolle leicht erhöht, dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Dasselbe war für die Anzahl amastigoter Leishmanien pro infizierter Zelle zu beobachten, allerdings handelte es sich auch hierbei nicht um einen signifikanten Unterschied.



### 3.2.8.5 Auswirkung der Überexpression von *Ldmprx* auf die Fragmentierung von DNA in *L. donovani* nach Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Es wurde gezeigt, dass die Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in diversen Säugetierzellen sowie in Hefe (Clement *et al.*, 1998) die Induktion von Apoptose auslöst. Dabei kommt es zur Aufblähung der Zellmembran, Kondensation von Cytoplasma und Zellkern sowie Chromatinaggregation mit anschließender Fragmentierung der DNA (Vaux and Strasser, 1996). Phänotypische Untersuchungen des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zelltodes in *L. donovani* zeigten, dass nach Inkubation mit ≥ 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein Nekrose-ähnlicher Tod beobachtet wurde. Niedrigere Konzentrationen lösen einen Apoptose-ähnlichen Zelltod aus, bei dem es zur Fragmentierung des DNA-Materials kommt (Das *et al.*, 2001). Diese Fragmente können mit Hilfe der TUNEL-Technik sichtbar gemacht werden. Abb. 17 A zeigt, dass in mit diversen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (1-3 mM) für 3 h behandelten pX63pol-transfizierten Zellen ebenfalls die Fragmentierung des genetischen Materials nachgewiesen werden konnte. In Abb. 17 B sind die entsprechenden mikroskopischen Bilder dargestellt. Zwischen 62% (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und 85% (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) der gezählten Zellen waren TUNEL-positiv. Im Gegensatz dazu waren nur 7-8% der *Ldmprx*-überexprimierenden Zellen nach entsprechender Behandlung TUNEL-positiv (siehe Abb. 17 A und B), obwohl sie schon bei niedrigeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht mehr lebensfähig waren. Dies ergab sich aus den Viabilitätsstudien in 3.2.8.3. Wie es scheint, kann durch eine Überexpression von *Ldmprx* die Art des Zelltodes, nicht aber die Überlebensfähigkeit der Parasiten beeinflusst werden.



### 3.3 Die 70 kDa Untereinheit des *outer dynein arm docking complex* (ODA-DC) von *L. donovani* (LdDC2)

#### 3.3.1 Klonierung des Gens und Analyse der Aminosäuresequenz

Ein weiteres der während der in 3.1 beschriebenen Proteomanalyse identifiziertes amastigoten-spezifisches Protein war das hypothetische Protein CAB55364 von *L. major*. Mit Hilfe der von dieser Sequenz abgeleiteten Oligonukleotide CAB-S27(Nde) und CAB-AS27(Bam) wurde das entsprechende *L. donovani* Gen aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Das 1857 Bp große Produkt zeigte eine Sequenzidentität von 96% zu seinem *L. major* Homolog. Das Gen kodiert für ein Produkt von 618 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 70.000 und einem berechneten pI von 5,1. Ein bereits in 3.1.4 erwähnter BLAST-*search* ergab eine Homologie des Proteins zu der bereits beschriebenen 70 kDa Untereinheit des *outer dynein arm docking complex* von *Chlamydomonas reinhardtii* (CrDC2) (Takada *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um einen aus insgesamt drei Untereinheiten bestehenden Komplex, der die Bindung des äußeren Dynein-Arms an die Flagellen-Mikrotubuli der Grünalge *C. reinhardtii* vermittelt. Diese Alge dient als Modellorganismus für die Untersuchung von Cilien- und Flagellenbewegungen. Abb. 19 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen des identifizierten *L. donovani* Proteins mit dem bereits erwähnten CrDC2 und vier weiteren DC2 Proteinen anderer Organismen. Das CrDC2 weist einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil auf und besitzt insgesamt drei Regionen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit sogenannte *coiled-coil* Strukturen ausbilden (Takada *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um eine Proteinstruktur, bei der sich mehrere Proteine mit  $\alpha$ -helikaler Struktur so umeinander winden, dass wiederum eine übergeordnete  $\alpha$ -Helix (Superhelix) entsteht. Es wird postuliert, dass CrDC2 über diese Strukturen mit einer weiteren Untereinheit des ODA-DC interagiert (Takada *et al.*, 2002). Für das hier untersuchte *L. donovani* Homolog konnten ebenfalls Regionen innerhalb des Proteins identifiziert werden, die potentielle *coiled-coil* Strukturen ausbilden können. Diese befinden sich zwischen den Aminosäuren 114-157, 184-228, 386-415 und 586-618 (siehe Abb. 19). Diese Analyse wurde mit dem Programm PAIRCOIL (version1.0) durchgeführt (<http://paircoil.lcs.mit.edu/cgi.bin/paircoil>).

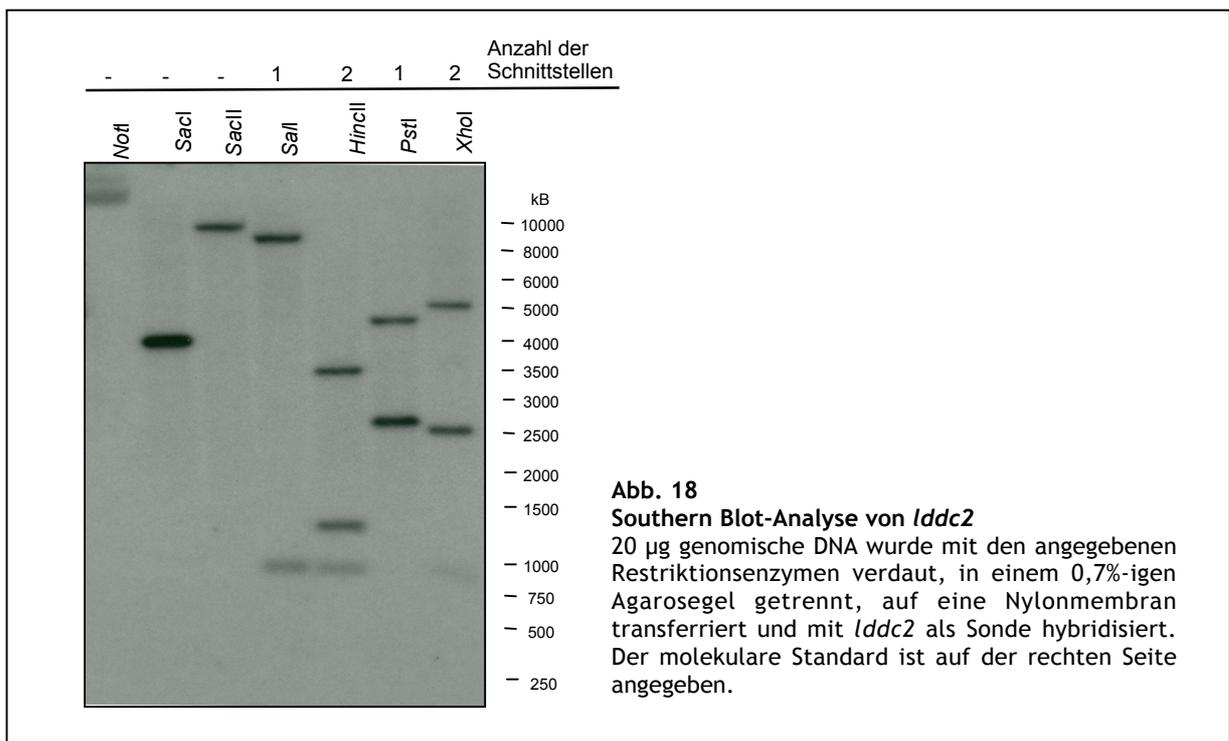
Auf Grund der bei *Chlamydomonas* beschriebenen Funktion des DC2-Proteins kann man von einer flagellaren Lokalisierung des Proteins auch bei *L. donovani* ausgehen. Da es sich hierbei um eine Zellstruktur der promastigoten Zellen handelt, war dies auf Grund des in der Proteomanalyse detektierten amastigoten-spezifischen Vorhandenseins des Proteins erstmal erstaunlich. Es ist mehrfach gezeigt, dass der Transport von Proteinen in die Flagellen von trypanosomatiden Organismen mit Hilfe spezifischer Signalsequenzen erfolgt (Bastin *et al.*, 1999; Bloodgood, 2000; Snapp and Landfear, 1999). Eine Sequenz, die Ähnlichkeit zu einem der bereits beschriebenen Motive aufweist, konnte allerdings bei dem hier untersuchten Protein nicht gefunden werden. Ein weiteres bereits in Tabelle 3 (siehe 3.1.4) erwähntes identifiziertes Motiv ist ein sogenanntes EF-Hand-Motiv. Es befindet sich zwischen Aminosäure 576-588 und vermittelt eine Calcium-Bindung.

Es konnten zusätzlich zu *CrDC2* noch ein Homolog in *Ciona intestinalis*, zwei weitere Homologe in *D. melanogaster*, zwei menschliche Homologe und ein Maus Homolog identifiziert werden (siehe Abb. 19). Die Proteine sind alle ähnlich bezüglich ihrer vorhergesagten Größe. Außerdem erstrecken sich die Homologien über die gesamten Aminosäuresequenzen, wobei das *L. donovani* Protein die größte Identität (24%) zu *CrDC2* aufweist (siehe Abb. 19). Es konnten keine homologen Proteine in Organismen ohne bewegliche Flagellen oder Cilien gefunden werden wie z. B. in Hefe, *C. elegans* oder *Arabidopsis*.

Auf Grund dieser Sequenzanalyse wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem identifizierten *L. donovani* Protein tatsächlich um die 70 kDa Untereinheit des ODA-DC von *L. donovani* handelt und es wird im Folgenden als *LdDC2* bezeichnet.

### 3.3.2 Genomische Organisation von *lddc2*

Um zu überprüfen, ob es sich bei *lddc2* ebenfalls um ein *single-copy* Gen handelt, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Genomische *L. donovani* DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI*, *SacI*, *SacII*, *Sall*, *HincII*, *PstI* und *XhoI* verdaut und die auf eine Membran transferierten Fragmente mit einer *lddc2* Sonde hybridisiert. Diese Sonde umfasste die gesamte kodierende Region von *lddc2*. Anhand dieser, in Abb. 18 gezeigten Analyse lässt sich eindeutig feststellen, dass *lddc2* in nur einer Kopie im *L. donovani* Genom vorkommt. Für jeden Verdau mit einem Enzym, das nur eine einzige Schnittstelle in dem untersuchten Gen aufweist (*NotI*, *SacI*, *SacII*), hybridisierte auch nur ein einzelnes DNA-Fragment. Besitzt das *lddc2*-Gen eine Schnittstelle (*Sall* und *PstI*), hybridisierten zwei Fragmente, bei zwei Schnittstellen (*HincII* und *XhoI*) drei DNA-Fragmente.



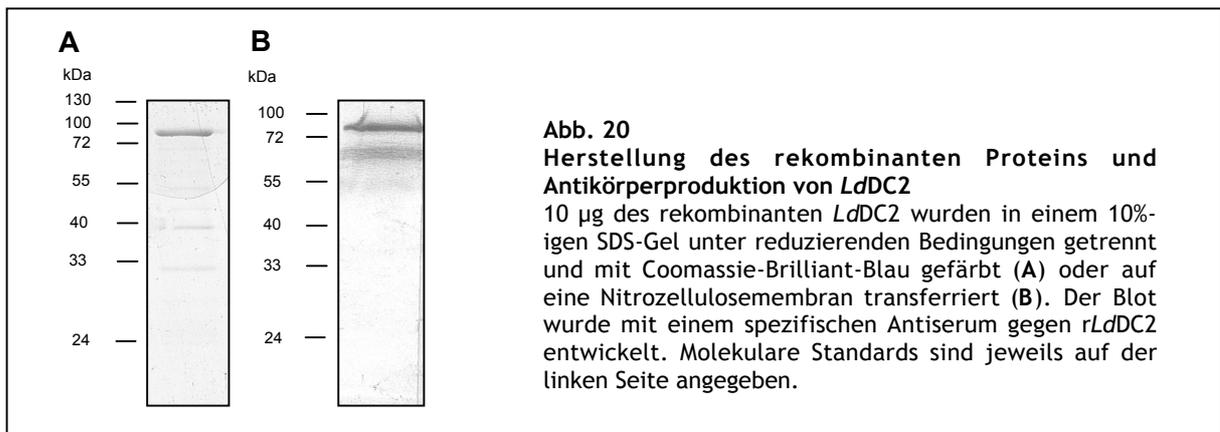
LdDC2	-----MSVVAAKKKGAVSDTLR-----RSQIADGILGAQD	30
CrDC2	-----MPSADATRRGGGSAGSMG-----KGLTLAGADTLGHK	30
DmDC2-1	-----MTDQSELDQLATAELQR-----LQRQHRGLQLDLRGLL	33
ClDC2	MQRAASRRSESSEEQEMDGLAEAEALAK-----LQRQYRIMDGDGRKAYC	42
HsDC2-1	MSIPTGAPPCCLARMPGLRGLAGSARSEESE-AFLEGMVDWELSRILQRQCKVMGERRAYS	59
HsDC2-2	MEAQVLQRQILHLEQLHHLKLNDRQPPDPVLE-----KREKQAGEVAEG---VWK	50
LdDC2	OG-----ARQQEQLHTEENNOIKKETSATSG---THYDYVKADKLASLQSDVDGLERR	82
CrDC2	S-----VLDKQRAAIEKLRANEQLKTELLLENKFSVVRPGDPPAQALINLRQDEGDMLEARK	86
DmDC2-1	EKAKRLKKQNHMINVLOVEHQKLEEKIKTLEGGTHARKNTNREKHLGTLOEQADLQRV	93
ClDC2	EESQNIIRRRQRAQIASLQEEEREIQTNLLLAQSAQNTKKDSNNMEELCNLLSEQDSYERL	102
HsDC2-1	KEVHQIRINKQLEEFIRLLEVRGDLQVQISAAQNVKRLRDSQRLENMDRLLKGRAQVQAE	119
HsDC2-2	TSQERLVLQYEDALNKLSQLMGESDPLLQVQKYLEIEERNFAEFNFINEQNLELHVQEE	110
LdDC2	YQFEKMRKN---DLTKRYQLARIDLLHSRKMKGGINVE---KEQAVAVQROVDILE-	133
CrDC2	IVLEMRKTK---MLDQQLSEMGSTLTTRNNMGGIFSA---KEQSTAVQRIKLE-	137
DmDC2-1	LQNERTNLW---ELEGHIRKMEKEIDALRRNEVPDNCY---KDTICKVQSVVKLEN-	144
ClDC2	IKKEETAVR---ALDTEIRQIETKINTQHKSMGGVHSS---HLRHVGTQOIRVLEN-	153
HsDC2-1	IEELQEQTR---ALDKQ--IQEWETRIPTHSKN-VRSPGFILDQKVK-IRRRIRILEN-	170
HsDC2-2	IKEMQEALVSARASKDDQHLLEQQQKVLQQRMDKVHSEARLEARFQDVRGQLEKFKAD	170
LdDC2	RLDQTLGQFNDA SYNKELRDRIDV REERRVFLRVHKRMEDDLKTKRRL MAHIEKSN	192
CrDC2	-RLEKAYVQYQNSITHNKQRESINNLRRERIMPESIQSNLERELAKLRDMADMIQGAN	196
DmDC2-1	-RLDVTNKKCSVDLITENSKMRDAINHMLODRANFNMDMQSMVTFQNEGKFFIMDLIDQST	203
ClDC2	-RLDKATVEFNKLLTNSRLREEIDHLRSQRAVFDGLHKKLTKELGDQKRVMEIEIQST	212
HsDC2-1	-QLDRVTCFHDNQLVRNAALRELDLRLDRNRYLNVDKRLKKEIHHLHLLVSTLILSST	229
HsDC2-2	IQLLFTKAHCDSSMID-DLLGVKTSMGDRDMGLFLSLIEKRLVELLTVOAFLHAQSFSL	229
LdDC2	RDMDRDAQLREVERLRAALAEQRQAYTNLRDLDTAMMDIKAMRDQTEMQLELFAREY	252
CrDC2	GAFEAEREKATGEMNALKAQADKEQGFEEERQLTTIEEDKKEERARARQELAMERET	256
DmDC2-1	LAFDQREELCNKLTVLKDRNENDKVMHIQEMREMQRRLHDAKLQ---KFFDIKQKRLN	260
ClDC2	QAYDQRDDAQAKMMALKERNEKDLLQYNMEYKELMRIIDHDAKLK---LFMMMKQORSE	269
HsDC2-1	SAYAVREEAKAKMGLLREERAKEEAQSEMEAAQVLRQILHLEQLH---HFLKLNDRQP	286
HsDC2-2	ADAALLVLGQSLDLPKMAPLOPPDTLEPPGFEASDDYPMSRE---ELLSQVEKLVEL	286
LdDC2	EFGERMGDTKAARAQEEADTSRRAIGASVSGNGEDPASTGEEDEDDHTLLCVERESA	312
CrDC2	QELLMGTLSSAEKKRITKGSWNVGYNKAMAQN-----VAEKVE	297
DmDC2-1	PELEQR-----ELDK-----KQSQKETYERQLL	283
ClDC2	LEEEEA-----AKRR-----AGEEDKAETAEETME	295
HsDC2-1	DPDVLE-----KREKQAG-----EVAEGVWKTQSERLVL	315
HsDC2-2	QEQAEA-----QRQKDLA-----AAAALDGTLS--VDL	313
LdDC2	TITSLAQIKDDLQTDIDELRDKYLHTGD-LNFSMYKYVNELSAKKEALKDSIRDRL	372
CrDC2	MYGAFKRIQDATGIEDIDQLVNTFLAAED-QNYTLFNVYVNEVQIEKLEDDQINIMRGE	356
DmDC2-1	EYKEIIEKIKLLYGEEDADRLVAQFKRQED-ENFALFNVYVNELSHEVEVLNDSTQELDE	342
ClDC2	TYQKAFEKIQEVTGEGDIYLLVSRFIETED-KNFALFNVYVNELNNELELIEQIDVDMQ	354
HsDC2-1	CYEDALNKLSQLMGESDPLLQVQKYLEIEE-RNFAEFNFINEQNLELHVQEEIEKEMQEA	374
HsDC2-2	ASTQRAGSSTVLVPTRHPHAI PGSILSHKTSRDRGSLGHVT-----FGLSSTGHLS	368
LdDC2	LSEEDDSERQHRILK-----GLEEELAGTESKLDENMCATVQLRDAVQRTAATAEDVYA	426
CrDC2	INKYRETGRELDMTKS-RELTEEARLAASEAQSLYEKRTDSALSMTTALKAGINDLFE	415
DmDC2-1	IERQKSEQTEKELKLTALDYLNAEKERIEQLAEETREKRRTLSIRLEQLLKGIEDIFR	402
ClDC2	IEQFKNEGVQHOVERQ-NILKGLLEKLRKTTKEADMFQKQKATEKILDLQKAGIESVFG	413
HsDC2-1	LVSARASKDDOHLLEQ-QQQKVLQQRMDKVHSEARLEARFQDVRGQLEKLEKADQLLFT	433
HsDC2-2	LTHGDPNTGHVTPGST-SASSGGHVTFRPVSASSYLGSTGYVGSRRGENTEGGVESGGT	427
LdDC2	HIGCPQMDGAVEGEEERCTEANMKQFLGTIEERATHILIAFORHHQFSANSRTSVASSSR	487
CrDC2	RIGCNTPAVRDLGEEGVTEANLTAYLGIIEQRTNEILQIYAKRKAQQG-----	464
DmDC2-1	QLACDDAPILNVLSTKTFTLVHNKLFIVGIEERRVNLII SAINIEDNSNKILARKDRVPK	462
ClDC2	KINCNRSTISDMLGDNDAVNENMMQYLGIEEQKTNELLQIHTYLQKLELNKPEGTPGT	473
HsDC2-1	KAHCDSMIDDLLGVKTSMGDRDMGLFLSLTVCVSRFLSLCS-----	474
HsDC2-2	ASDSSGGLGSSRDHVSTGPASSTGPGSSTSKDSRG-----	463
LdDC2	VTRDTQSPKEAVQNLEEDNALTANTDSPHGETLQMAEDWEVEESPIMPIAPQTAHSAV	547
CrDC2	--TDGLAEALLAQPLTPQGNRIIEPPSTMQEVEVEGLEPEPVEED--RPLTRHLESKV	520
DmDC2-1	FNIRESAKTKN-----	473
ClDC2	SPITTAALLGGPAAPPILAPIHIVPSTEDDRDDGGDSGEESVDFDRPLTQHELKARVM	533
HsDC2-1	-----	-----
HsDC2-2	-----	-----
LdDC2	SARNLVRMMELPSASLAGGTTDRDSSLYADQDDHII SHED RKQMEARLATMREEREER	607
CrDC2	QR----- LPRKLETAIKVRPAGADAT	542
DmDC2-1	-----	-----
ClDC2	RNVAKKDLAGSNAVAGTKRPDKQMTSEKTPRLSDAKKPKS-----	575
HsDC2-1	-----	-----
HsDC2-2	-----	-----
LdDC2	QRKKKDAQKAK	618
CrDC2	GGKRGSPTRR--	552
DmDC2-1	-----	-----
ClDC2	-----	-----
HsDC2-1	-----	-----
HsDC2-2	-----	-----

**Abb. 19****Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener ODA-DC2 Proteine**

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von *L. donovani* DC2 (Accession Nr. CAB55364); *C. reinhardtii* DC2 (Accession Nr. AAK72125); *C. intestinalis* DC2 (Accession Nr. BAB88833); *D. melanogaster* DC2-1 (Accession Nr. AAF55345) und *H. sapiens* DC2-1 (Accession Nr. AK057357). Bei allen 6 Proteinen identische Aminosäuren sind Dunkelgrau, in ihrer Funktion konservierte sind Hellgrau unterlegt. Regionen von *LdDC2*, die eine *coiled-coil* Struktur ausbilden können sind eingerahmt und das EF-Hand-Motiv mit einem Balken markiert. Zwischen *LdDC2* und *CrDC2* identische Aminosäuren sind in Rot dargestellt, solche mit konservierter Funktion in Orange.

### 3.3.3 Rekombinante Expression von *lddc2* und Antikörperproduktion

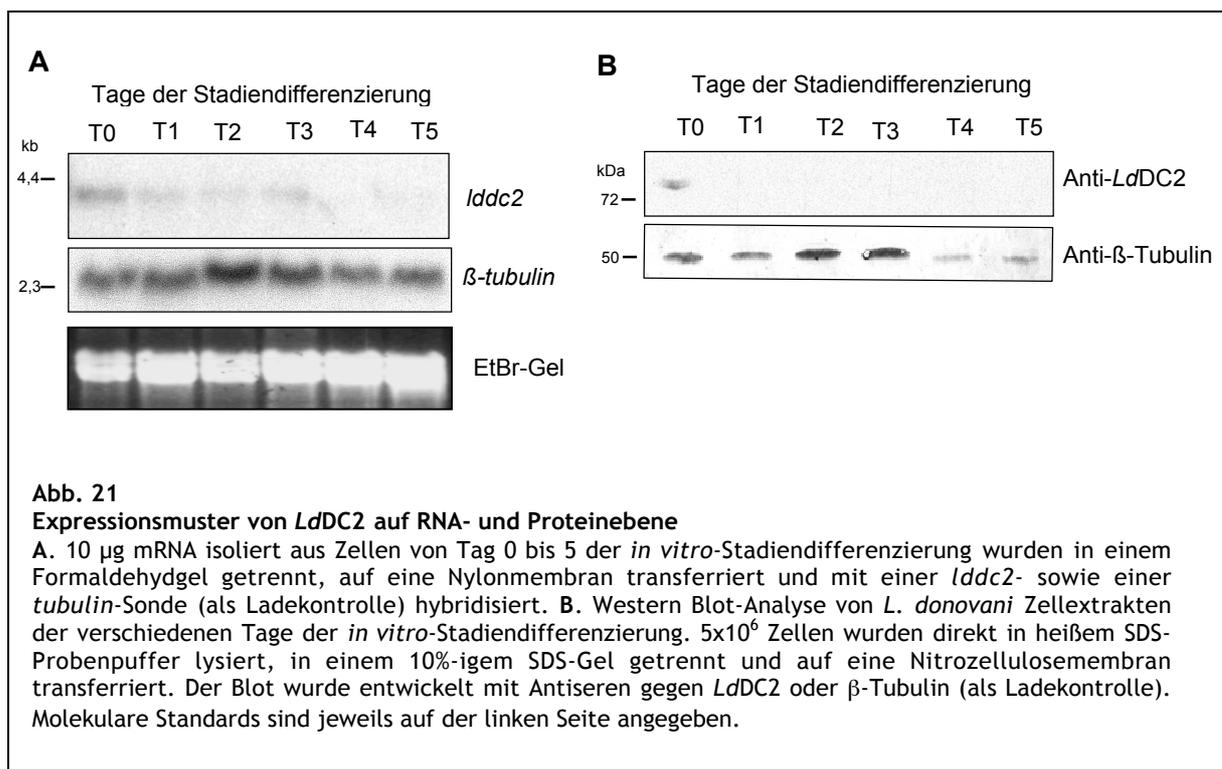
Um Antikörper gegen das zu untersuchende Protein zu generieren wurde es mit einem N-terminalen His-tag rekombinant in *E. coli* synthetisiert. Anschließend wurde eine Nickelsäulenaffinitätschromatographie mit der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenats durchgeführt, um das Protein zu reinigen. Abb. 20 A zeigt eine Coomassie-Brilliant-Blau Färbung von ca. 10 µg gereinigtem, rekombinanten *LdDC2* (*rLdDC2*). Das Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen ein etwas größeres Molekulargewicht, als das theoretisch erwartete von ca. 73 kDa (inklusive His-tag). Seine Identität wurde aber mittels MALDI-MS zusätzlich überprüft und es konnte sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Protein um *LdDC2* handelt. *rLdDC2* wurde für eine Immunisierung von Hühnern eingesetzt, wobei nach dreifachen *booster*-Injektionen ein relativ spezifisches Antiserum aus den Eidottern gewonnen werden konnte. In Abb. 20 B ist eine Western Blot-Analyse gezeigt, in der dieses Antiserum zur Detektion des rekombinanten Proteins eingesetzt wurde. Das isolierte Antiserum war ebenfalls in der Lage, das native Protein in einem Zellextrakt von *L. donovani* promastigoten Zellen nachzuweisen. Abb. 21 B zeigt eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe in Zellextrakten von Tag 0 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung. Zusätzlich ist eine unspezifische Reaktion auf der Höhe von ca. 25 kDa zu beobachten (nicht dargestellt).

**Abb. 20****Herstellung des rekombinanten Proteins und Antikörperproduktion von *LdDC2***

10 µg des rekombinanten *LdDC2* wurden in einem 10%-igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen getrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (A) oder auf eine Nitrozellulosemembran transferriert (B). Der Blot wurde mit einem spezifischen Antiserum gegen *rLdDC2* entwickelt. Molekulare Standards sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

### 3.3.4 Expressionsmuster von *lddc2*

Es wurde eine Northern Blot-Analyse mit isolierter RNA von allen Tagen der *in vitro*-Stadiendifferenzierung durchgeführt, um das Expressionsmuster von *lddc2* zu untersuchen. Hierbei wurde als Sonde die komplette kodierende Region von *lddc2* verwendet. Bei dieser Untersuchung konnte ein ca. 4 kB großes Transkript detektiert werden, dessen Intensität im Verlauf abnahm (siehe Abb. 21 A). Die Proteinmenge wurde mittels einer Western Blot-Analyse von Zellextrakten der gesamten Transformation vom promastigotem zum amastigotem Stadium untersucht bei der das in 3.3.3 beschriebene Antiserum eingesetzt wurde. Abb. 21 B zeigt das im Gegensatz zu den Ergebnissen der Proteomanalyse (siehe 3.1), ausschließlich eine Synthese des Proteins an Tag 0 der Differenzierung nachzuweisen ist. Dies passt zu der bereits in 3.3.1 erwähnten, sich auf Grund der Aminosäuresequenz andeutenden flagellaren Lokalisierung des Proteins. Mögliche Gründe für die Diskrepanz zwischen der Proteomanalyse und den hier dargestellten Ergebnissen werden in 4.3.2 diskutiert.



### 3.3.5 Intrazelluläre Lokalisierung von *LdDC2*

Die intrazelluläre Lokalisierung von *LdDC2* wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft. Die bei *C. reinhardtii* beschriebene Funktion von DC2 lässt wie bereits erwähnt auf eine flagellare Lokalisierung des Proteins in *L. donovani* Promastigoten schließen. Abb. 22 stellt einen repräsentativen Ausschnitt von mittels Immunfluoreszenz analysierten Parasiten dar. Für die Analyse wurde ein spezifisches *LdDC2* Antiserum verwendet. Die Zellen zeigten eine deutliche Färbung der Flagellen, zusätzlich waren aber

auffällige Signale im Cytoplasma zu beobachten, die wahrscheinlich auf eine bereits in 3.3.3 erwähnte unspezifische Reaktion des Antiserums mit anderen *L. donovani* Proteinen zurückzuführen sind.

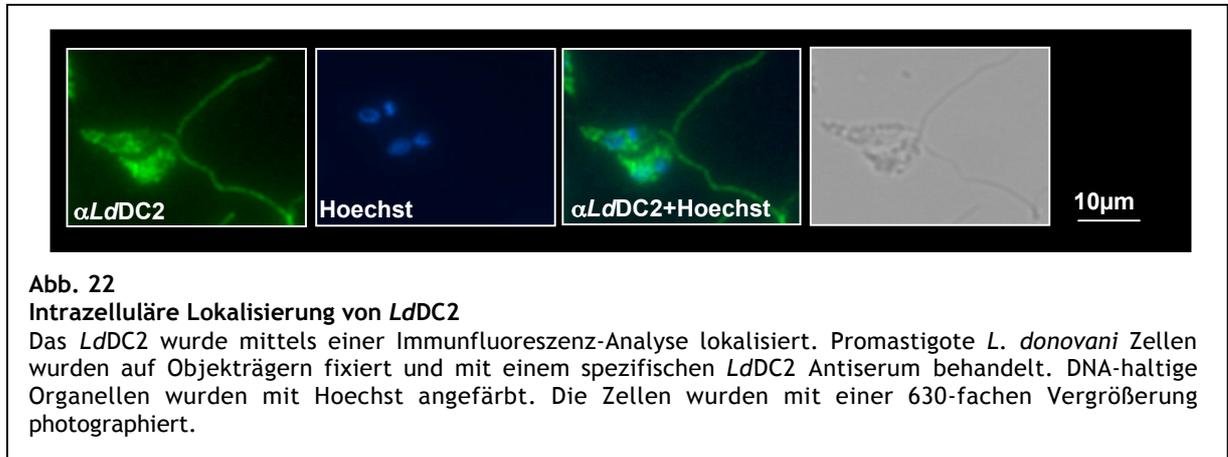


Abb. 22

#### Intrazelluläre Lokalisierung von *LdDC2*

Das *LdDC2* wurde mittels einer Immunfluoreszenz-Analyse lokalisiert. Promastigote *L. donovani* Zellen wurden auf Objektträgern fixiert und mit einem spezifischen *LdDC2* Antiserum behandelt. DNA-haltige Organellen wurden mit Hoechst angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung photographiert.

### 3.3.6 Generierung einer *Δlddc2* knock-out-Mutante

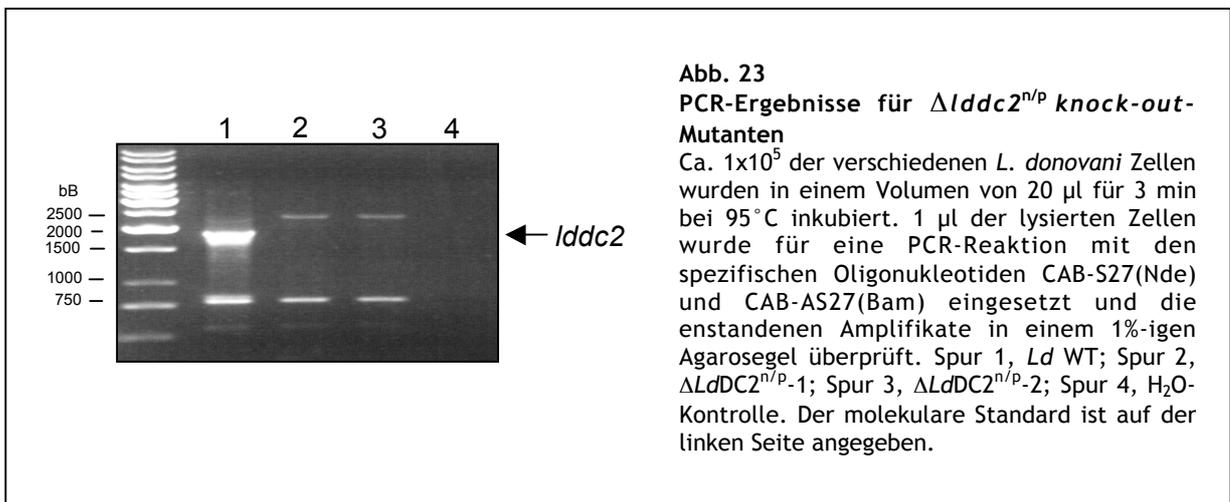
#### 3.3.6.1 Amplifikation der 5`-und 3`-UTR und Klonierung der DNA-Konstrukte

Zur weiteren Charakterisierung von *LdDC2* sollte auch hier versucht werden, eine *L. donovani* knock-out-Mutante für das Protein zu generieren. Dabei wurde grundsätzlich vorgegangen wie bereits in 3.2.7.1 beschrieben. Die Klonierung der DNA-Konstrukte (siehe Abb. 11) erfolgte nach demselben Schema und die Amplifikation der 5`-und 3`-UTR wurde ebenfalls mit aus den genomischen Sequenzen der *L. major* untranslatierten Bereiche des entsprechenden Gens abgeleiteten Oligonukleotiden (siehe 2.1.4) durchgeführt. Im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen Versuch, die entsprechenden DNA-Abschnitte mit aus *L. major* Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden zu amplifizieren, konnten diesmal Amplifikate der richtigen Größe und Sequenz erhalten werden. Die PCR-Produkte zeigten eine 95 (3` UTR) bzw. 97 (5` UTR) %ige Sequenzidentität zu den entsprechenden *L. major* UTR. Nach erfolgreicher Ligation der Gene für die Selektionsmarker entstanden die Vektoren *Δlddc2:neo* und *Δlddc2:pac*. Die mit Hilfe des Enzyms *SwaI* linearisierten DNA-Fragmente konnten nun für eine Transfektion von *L. donovani* promastigoten Zellen eingesetzt werden.

#### 3.3.6.2 Transfektion und Selektion rekombinanter Klone

In einer ersten Transfektionsrunde mit dem Konstrukt *Δlddc2:neo* konnten nach Vereinzelung der Zellpopulation acht Klone isoliert werden, die unter Antibiotikaselektion ein konstantes Zellwachstum zeigten. Zwei dieser Klone (*ΔLdDC2<sup>+/n</sup>-1* und *ΔLdDC2<sup>+/n</sup>-2*) wurden für eine weitere Transfektionsrunde mit dem Konstrukt *Δlddc2:pac* eingesetzt.

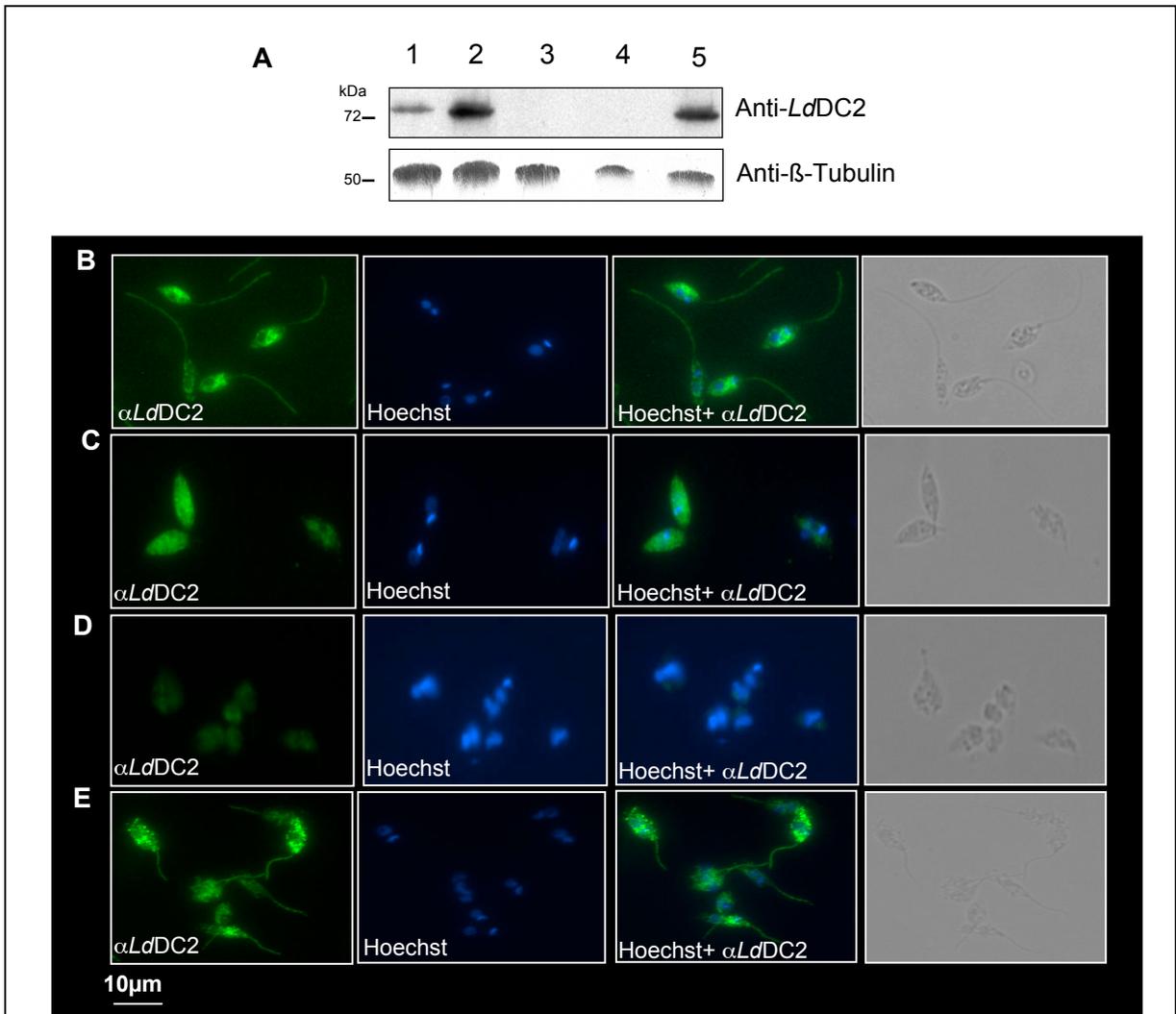
Nach erneuter Vereinzelung der zwei Populationen wurden die resultierenden Klone mittels PCR auf das Vorhandensein des *lddc2*-Gens überprüft. Hierfür wurden die spezifischen Oligonukleotide CAB-S27(Nde) und CAB-AS27(Bam) eingesetzt. In Abb. 23 sind die Ergebnisse der PCR für zwei der aus diesen beiden unabhängigen Transfektionsereignissen entstandenen Klone dargestellt. Für beide Zellpopulationen kann kein spezifisches *lddc2*-Amplifikat (1800 Bp) mehr nachgewiesen werden (Abb. 23 Spur 2 und 3). Bei den Banden in Höhe von 750 und 2300 Bp handelt es sich um unspezifische Amplifikate, die auf Grund von Kreuzreaktionen der Oligonukleotide mit anderen Bereichen der *L. donovani* DNA entstehen. Es wurde mit diesen beiden Zellpopulationen weitergearbeitet, sie werden im Folgenden  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  und  $\Delta LdDC2^{n/p-2}$  genannt. Um zu überprüfen, ob der erfolgreiche Austausch beider Allele des *lddc2*-Gens auch mit einem Verschwinden des korrespondierenden Proteins einhergeht, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Abb. 24 zeigt, dass das Protein in den beiden Klonen  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  und  $\Delta LdDC2^{n/p-2}$  nicht mehr nachweisbar ist.



### 3.3.7 Rekonstitution der $\Delta LdDC2^{n/p}$ Mutanten

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte, die eventuell nach einem genetischen *knock-out* entstehen, wirklich auf das Nichtvorhandensein des bestimmten Proteins zurückzuführen sind, müssen die Mutanten rekonstituiert, d. h. das entsprechende Gen in den Organismus zurückgebracht werden. Auftretende phänotypische Veränderungen sollten so wieder umgekehrt werden. Das Ziel war es nun, durch eine episomale Expression des Gens eine der beiden untersuchten  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten zu rekonstituieren. Hierfür wurde der schon in 3.2.8.1 erwähnte Leishmanien-spezifische Expressionsvektor pX63polPHLEO verwendet. Die Klonierung des *lddc2*-Gens erfolgte ebenfalls wie in 3.2.8.1 beschrieben in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors nach vorheriger *Fill-In* Reaktion der *NdeI*-bzw. *BamHI*-Schnittstelle des PCR-Produkts. Der entstandene Vektor *LdDC2*:pX63pol wurde in *L. donovani* WT und  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  transfiziert und die Synthese des Proteins im Western Blot überprüft. Diese Analyse ist in Abb. 24 A dargestellt. Eine Transfektion von WT-Zellen (Spur 2) führt zu einer gesteigerten Menge des Proteins auf Western Blot Ebene

und auch nach Transfektion von  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  mit *LdDC2*:pX63pol kann das Protein in den Zellen wieder nachgewiesen werden (Spur 5). Eine Immunfluoreszenz-Analyse dieser Zellpopulationen führte zu demselben Ergebnis. Abb. 24 B-E zeigt mikroskopische Bilder von Parasiten, die mit dem spezifischen *LdDC2* Antiserum untersucht wurden. Kontrollzellen (nur mit dem Vektor pX63pol transfiziert) (siehe Abb. 24 B) zeigen die typische Färbung des Flagellums sowie die unspezifische Cytoplasma-Färbung. Die beiden *knock-out* Zelllinien  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  und -2 (siehe Abb. 24 C und D) nur die Cytoplasma-Färbung und rekonstituierte Zellen (siehe Abb. 24 E) wiederum auch eine Flagellenfärbung.



**Abb. 24**

**Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse der  $\Delta LdDC2^{n/p}$  knock-out-Mutanten**

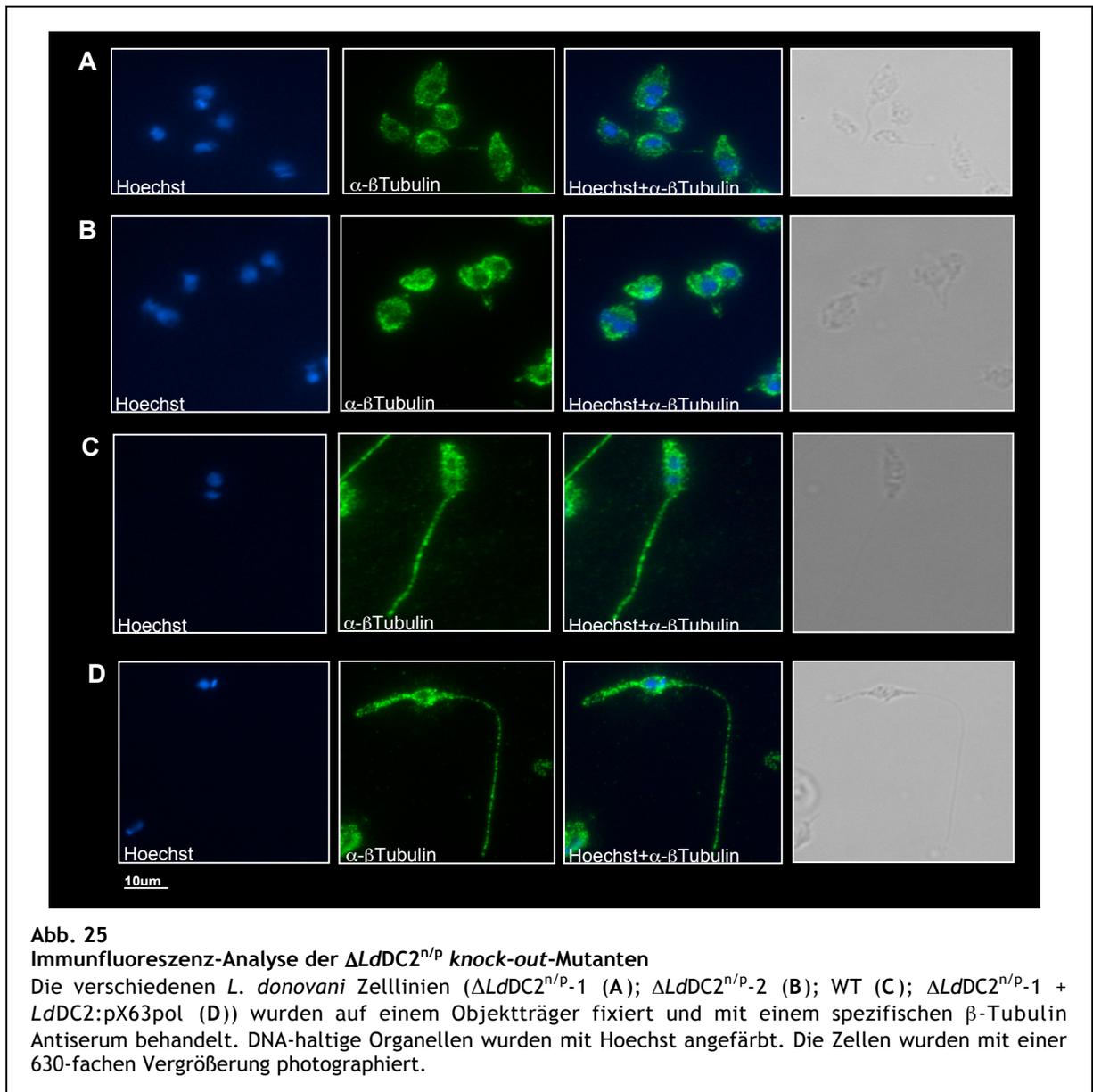
**A.**  $5 \times 10^6$  Zellen der verschiedenen *L. donovani* Zelllinien (Spur 1, WT; Spur 2, *LdDC2*:pX63pol; Spur 3,  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$ ; Spur 4,  $\Delta LdDC2^{n/p-2}$ ; Spur 5,  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  + *LdDC2*:pX63pol) wurden direkt in heißem SDS-Probenpuffer lysiert, in einem 10%-igem SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot wurde mit Antiseren gegen *LdDC2* oder  $\beta$ -Tubulin (als Ladekontrolle) entwickelt. Molekulare Standards sind auf der linken Seite angegeben.

Die verschiedenen *L. donovani* Zelllinien (pX63pol (**B**);  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  (**C**);  $\Delta LdDC2^{n/p-2}$  (**D**);  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  + *LdDC2*:pX63pol (**E**)) wurden auf Objektträgern fixiert und mit einem spezifischen *LdDC2* Antiserum behandelt. DNA-haltige Organellen wurden mit Hoechst angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung fotografiert.

### 3.3.8 Phänotypische Charakterisierung der $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten

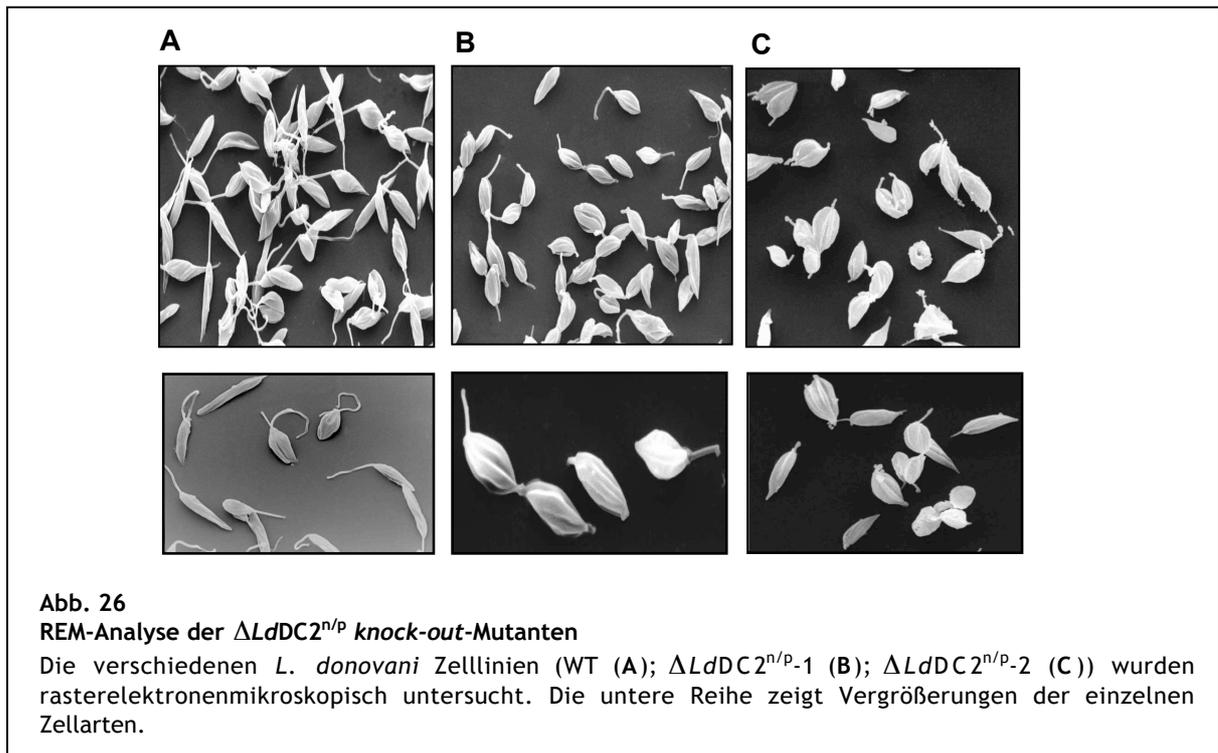
#### 3.3.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse

Eine sofort auffallende phänotypische Abweichung beider *knock-out* Zelllinien im Vergleich zum WT war eine Veränderung der Zellform. Die  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten waren kleiner und runder und das Flagellum war deutlich verkürzt. Eine Immunfluoreszenz-Analyse, durchgeführt mit einem Tubulin-Antikörper, sollte diese morphologische Veränderung veranschaulichen. In Abb. 25 sind die mikroskopischen Bilder dieser Analyse gezeigt. In A und B sind die beiden  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten 1 und 2 dargestellt. Man erkennt die deutlich abgerundete Zellform und das Fehlen eines Flagellums. Die rekonstituierte Mutante (siehe Abb. 25 D) dagegen weist wieder die bekannte länglichere, spindelförmige Form auf, die auch der WT in dieser Analyse zeigt (siehe Abb. 25 C). Auch lässt sich bei der in D abgebildeten Zelle das Flagellum wieder deutlich erkennen.



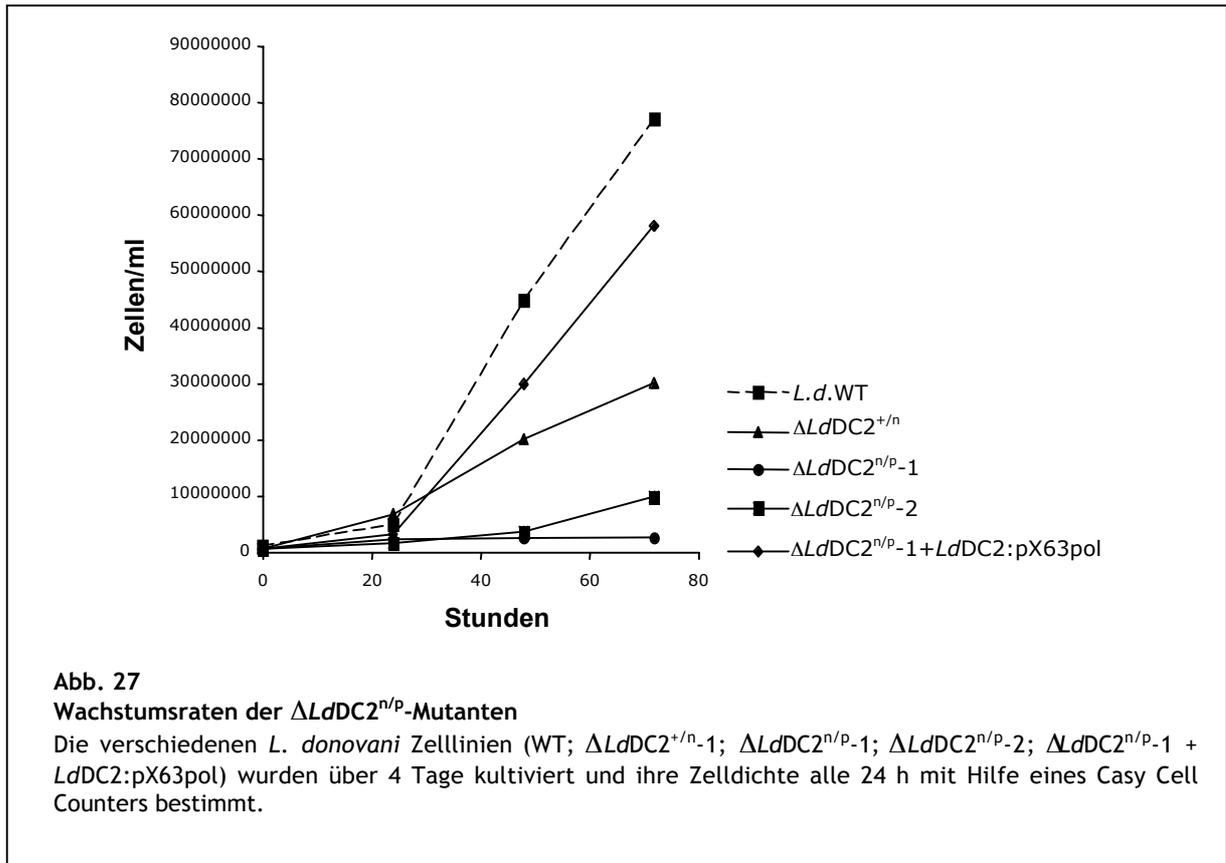
### 3.3.8.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die in Abb. 25 dargestellte Morphologie der  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten noch einmal zu verdeutlichen, wurde eine rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellen durchgeführt. Die resultierenden Bilder sind in Abb. 26 gezeigt. Die *knock-out*-Mutanten (siehe Abb. 26 B und C) weisen im Vergleich zu WT *L. donovani* Zellen (siehe Abb. 26 A) deutlich verkürzte Flagellen auf.



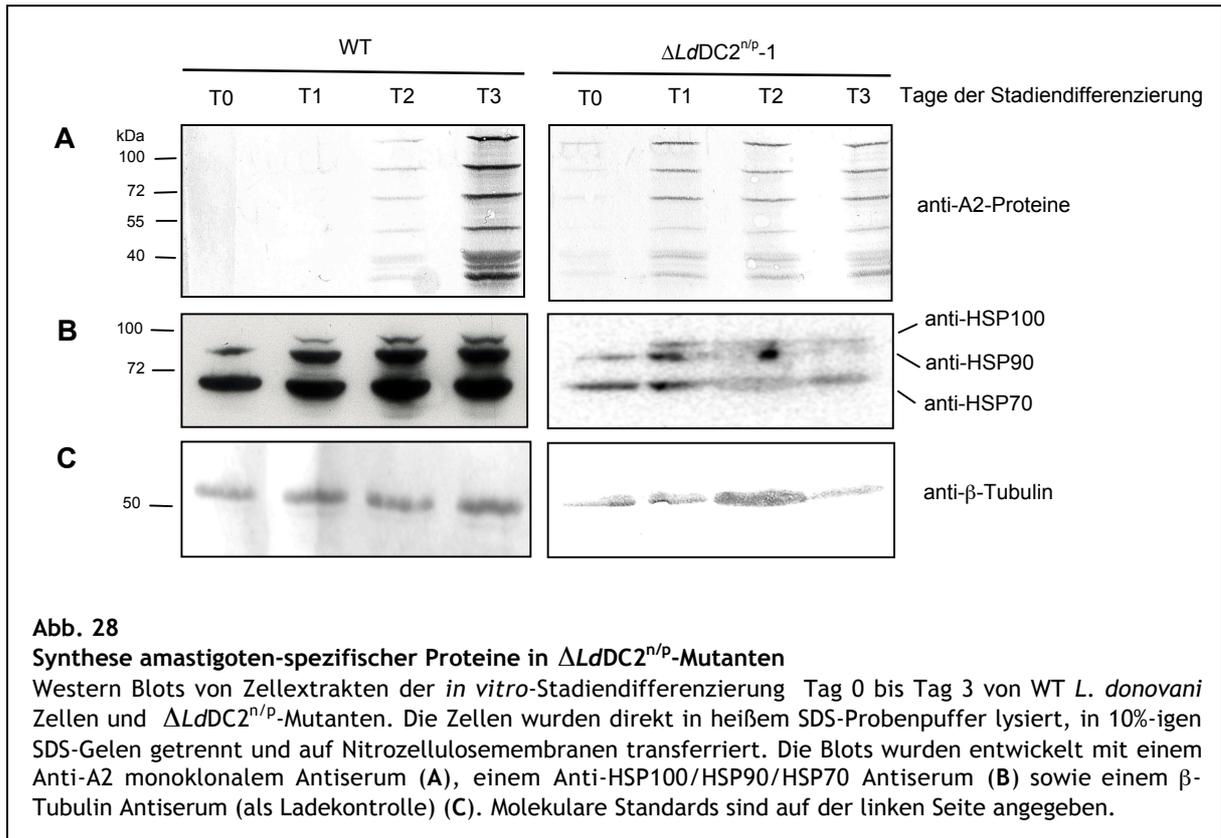
### 3.3.8.3 Bestimmung der Wachstumsraten

Eine weitere Auffälligkeit bei der Untersuchung der  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten war ihr Wachstumsverhalten. Die *knock-out* Zellen wuchsen deutlich langsamer als der WT. Dies ist in Abb. 27 dargestellt. Die verschiedenen Zellarten wurden für 4 Tage kultiviert und ihre Zelldichte alle 24 h bestimmt.  $\Delta LdDC2^{n/p-1}$  und 2 zeigten ein deutlich verlangsamtes Teilungsverhalten. Das Ausschalten eines Allels ( $\Delta LdDC2^{+/n-1}$ ) führte im Vergleich zum WT auch schon zu einer erniedrigten Wachstumsrate. Die rekonstituierte Mutante dagegen wies wieder eine Teilungsrate ähnlich der des WT auf.



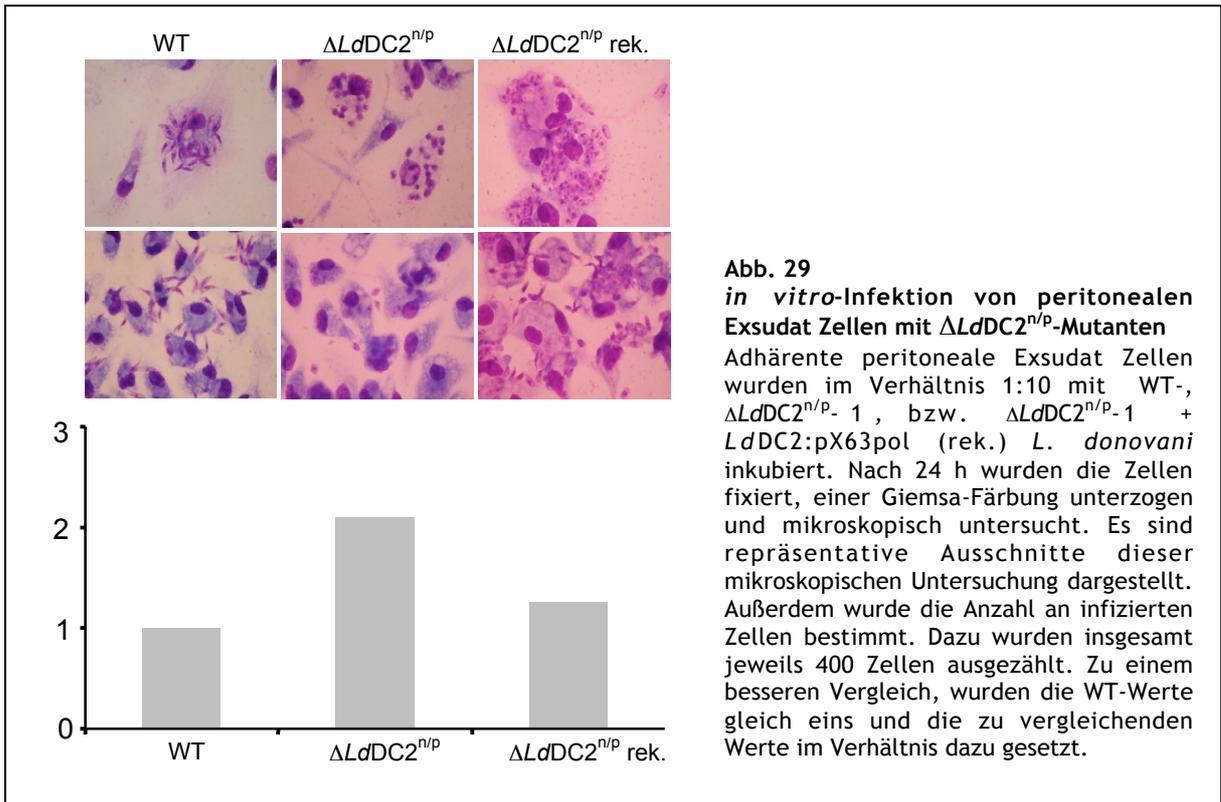
### 3.3.9 Synthese amastigoten-spezifischer Proteine in $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten

Da beide  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -Mutanten morphologisch und auch in ihrem Wachstumsverhalten eher amastigoten als promastigoten Leishmanien ähnelten, sollte die Synthese amastigoten-spezifischer Proteine im Western Blot überprüft werden. Hierzu wurden die bereits in 3.2.8.2 eingeführten Mitglieder der *L. donovani* A2-Genfamilie und das HSP100 untersucht. Es wurde eine *in vitro*-Stadiendifferenzierung mit  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -1 Zellen bis Tag 3 durchgeführt. Auf Grund des unterschiedlichen Wachstumsverhalten der *knock-out* Zellen, konnte für die anschließende Western Blot-Analyse der aus dieser Differenzierung resultierenden Zellextrakte ein Einsetzen gleicher Zellzahlen nicht garantiert werden. Da aber ausschließlich das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der untersuchten Proteine und nicht die relativen Mengen untersucht werden sollte, konnte dies hier vernachlässigt werden. Abb. 28 A zeigt, dass die Expression der A2-Genfamilie in der *knock-out*-Mutante ein im Vergleich zum WT anderes Muster aufweist. Schon in den promastigoten Zellen lässt sich eine schwache Expression erkennen, die an Tag 1 zunimmt und sich dann bis Tag 3 nicht mehr verändert. HSP100 im Gegensatz zeigt das gewohnte Muster (siehe Abb. 28 B), an Tag 0 ist das Protein nicht detektierbar. Der *knock-out* eines promastigoten-spezifischen Proteins löst damit eine veränderte Expression der A2-Genfamilien, nicht aber des *hsp100* in *L. donovani* aus.



### 3.3.10 *In vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen

Um zu überprüfen, ob die  $\Delta LdDC2$ -Mutanten eine veränderte Infektiosität aufwiesen, wurde eine *in vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen durchgeführt. *L. donovani* WT,  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -1 sowie die rekonstituierte Mutante wurden für 24 Stunden mit peritonealen Exsudat Zellen inkubiert. Abb. 29 zeigt repräsentative Ausschnitte aus mikroskopischen Untersuchungen der Giemsa-gefärbten Zellen. Es sind außerdem die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt. Dazu wurde jeweils die Anzahl an infizierten Zellen bestimmt, indem ca. 400 Makrophagen ausgezählt wurden. Da auf Grund der natürlichen Variabilität des Experiments die Werte stark streuen, wurde der WT-Wert gleich eins und die zu vergleichenden Werte im Verhältnis dazu gesetzt. Die  $\Delta LdDC2^{n/p}$ -1 Mutante weist eine im Vergleich zum WT veränderte Infektiosität auf. Sie ist im Durchschnitt doppelt so hoch wie die des WT. Die rekonstituierte Mutante weist wieder ein Verhalten ähnlich dem des WT auf. Die mikroskopischen Bilder zeigen, dass ein Großteil der WT-Zellen die Wirtszellen zu dem untersuchten Zeitpunkt noch nicht invadiert hat. Diese extrazellulären Zellen wurden in die Zählungen nicht mit aufgenommen. Dasselbe Verhalten ist auch bei der rekonstituierten Mutante zu erkennen. Die  $\Delta LdDC2$ -Mutanten hingegen liegen zu dem untersuchten Zeitpunkt bereits fast alle intrazellulär vor.



**Abb. 29**  
*in vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen mit ΔLdDC2<sup>n/p</sup>-Mutanten  
 Adhärente peritoneale Exsudat Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit WT-, ΔLdDC2<sup>n/p</sup>-1, bzw. ΔLdDC2<sup>n/p</sup>-1 + LdDC2:pX63pol (rek.) *L. donovani* inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, einer Giemsa-Färbung unterzogen und mikroskopisch untersucht. Es sind repräsentative Ausschnitte dieser mikroskopischen Untersuchung dargestellt. Außerdem wurde die Anzahl an infizierten Zellen bestimmt. Dazu wurden insgesamt jeweils 400 Zellen ausgezählt. Zu einem besseren Vergleich, wurden die WT-Werte gleich eins und die zu vergleichenden Werte im Verhältnis dazu gesetzt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Proteomanalyse der Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

#### 4.1.1 Vergleich der Proteinmuster und Identifizierung stadienspezifischer Proteine

Die Transformation von Parasiten der Gattung *Leishmania* von der promastigoten in die amastigote Form ist ein komplexer Differenzierungsprozess, der die kontrollierte Expression und Regulation verschiedenster Gene erfordert. Während ihres Lebenszyklus müssen die Parasiten unter sehr unterschiedlichen Bedingungen in ihren Wirten überleben und sind zudem den Abwehrmechanismen der Insektenvektoren sowie der Säugetierwirte ausgesetzt. Eine quantitative Analyse der Proteinzusammensetzung bzw. der im Verlauf der Parasitendifferenzierung auftretenden Unterschiede der Proteinmengen, sollte die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zu Grunde liegen, weiter aufklären. Wie schon in der Einleitung dargestellt, findet in Leishmanien, als Mitglieder der Ordnung Kinetoplastida, die Genregulation größtenteils auf post-transkriptioneller Ebene statt. Die Menge an vorhandener mRNA korreliert daher nicht unbedingt mit der Menge synthetisierter Proteine. Daher ist es sinnvoll, die Unterschiede direkt auf Proteinebene zu untersuchen, wie z. B. mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese. Außerdem könnten Proteinmodifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen und Glykosylierungen, eine Rolle bei solchen Differenzierungsprozessen spielen. Das Auftreten solcher Modifikationen kann mit dieser Technik ebenfalls untersucht werden. Die Methode der vergleichenden Proteomanalyse wurde bereits für die Untersuchung der Stadiendifferenzierung anderer *Leishmania*-Spezies, wie *L. infantum* (El Fakhry *et al.*, 2002) und *L. mexicana* (Nugent *et al.*, 2004) angewandt. Für diese beiden Spezies ist es, wie auch für die hier untersuchte Art *L. donovani*, möglich die Stadiendifferenzierung *in vitro* zu vollziehen und so ausreichend Material für eine Proteomanalyse zu erhalten.

Insgesamt konnten ungefähr 700 Proteine in den 2D-Gelen der Tage 0 und 3 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani* separiert werden. Dies repräsentiert ca. 10% der im Zuge des Genomprojekts identifizierten 8213 Protein-kodierenden Gene in *Leishmania* (<http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp>). Von diesen 700 Proteinen wurden ca. 40 als stadien-spezifisch reguliert identifiziert. Da in der hier vorliegenden Studie ausschließlich Coomassie-Brilliant-Blau Färbungen, Gesamtproteinextrakt und nur zwei verschiedene pH-Gradienten für die erste Dimension verwendet wurden, konnten im Vergleich zu den Proteomanalysen der anderen *Leishmania*-Spezies wesentlich weniger Proteine visualisiert werden. In diesen Studien konnten ca. 2000 Proteine getrennt werden (El Fakhry *et al.*, 2002; Nugent *et al.*, 2004). 62 (El Fakhry *et al.*, 2002), bzw. 156 (Nugent *et al.*, 2004) davon wurden als reguliert synthetisiert identifiziert. Die weitaus höhere Anzahl an regulierten spots in der *L. mexicana* Analyse (Nugent *et al.*, 2004) bedingte sich durch die Untersuchung

von Änderungen im Proteinsynthesemuster während der Metazyklogenese als auch innerhalb der Differenzierung zur Amastigote.

Das Verhältnis von Gesamtanzahl der auf den 2D-Gelen dargestellten Proteinen zu der Anzahl an differenziellen *spots*, ist bei der in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalyse vergleichbar mit dem der anderen Studien. Die sensitivste Methode zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist die Silberfärbung. Sie erlaubt allerdings keine Quantifizierung der Proteinmengen, da die Färbungsintensität nicht direkt mit der Proteinmenge in Korrelation zu setzen ist. Außerdem ist eine verlässliche Identifizierung der gefärbten Proteine mittels Massenspektrometrie nicht möglich, weswegen sie in dieser Studie nicht zum Einsatz kam.

Insgesamt wurden 41 *spots* aus den 2D-Gelen mittels MALDI-MS analysiert. Von ihnen konnten 33 Proteine eindeutigen Datenbankeinträgen zugeordnet werden. Da zusätzlich zu der NCBI-Datenbank, ebenfalls die Proteindatenbank aus dem *L. major* Genomprojekt durchsucht wurde, konnte eine Identifizierung der meisten Proteine erwarten werden. Allerdings ist die Annotation der Proteine noch nicht vollständig, was erklären könnte, warum acht der erhaltenen Peptidmassen-*fingerprints* nicht zugeordnet werden konnten. Möglich wären allerdings auch unvollständige Peptidmassenspektren, die für eine Identifizierung der entsprechenden Proteine nicht ausreichend waren. Auf Grund der hohen Konservierung der Aminosäuresequenzen von *L. major* und *L. donovani* (92-96%), konnte zusätzlich die *L. major* GeneDB Datenbank verwendet werden. Bei Durchsuchung der NCBI-Datenbank konnten einige der Massen-*fingerprints* auch *T. brucei*, *T. cruzi* und *Crithidia fasciculata* homologen Proteinen zugeordnet werden. Da alle diese Organismen ebenfalls zur Familie der Trypanosomatidae gehören, zeigen auch hier die Aminosäuresequenzen hohe Homologien.

Die Tabellen 2 und 3 (siehe 3.1.4) zeigen, dass die 33 identifizierte Proteine 29 verschiedene Moleküle darstellen. Bei den restlichen vier handelte es sich in drei Fällen um interne Kontrollen, die eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigten. Das  $\alpha$ -Tubulin wurde zweimal identifiziert. Die beiden *spots* zeigten in den 2D-Gelen eine ähnliche Regulation, allerdings wurden leicht abweichende molekulare Massen und isoelektrische Punkte bestimmt. Es könnte sich hierbei um Degradationsprodukte handeln. In der Proteomanalyse der Stadiendifferenzierung von *L. mexicana* wurden ebenfalls amastigoten-spezifische Tubulin-Fragmente identifiziert (Nugent *et al.*, 2004).

19 der 29 Proteine zeigten eine promastigoten-spezifische Regulation. Von denen elf in der anschließenden MALDI-Analyse identifiziert werden konnten. Acht von ihnen konnten bereits bekannten Proteinen zugeordnet werden, bei drei handelte es sich um hypothetische Proteine unbekannter Funktion. Drei der bereits bekannten Proteine sind in die Aminosäuresynthese involviert (Adenosylhomocysteinase, S-Adenosylmethioninsynthese und Glutaminsynthese). Bei drei weiteren Proteinen handelt es sich um Energiestoffwechsel- oder Phosphorylierungsenzyme (Aldolase-Epimerase verwandtes Protein 2, Adenylatkinase und LACK). Das *cdc27*- verwandte Kerngerüst Protein und der Replikationsfaktor A sind an der Zellzykluskontrolle beteiligt.

Zehn der 29 identifizierten Proteine waren amastigoten-spezifisch. Sieben dieser zehn amastigoten-spezifischen Proteine wiesen eine eindeutig bekannte Funktion auf. Drei

dieser Proteine sind in die zelluläre Stressantwort involviert (ATPase, HSP90, Peroxiredoxin). Ihre Regulation wurde schon in anderen Organismen im Zusammenhang mit Stresssituationen beschrieben. *Streptococcus mutans* z. B. zeigt nach pH-Erniedrigung ebenfalls ein erhöhtes ATPase-Proteinniveau (Quivey *et al.*, 2000). In Leishmanien konnte eine gesteigerte Synthese von HSP90 nach Hitzeschock gezeigt werden (Brandau *et al.*, 1995) und auch Peroxiredoxine wurden bereits als reguliert synthetisiert identifiziert (siehe 4.2.4).  $\alpha$ -Tubulin und CAB55346 (im Verlauf dieser Arbeit als die 70 kDa Untereinheit des *outer dynein arm docking complex* identifiziert) sind Teile des Cytoskeletts. Das Poly-Zink-Finger Protein und das Poly(A)-Bindungsprotein sind an genregulatorischen Prozessen beteiligt. Dies konnte bereits für beide Proteine gezeigt werden (Abeliovich *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 2000; Espinosa *et al.*, 2003; Hendriks *et al.*, 2003; Webb and McMaster, 1993).

Die hier identifizierten, stadien-spezifischen Proteine lassen sich somit in Kategorien zusammenfassen, die auch in den Proteomanalysen von *L. infantum* und *L. mexicana* identifiziert wurden. Zu diesen Kategorien zählen unter anderem Energiestoffwechsel, Stressantwort, Signaltransduktion und Phosphorylierungsvorgänge sowie genregulatorische Prozesse. Auf Grund der veränderten Stoffwechselfvorgänge in amastigoten Zellen ist eine Regulation der beteiligten Proteine sehr wahrscheinlich. Auch ist eine erhöhte Synthese von Proteinen, die an der zellulären Stressantwort beteiligt sind, innerhalb der Differenzierungsvorgänge unumgänglich, um die Parasiten an die veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Durch Signaltransduktionskaskaden können diese äußeren Signale effizient intrazellulär weitergegeben werden. Bisher sind die Mediatoren solcher Signale in Kinetoplastiden noch nicht bekannt, mit großer Wahrscheinlichkeit sind aber, wie auch in Hefen und höheren Eukaryoten, Proteinkinasen und Phosphatasen beteiligt.

Im ersten Teil dieser Arbeit (siehe 3.1) wurde gezeigt, dass mit Hilfe einer vergleichenden Proteomanalyse Unterschiede im Proteinsynthesemuster der verschiedenen Stadien des Differenzierungsprozesses von *L. donovani* dargestellt werden können. Trotz eines nicht vorhandenen Genomprojekts für *L. donovani* konnte der Großteil der Proteine identifiziert werden. Durch Fraktionierung der Zellextrakte und den Gebrauch von engeren pH-Gradienten in der ersten Dimension könnte eine höhere Auflösung der Proteome erreicht werden, was eine noch eingehendere Untersuchung der unterschiedlichen Proteinstmuster erlauben würde. Zukünftig könnten außerdem die während der *in vitro*-Stadiendifferenzierung beobachteten Veränderungen der Genexpression mit den Expressionsmustern von aus Wirtszellgewebe isolierten amastigoten Parasiten verglichen werden. Hierbei ergibt sich allerdings das Problem der Probenmenge, da es sehr schwierig ist, ausreichend Parasitenmaterial für eine umfassende Proteomanalyse zu generieren. Außerdem besteht die Gefahr von Kontaminationen der Proben mit Wirtszellkomponenten.

#### 4.1.2 Auswahl amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die nähere Charakterisierung einiger stadien-spezifischer Proteine sein. Es wurde sich dabei ausschließlich auf die amastigoten-

spezifischen Proteine konzentriert, da es sich bei den Amastigoten um das Säugetierstadium des Parasiten handelt und es das für die Pathologie der Krankheit Leishmaniose verantwortliche Stadium ist. Zehn verschiedene, amastigoten-spezifische Proteine konnten im Verlauf der Analyse identifiziert werden (siehe Tabelle 3, 3.1.4). Bei ihnen handelte es sich um fünf Proteine mit einer eindeutigen theoretischen Funktion (ATPase  $\beta$ -Untereinheit, HSP 83, Peroxiredoxin, Poly-Zink-Finger Protein und  $\alpha$ -Tubulin). Außerdem wurden fünf hypothetische Proteine (CAB55364, putatives poly(A)-Bindungsprotein sowie drei hypothetische Proteine aus der *L. major* GeneDB Datenbank) erkannt. Bei der ATPase  $\beta$ -Untereinheit, HSP 83 und  $\alpha$ -Tubulin handelt es sich um essentielle Proteine des Stoffwechsels oder Cytoskeletts. Dies macht sie ungeeignet für bestimmte Untersuchungstechniken, wie z.B. *knock-out* Studien. Zudem handelt es sich bei diesen Proteinen um bereits sehr gut untersuchte Moleküle.

Bei Poly-Zink-Finger Proteinen handelt es sich um potentielle DNA/RNA-Bindungsproteine, die bereits bei anderen Trypanosomatiden beschrieben wurden und im Allgemeinen an genregulatorischen Prozessen beteiligt sind (Abeliovich *et al.*, 1993; Espinosa *et al.*, 2003; Hendriks *et al.*, 2003; Webb and McMaster, 1993). Ihre Fähigkeit, einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden, konnte für alle der untersuchten Trypanosomen-Proteine bestätigt werden. Das Poly-Zink-Finger Protein von *T. brucei* TbCPSF30 ist essentiell für die Spaltung von polycistronischer RNA und Polyadenylierung (Hendriks *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings auf Grund technischer Schwierigkeiten nicht weiter mit der Bearbeitung dieses Proteins fortgefahren werden, obwohl es in Anbetracht seiner bereits beschriebenen Eigenschaften ein für weitere Untersuchungen interessantes Molekül gewesen wäre.

Peroxiredoxine sind antioxidantische Enzyme. Sie sind involviert in den Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies, spielen eine Rolle bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen und sind bereits bei anderen Organismen als stadien-spezifisch reguliert identifiziert worden (z. B. *L. chagasi*, *Plasmodium falciparum*, *Onchocerca volvulus*). Dies macht sie interessant für weiterführende Untersuchungen bezüglich ihrer Funktion innerhalb von *L. donovani*, zumal auch gerade über die mitochondrialen Proteine dieser Enzymgruppe bei Kinetoplastiden bisher wenig bekannt ist.

Hypothetische Proteine bergen bezüglich ihrer Charakterisierungsmöglichkeiten ebenfalls ein großes Potential. Voraussetzung dabei ist allerdings, mindestens einige Anhaltspunkte hinsichtlich ihrer möglichen Funktionen zu haben, wie z. B. konservierte Sequenzmotive oder ähnliches. Da für das Protein Nr. 20 (CAB55364) ein Sequenzmotiv bzw. eine Homologie zu einem bereits bekannten Protein gefunden wurde, wurde dieses Protein für weitere Charakterisierungsstudien ausgewählt. Es handelt sich bei diesem Protein um eine Untereinheit des *outer dynein arm docking complex*, einem Strukturprotein des Flagellums. Da die Ausbildung dieser Struktur spezifisch für ein Stadium des Lebenszyklus von Leishmanien ist, sind solche Proteine in dem hier untersuchten Zusammenhang ebenfalls sehr interessant. Die Abweichung zum erwarteten Expressionsmuster wird ausführlich diskutiert.

## 4.2 Peroxiredoxine in Trypanosomatiden

Peroxiredoxine besitzen antioxidantische Fähigkeiten und reduzieren in Anwesenheit von Elektronendonatoren, wie z. B. Thioredoxin oder Tryparedoxin, Peroxide mit Hilfe reaktiver Cysteinreste in ihrem aktiven Zentrum (Chae *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu anderen bekannten antioxidantischen Enzymen besitzen sie weder gebundene Metallionen (wie z. B. Superoxiddismutasen) noch prosthetische Gruppen (wie z. B. Katalasen). Neben reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) können Peroxiredoxine auch reaktive Stickstoffverbindungen (RNS), wie z. B. Peroxynitrit oder Stickstoffmonoxid reduzieren (Bryk *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2002; Peshenko and Shichi, 2001; Poole and Ellis, 1996).

Die Parasiten der Familie Trypanosomatidae haben einen Thiol-Stoffwechsel, der sich von denen höherer Eukaryoten und Prokaryoten sehr stark unterscheidet. Sie besitzen weder ein Glutathion/Glutathionreduktase System noch Katalasen und Glutathionperoxidasen (Fairlamb and Cerami, 1992). Es wird angenommen, dass das Thiol Trypanothion eine zentrale Rolle innerhalb des Peroxid-Stoffwechsels spielt (Henderson *et al.*, 1987; Penketh and Klein, 1986; Penketh *et al.*, 1987). Trypanothion ist ein Glutathion:Spermidin-Konjugat und wird durch NADPH-abhängige Trypanothionreduktasen in seiner reduzierten Form gehalten. Tryparedoxin, ein entferntes Homolog zu Thioredoxin vermittelt den Elektronentransfer zwischen Trypanothion und Peroxiredoxinen (Guerrero *et al.*, 1999; Levick *et al.*, 1998; McGonigle *et al.*, 1997; Nogoceke *et al.*, 1997; Tetaud *et al.*, 2001). Peroxiredoxine sind die terminalen Peroxidasen dieser einzigartigen Kaskade von Oxidoreduktasen, die Peroxide unter dem Verbrauch von NADPH reduzieren (siehe Abb. 30). Bedingt durch das Fehlen, bzw. die geringe vorhandene Menge von anderen weitaus effizienteren antioxidantischen Enzymen, sind sie das hauptsächliche Peroxid-entgiftende Enzym in Kinetoplastiden. Folglich scheinen Peroxiredoxine ein Schlüsselenzym in der Abwehr von oxidativem Stress in diesen Organismen zu sein (Nogoceke *et al.*, 1997).

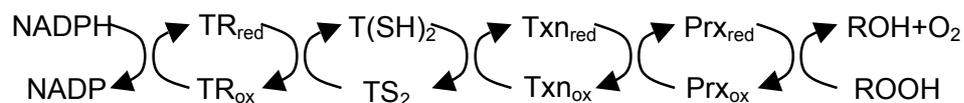


Abb. 30

### Kaskade der Trypanothion-abhängigen Oxidoreduktasen in Trypanosomatiden

Trypanothiondisulfid ( $TS_2$ ) wird durch das NADPH-abhängige Flavoprotein Trypanothionreduktase (TR) zu Dihydrotrypanothion ( $T(SH)_2$ ) umgewandelt.  $T(SH)_2$  kann dann Reduktionsäquivalente auf Tryparedoxin (Txn) übertragen, das wiederum als Elektronendonator für Peroxiredoxine (Prx) dient. Peroxiredoxine sind so in der Lage,  $H_2O_2$  und Alkylhydroperoxide (ROOH) zu metabolisieren.

### 4.2.1 Funktionen von Peroxiredoxinen in *Leishmania* und anderen Organismen

Zu den Abwehrmechanismen von parasitierten Makrophagen gehören unter anderem die Produktion von RNS und ROS. Diese Verbindungen können mit Proteinen, DNA und Lipiden interagieren und wurden mit einer Vielzahl zellulärer Vorgänge wie z. B. Signaltransduktion, Redox-Homöostase, Apoptose, Alterungsprozessen, Aktivierung von T-

Zellen, Tumorwachstum und Pathogeninfektionen in Verbindung gebracht (Butterfield *et al.*, 1999; Droge, 2002; Nathan and Shiloh, 2000; Wood *et al.*, 2003). *Leishmania*-Parasiten sind anfällig gegenüber ROS und RNS-vermittelter Toxizität (Murray and Nathan, 1999; Wilson *et al.*, 1994). Um in Gegenwart dieser Moleküle innerhalb der Makrophagen zu überleben und eine Infektion zu etablieren, müssen sie Mechanismen entwickelt haben, diese zu inaktivieren.

Während ihres Lebenszyklus kommen Leishmanien mit Oxidantien aus verschiedensten Quellen in Berührung.  $H_2O_2$ , Hydroperoxid, Superoxidradikale ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Peroxynitrit werden während des oxidativen *bursts* innerhalb der Phagolysosomen der Makrophagen produziert (Murray, 1982).  $H_2O_2$  entsteht in Kinetoplastiden außerdem als Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransportkette (Turrens and Cazzulo, 1987).

In *C. fasciculata* (Steinert *et al.*, 1999), *T. cruzi* (Wilkinson *et al.*, 2000), *T. brucei* (Tetaud *et al.*, 2001) und *L. infantum* (Castro *et al.*, 2002b) wurde das Vorhandensein von Peroxiredoxinen im Cytosol gezeigt. Diese intrazelluläre Lokalisierung scheint für einen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress von außen ideal zu sein. Es wurden aber auch schon in anderen Kinetoplastiden wie *T. cruzi* (Wilkinson *et al.*, 2000), *L. infantum* (Castro *et al.*, 2002a) und *T. brucei* (Tetaud *et al.*, 2001) Peroxiredoxine mit mitochondrialen Signalsequenzen gefunden.

Den Peroxiredoxinen wurden neben der Entgiftung von ROS und RNS noch weitere Funktionen zugeordnet, wie z. B. die Regulation von  $H_2O_2$ -vermittelter Signaltransduktion in höheren Eukaryoten (Wood *et al.*, 2003) sowie eine Involvierung in der Regulation von Apoptose (Chang *et al.*, 2004; Nonn *et al.*, 2003).

#### 4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz von *LdmPrx*

Bei dem amastigoten-spezifischen Peroxiredoxin von *L. donovani* handelt es sich um ein mitochondriales 2-Cys Peroxiredoxin, das ein Homolog zu bereits identifizierten Peroxiredoxinen darstellt. Es bildet jedoch zusammen mit den homologen Enzymen aus *L. infantum* (Castro *et al.*, 2002a), *T. brucei* (Tetaud *et al.*, 2001) und *T. cruzi* (Wilkinson *et al.*, 2000) eine neue Gruppe innerhalb dieser Enzyme, die alle eine mitochondriale Lokalisierung zeigen. Sie teilen den N-terminalen, konservierten Cysteinrest, der innerhalb eines für alle Peroxiredoxine typischen VCP-Motivs lokalisiert ist. Dieser Cysteinrest bildet das Redoxzentrum, das für die Interaktion mit dem Hydroperoxid verantwortlich ist (Alphey *et al.*, 2000). Das zweite Redoxzentrum, das mit Tryparedoxin interagiert, unterscheidet sich jedoch von dem anderer Peroxiredoxine. Das bei den cytosolischen Formen der Enzyme auch hier vorhandene VCP-Motiv ist gegen die Aminosäureabfolge IPC ausgetauscht. Die umgebenden Sequenzen sind, verglichen mit den cytosolischen Enzymen, ebenfalls etwas unterschiedlich. Nichtsdestotrotz sind ein basisches Zentrum und ein saurer Rest vorhanden, die die Tryparedoxin-Interaktion vermitteln (Flohe *et al.*, 2002). Diese Eigenheiten tragen vermutlich zu der Spezifität mitochondrialer Peroxiredoxine bei.

Ein weiteres Merkmal dieser Enzymgruppe ist das für Eukaryoten typische N-terminale, mitochondriale Importsignal, bestehend aus 27 Aminosäuren. Es ist bekannt,

dass der Transport von Proteinen in die Mitochondrien in Trypanosomatiden sich nicht wesentlich von den Mechanismen in höheren Eukaryoten unterscheidet (Hausler *et al.*, 1997). Die Sequenz ist charakterisiert durch das Vorhandensein einiger hydrophober und positiv geladener Aminosäuren, die den Transport über die mitochondriale Membran vermitteln. Saure Aminosäurereste fehlen gänzlich.

#### 4.2.3 Charakterisierung der Enzymaktivitäten von *LdmPrx* und Lokalisierung des Proteins innerhalb der Mitochondrien

Alle bisher analysierten Peroxiredoxine zeigen Peroxidase-Aktivität *in vitro*. Auch *LdmPrx* ist in der Lage,  $H_2O_2$  und t-BOOH in Konzentrationen ähnlich denen anderer *Leishmania*-Peroxiredoxinen zu entgiften (Barr and Gedamu, 2001; Castro *et al.*, 2002b).

Es konnte ebenfalls ein Schutz vor Hydroxylradikal-induzierten DNA-Strangbrüchen gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit der Lokalisierung des Enzyms innerhalb der Mitochondrien.  $H_2O_2$  kann mit sehr vielen biologischen Makromolekülen interagieren, zu denen auch DNA zählt. Zu den Hauptursachen der Entstehung zellulärer Schäden zählen die hochreaktiven Hydroxylradikale ( $HO\cdot$ ). Sie werden durch die  $Fe^{2+}$ -vermittelte Fenton-Reaktion gebildet und können zu DNA-Stangbrüchen und Mutagenese führen (Cochrane, 1991). Das gehäufte Vorkommen von *LdmPrx*-Molekülen in der unmittelbaren Nähe des Kinetoplasten könnte ein Schutz des mitochondrialen Genoms vor direkten oder indirekten, durch Peroxide ausgelösten Schäden vermitteln. Eine vergleichbare Lokalisierung wurde auch für das mitochondriale Peroxiredoxin von *T. cruzi* beobachtet (Wilkinson *et al.*, 2000). Auch dieses Enzym wurde konzentriert in der Nähe des Kinetoplasten gefunden. Für die anderen trypanosomatiden Peroxiredoxine wurde dies bisher nicht untersucht.

#### 4.2.4 Expression von *ldmprx*

Wie bereits in 1.7 beschrieben findet die Genregulation bei Organismen der Ordnung Kinetoplastida auf post-transkriptioneller Ebene statt. Die Menge an vorhandener mRNA korreliert daher nicht unbedingt mit der Abundanz des entsprechenden Proteins. Northern Blot-Analysen des *ldmprx*-Gens zeigen, dass die RNA-Menge im Verlauf der *in vitro*-Stadiendifferenzierung nicht wesentlich erhöht wird. Die Proteinmenge hingegen steigert sich während des Transformationsprozesses und innerhalb des Kulturverlaufes von früh- zu spät-logarithmischer Wachstumsphase der Parasiten. Eine Behandlung rekombinanter Leishmanien mit dem Antibiotikum Bleocin führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Expression von *ldmprx* (siehe 3.2.8.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene, stressverursachende Parameter wie Hitzeshock, pH-Erniedrigung, dichter werdende Zellkultur und Antibiotika-Behandlung einen Einfluss auf die Regulation der entsprechenden Proteinmenge haben. Eine differentielle Expression von Peroxiredoxinen wurde schon für andere Organismen beschrieben. Für die drei charakterisierten Peroxiredoxine von *L. chagasi* wurde eine Expression des *lcpnx 1* vorwiegend während des amastigoten Stadiums gezeigt, wohingegen *lcpnx 2* und *3* hauptsächlich im promastigoten Stadium exprimiert

werden. Bei den von ihnen kodierten Proteinen handelt es sich allerdings nicht um mitochondriale Enzyme (Barr and Gedamu, 2001). Auch andere parasitische Organismen, wie *P. falciparum* (Kawazu *et al.*, 2000) und *O. volvulus* (Lu *et al.*, 1998) weisen eine stadien-spezifische Regulation von Peroxiredoxinen auf. PfPrx wird innerhalb des Trophozoiten-Stadiums der Plasmodien hochreguliert. Die Menge an Thioredoxin Peroxidase in *O. volvulus* nimmt im Verlauf der Differenzierung zur infektiösen L3-Larve zu. Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich aber ebenfalls nicht um die mitochondriale Form des Enzyms.

Die Regulation eines mitochondrialen Peroxiredoxins wurde für Hefe beschrieben. Das Protein Prx1p aus *S. cerevisiae* wird im Zusammenhang mit dem Umschalten der Zellen auf einen oxidativen Stoffwechsel und als Antwort auf oxidativen Stress hochreguliert (Pedrajas *et al.*, 2000). Bei höheren Eukaryoten gibt es außerdem Hinweise auf eine differentielle Expression des mitochondrialen Peroxiredoxins *prdx3*. Das Gen zeigt ein verändertes Expressionsmuster während neurodegenerativer Erkrankungen, wie dem Down-Syndrom und der Pick-Erkrankung (Krapfenbauer *et al.*, 2003).

#### 4.2.5 Generierung einer $\Delta mprx$ -Mutante

Es wurde bisher kein *knock-out* eines Peroxiredoxin-Gens in Kinetoplastiden beschrieben. Die Gene scheinen für die Parasiten essentiell zu sein. Wilkinson und Mitarbeiter wählten die Methode der RNA-Interferenz (RNAi), um die biologischen Funktionen von Peroxiredoxinen in Trypanosomen zu untersuchen. Die Depletion von TbCPX, einem cytoplasmatischen Peroxiredoxin, in *T. brucei* mittels RNAi hatte einen dramatischen Effekt. Innerhalb von 48 Stunden starb ein Großteil der untersuchten Zellen, die nicht mehr in der Lage waren, die endogen produzierten Peroxide zu entgiften. Die Induktion von RNAi war außerdem mit einer 16-fachen Steigerung der Suszeptibilität gegenüber exogenem  $H_2O_2$  verbunden. Als die Synthese des mitochondrialen Enzyms TbMPX verringert wurde, ergaben sich keine Änderungen hinsichtlich der Wachstumsrate oder der Suszeptibilität gegenüber  $H_2O_2$  (Wilkinson *et al.*, 2003). Dies korreliert mit dem Einstellen sämtlicher mitochondrialer Funktionen, einschließlich der Atmungskette, in den Blutstromformen der Trypanosomen. In Leishmanien dagegen sind die Mitochondrien während des gesamten Lebenszyklus aktiv, so dass Peroxiredoxine essentiell für die Parasiten zu sein scheinen. Da die Methode der RNA-Interferenz in Leishmanien nicht angewandt werden kann, müssen die kodierenden Gene der zu untersuchenden Proteine ausgeschaltet werden. Hierzu bedient man sich der Methode der homologen Rekombination.

Der in 3.2.7 beschriebene Versuch, eine  $\Delta mprx$  *knock-out*-Mutante zu erzeugen, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Wie erwähnt, war es nicht möglich, mit aus *L. major* DNA-Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden das entsprechende Fragment der 5'-UTR aus genomischer DNA von *L. donovani* zu amplifizieren. Wahrscheinlich bestanden zu große Unterschiede innerhalb der gewählten Oligonukleotidsequenzen, so dass keine Anlagerung an die DNA stattfinden konnte.

Die Transfektion von *L. donovani* mit aus *L. major* DNA amplifizierten Konstrukten konnte kein Rekombinationsereignis in den entsprechenden Genlokus hervorrufen. Dies entspricht den bereits erwähnten anzunehmenden Sequenzunterschieden innerhalb der 5'-UTR des Peroxiredoxin-Gens. Eine Sequenzierung der *L. donovani mprx* 5'-UTR wurde nicht durchgeführt, da die im Folgenden diskutierten Ergebnisse aus Transfektionsexperimenten mit *L. major*, auf eine Notwendigkeit des Vorhandenseins des Proteins innerhalb der Parasiten hinwiesen. Um eine *knock-out*-Mutante des entsprechenden Gens in *L. major* zu generieren, wurde zunächst ein Allel des *mprx*-Gens erfolgreich ausgetauscht. In weiteren Versuchen, das zweite Allel zu ersetzen, konnte zwar die Integration des Selektionsmarkers nachgewiesen werden, nicht aber eine verringerte Synthese des Proteins. Die Menge an mPrx-Protein nahm im Vergleich zu der Ein-Allel-Deletionsmutante sogar wieder deutlich zu (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine eventuelle Verdoppelung des gesamten Chromosoms oder nur eines Chromosomenabschnitts zurückzuführen sein. Dieses Phänomen wurde für Leishmanien schon früher beschrieben. Der Versuch, einen homozygoten *knock-out* des Gens der Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase (*dhfr-ts*) in *L. major* zu erzeugen, resultierte bei dem vorherrschenden Teil der analysierten Einzelklone in einer Tetraploidie oder einer Trisomie des entsprechenden Chromosoms (Cruz *et al.*, 1993). Ebenso wurde bei dem Versuch, das Gen für die Trypanothionreduktase (TR) in *L. major* auszuschalten, eine partielle Trisomie des TR-Lokus nach gezieltem Gen-*knock-out* nachgewiesen (Dumas *et al.*, 1997). Nachdem beide Allele des Gens erfolgreich ersetzt werden konnten, wurde eine dritte Kopie des Gens als Folge einer genomischen Umstrukturierung generiert, die eine Translokation der TR-enthaltenden Region auf ein anderes Chromosom beinhaltete. Es wird vermutet, dass diese Ereignisse auf die Lebensnotwendigkeit der jeweiligen Genprodukte zurückzuführen sind. Ob es bei dem in dieser Arbeit untersuchten Peroxiredoxin-Gen ebenfalls zu einem solchen Ereignis gekommen ist, wurde im Verlauf der Arbeit nicht untersucht.

Um zu klären, ob ein Ausschalten des Gens letal für die Leishmanien ist, sollte in *mprx*-überexprimierenden Zellen ein gezielter Gen-*knock-out* durchgeführt werden. Mit Hilfe des in 3.2.8 beschriebenen Vektors *LdmPrx:pX63pol* wurde eine Überexpression in *L. major* hervorgerufen und die rekombinanten Parasiten mit DNA-Konstrukten für die homologe Rekombination transfiziert (Daten nicht gezeigt). Die Zellen sollten nun, auch im Falle einer Letalität des *knock-outs*, normales Wachstumsverhalten zeigen, da sie das anscheinend lebenswichtige Protein nicht verlieren, sondern das Gen von einer episomalen Kopie exprimieren. Unterbricht man die Zugabe des Antibiotikums, dessen Resistenz auf dem Vektor kodiert ist, könnte man überprüfen, ob eine Selektion auf solche Parasiten stattfindet, die das Plasmid auch ohne Zugabe des entsprechenden Antibiotikums tragen. So wäre eine eventuelle stadien-spezifische Lebensnotwendigkeit des Proteins zu überprüfen gewesen. Da das Peroxiredoxin nur in sehr geringen Konzentrationen im promastigoten Stadium der Parasiten vorhanden ist, konnte davon ausgegangen werden, dass es wahrscheinlich in der amastigoten Form essentiell ist. Allerdings führte auch dieser Versuch nicht zu dem erwarteten Ergebnis. Nach einer ersten Transfektionsrunde mit für die homologe Rekombination verwendeten Konstrukten konnten viable Zellen erhalten werden. In einer zweiten Runde war dies allerdings nicht mehr möglich. Es konnte

nicht geklärt werden, ob dies auf technische Schwierigkeiten oder biologische Phänomene zurückzuführen war.

#### 4.2.6 Charakterisierung möglicher Funktionen von *LdmPrx in vivo*

##### 4.2.6.1 Hat *LdmPrx* einen Einfluss auf andere stadien-spezifische Proteine?

Da die Generierung einer *knock-out* Mutante des untersuchten Peroxiredoxins nicht erfolgreich war, wurde eine andere Methode zur Untersuchung möglicher Funktionen des Proteins gewählt. Hierzu wurde das Gen in Leishmanien überexprimiert und die resultierende Proteinmenge in früh- bzw. spät-logarithmisch wachsenden Zellen mittels Western Blot-Analyse überprüft (siehe 3.2.8.1). Da bereits innerhalb der endogenen Expression ein Unterschied im Verlauf der Kultur beobachtet wurde, war eine Untersuchung der verschiedenen Wachstumsphasen hier ebenfalls sehr wichtig. Es zeigte sich, dass auch in diesem Experiment ein Unterschied zwischen früh- und spät-logarithmisch wachsenden Zellen zu detektieren war. Nur die früh-logarithmisch wachsenden Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen sehr deutlichen Unterschied in der vorhandenen Peroxiredoxinmenge. Behandlung mit dem Selektionsantibiotikum Bleocin und die dichter werdende Kultur führten ebenfalls zu einer Steigerung der Proteinmenge. Um zu gewährleisten, dass eventuelle Unterschiede in den nachfolgenden Experimenten auf die verschiedenen Mengen an Peroxiredoxin in den Parasiten zurückzuführen war, wurden ausschließlich Zellen aus der früh-logarithmischen Phase eingesetzt.

Die Überexpression von *ldmprx* zeigte keinen Einfluss auf das Synthesemuster anderer stadien-spezifischer Proteine. Dazu wurden die Mitglieder der A2-Familie und das HSP100 untersucht, deren Expression durch bestimmte Faktoren beeinflusst werden kann. So kommt es z. B. bei einer Inaktivierung von HSP90 durch den spezifischen Inhibitor Geldanamycin zu einer Induktion der A2-Proteine und HSP100-Synthese ohne einen zusätzlichen Hitzeschock (Wiesgigl and Clos, 2001). Die in rekombinanten Promastigoten stark erhöhte Synthese eines normalerweise hauptsächlich in Amastigoten vorhandenen Proteins hätte ebenfalls zu einer Veränderung des Synthesemusters dieser Proteine führen können. Die Überexpression von *ldmprx* zeigte aber keine diesbezügliche Auswirkung.

##### 4.2.6.2 Schützt Überexpression von *ldmprx* vor oxidativem Stress?

*In vitro* nachgewiesene Peroxidase-Aktivitäten von *LdmPrx* beinhalten nicht zwingend auch eine Funktion des Proteins im Schutz der Zellen vor oxidativem Stress *in vivo*. Wie schon erwähnt können Peroxiredoxine auch andere biologische Funktionen ausüben, wie z. B. in der Signaltransduktion (Wood *et al.*, 2003) oder während der Regulation von Apoptose (Chang *et al.*, 2004).

Es konnte kein Schutz promastigoter (siehe 3.2.8.3.) oder auch intrazellulärer amastigoter Zellen (siehe 3.2.8.4) gegen exogen produzierten oxidativen Stress beobachtet werden. Eine frühe Kontrolle von *Leishmania*-Infektionen im Tiermodell ist bedingt durch

die Produktion von ROS und RNS (Gantt *et al.*, 2001; Murray and Nathan, 1999). Die Parasiten sind deshalb auf effektive antioxidantische Entgiftungsmechanismen angewiesen. Die Überexpression von cytoplasmatischen Peroxiredoxinen ist ausreichend, den Zellen eine Resistenz gegenüber exogenen Peroxiden zu vermitteln (Barr and Gedamu, 2001; Castro *et al.*, 2002b; Wilkinson *et al.*, 2000). Die mitochondriale Lokalisierung von *LdmPrx* scheint dagegen nicht geeignet zu sein, einen effektiven Schutz zu gewährleisten. Die hier ermittelten Daten bezüglich der Überlebensraten promastigoter Leishmanien unter dem Einfluss von oxidativem Stress und die Proliferationsraten amastigoter Parasiten in peritonealen Makrophagen zeigen, dass *LdmPrx* eine andere biologische Funktion haben muss.

#### 4.2.6.3 *LdmPrx* und apoptose-ähnlicher Zelltod in Leishmanien

In Säugetierzellen ist die Produktion von ROS in Mitochondrien mit der Aktivierung von Apoptose assoziiert (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Wallace, 1999). Die mitochondriale Erzeugung von ROS scheint ein frühes Ereignis in der apoptotischen Signalkaskade zu sein, die durch TNF- $\alpha$ , Ceramid oder Glutamat initiiert wird (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992). Andere Studien wiederum zeigen, dass die Produktion von ROS in apoptotischen Zellen erst relativ spät zu beobachten ist (Jacobson and Raff, 1995). Die meisten dieser Beobachtungen beziehen sich allerdings auf den Effekt von  $O_2^{\cdot-}$  auf die mitochondrialen Funktionen. Wie die Produktion von  $H_2O_2$  in den Mitochondrien deren Funktion beeinflusst ist bisher ungeklärt. Chang und Mitarbeiter demonstrierten das *Prdx3* in den Mitochondrien von Säugetierzellen lokalisiert ist. Es ist dort sehr viel abundanter als Glutathionperoxidase, was bisher als das wichtigste mitochondriale,  $H_2O_2$ -entgiftenden Enzym angesehen wurde. Sie untersuchten außerdem die regulatorische Funktion von *Prdx3* innerhalb von durch Staurosporin oder TNF- $\alpha$  induzierter Apoptose. Durch die Depletion von *Prdx3* kam es zu einer Anhäufung von  $H_2O_2$  in den Mitochondrien, was wiederum eine erhöhte Apoptoserate zur Folge hatte (Chang *et al.*, 2004). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass *Prdx3* ein wichtiges antioxidantisches Enzym innerhalb der Regulation physiologischer  $H_2O_2$ -Spiegel ist. Die Überexpression von *prdx3* führt zu einem verlangsamten Zellwachstum, während es vor Apoptose-induzierenden Effekten hoher  $H_2O_2$ -Konzentrationen schützt (Nonn *et al.*, 2003).

Es gibt mittlerweile viele Berichte über Apoptose oder programmierten Zelltod-ähnlichen Prozessen in einzelligen Organismen, wie z. B. Trypanosomatiden (Ameisen, 1996; Ameisen *et al.*, 1996; Arnoult *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002) (Mukherjee *et al.*, 2002; Zangger *et al.*, 2002), Bakterien (Sat *et al.*, 2001), Hefe (Madeo *et al.*, 2002), *Plasmodium* (Al-Olayan *et al.*, 2002), Dinoflagellaten (Vardi *et al.*, 1999), *Dictyostelium discoideum* (Cornillon *et al.*, 1994) und *Tetrahymena* (Davis *et al.*, 1992). Allerdings ist über die molekularen Mechanismen dieser Art des programmierten Zelltodes bisher erst sehr wenig bekannt. Das und Mitarbeiter konnten zeigen, dass *L. donovani* promastigote Zellen nach Exposition mit  $H_2O_2$  verschiedene Merkmale der Säugetier-Apoptose zeigen. Dies beinhaltet Chromatinkondensation im Kern, intrazelluläre Akkumulation von  $Ca^{2+}$ , Aktivierung von Caspase-ähnlichen Proteasen, Fragmentierung von

zellulärer DNA, Spaltung von Poly(ADP)Ribose-Polymerase (PARP)-ähnlichen Enzymen und Verringerung des Zellvolumens (Das *et al.*, 2001). In prozyklischen Formen von *T. brucei* konnten durch Behandlung mit Concavalin A oder durch oxidativen Stress ebenfalls morphologische Veränderungen, die auf einen apoptotischen Zelltod schließen lassen, beobachtet werden (Ridgley *et al.*, 1999; Welburn *et al.*, 1999). Auch promastigote *L. amazonensis* Zellen zeigen nach einem Hitzeschock klassische Merkmale von Apoptose, wie z. B. Fragmentierung der zellulären DNA und Kondensation des Chromatins (Moreira *et al.*, 1996).

Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass es nach Behandlung von *L. donovani* Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt, was auf eine Beteiligung dieses Organells an den Zelltod-vermittelnden Prozessen schließen lässt (Mukherjee *et al.*, 2002). Mitochondriale Proteine könnten daher in die Regulation dieser Vorgänge involviert sein. Die Ergebnisse aus 3.2.8.5 zeigen, dass eine Überexpression des mitochondrialen Peroxiredoxins von *L. donovani* zu einem Schutz vor der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelösten Degradation zellulärer DNA führt. Es konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit 1-3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wesentlich weniger Zellen eine positive TUNEL-Färbung aufwiesen. Die Methode der TUNEL-Färbung erlaubt eine zuverlässige Detektion von apoptischen Zellen (Piqueras *et al.*, 1996). Der beobachtete Effekt wird bei höheren Konzentrationen von, sowie bei längerer Inkubationsdauer mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wieder aufgehoben. Es können dann in beiden untersuchten Populationen kaum noch TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration sowie die Dauer der Inkubation scheinen hierbei kritisch zu sein.

Diese Ergebnisse bestätigen die für Säugetier-Peroxiredoxine beobachteten Eigenschaften (Chang *et al.*, 2004; Nonn *et al.*, 2003). Eine solche Funktion konnte für die homologen Proteine aus Protozoen bisher noch nicht gezeigt werden. Um die molekularen Mechanismen der, unter diesen Umständen, hervorgerufenen Art des Zelltodes, näher zu charakterisieren, müssten weitere Untersuchungen gemacht werden. Es wäre beispielsweise wichtig die intrazelluläre Akkumulation von Ca<sup>2+</sup> zu bestimmen, sowie die Aktivierung von Caspase-ähnlichen Proteasen und die Spaltung von PARP-ähnlichen Proteinen zu untersuchen. Auch könnte der Einfluss von *LdmPrx* auf durch andere Stimuli ausgelöste Induktion von Apoptose untersucht werden.

Es wird vermutet, dass es sich bei dem programmierten Zelltod in Trypanosomatiden um ein evolutionäres „Überbleibsel“ handelt und er keine bestimmte Funktion hat. Er kann durch viele Stimuli ausgelöst werden, wie z. B. die Behandlung mit verschiedenen Drogen, oxidativen und nitrogenen Stress, Inhibition von Signalmolekülen, Exposition mit humanem Serum, Nährstoffmangel und Hitzeschock (Zangger *et al.*, 2002). Die erhöhte Synthese eines Proteins, das gegen diese Art des Zelltodes schützt, kann somit in Stresssituationen für die Parasiten unbedingt notwendig sein.

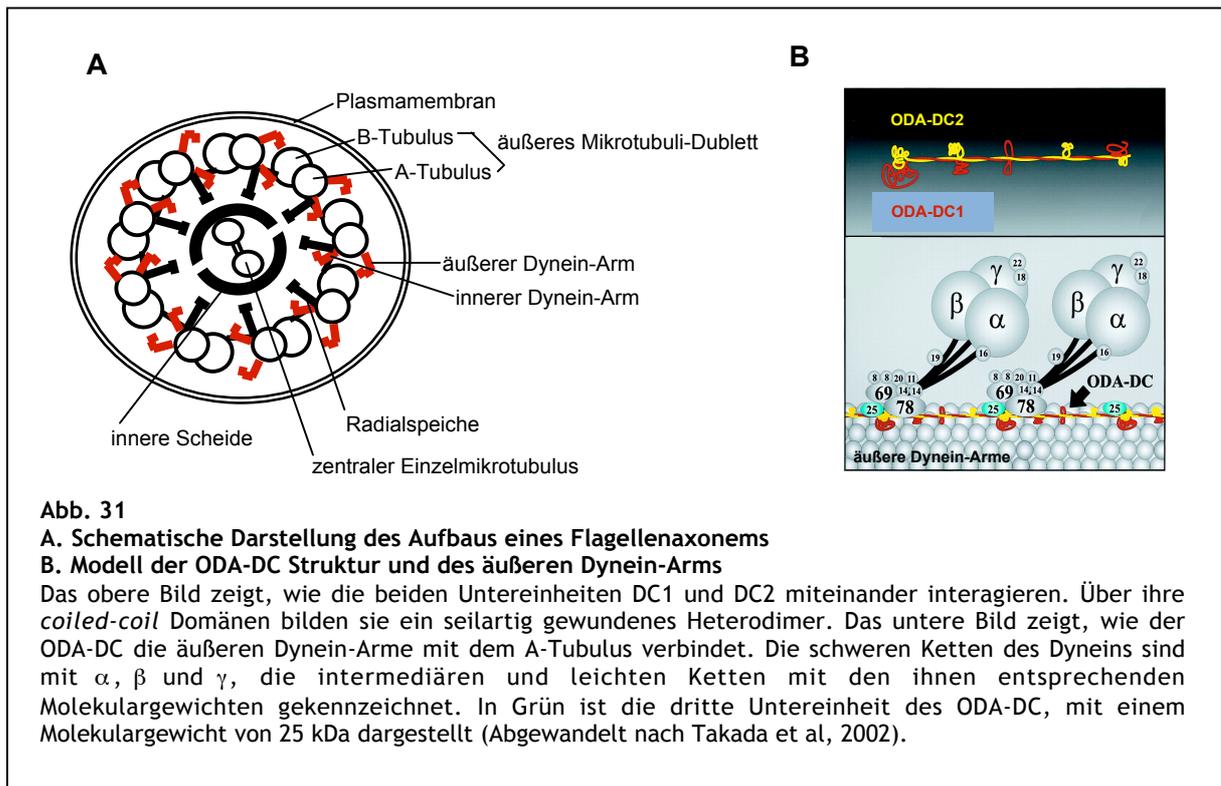
### 4.3 Outer dynein arm docking complex

Ein weiteres während der Proteomanalyse der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani* identifiziertes Protein war eine Untereinheit des *outer dynein arm docking complex*.

Dyneine sind Mikrotubuli-abhängige Motorproteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Unter dem Verbrauch von ATP können sie sich an Mikrotubuli entlang bewegen. Die Cilien und Flagellen eukaryotischer Zellen besitzen drei Klassen von Dyneinen: cytoplasmatische Dyneine sowie die inneren und äußeren Dynein-Arme des Axonems. Jedes dieser verschiedenen Dyneine bindet an strukturell und biochemisch einzigartige Bindungsstellen, die eine hohe Spezifität vermitteln. Die molekularen Mechanismen, die dieser spezifischen Bindung zu Grunde liegen, sind für die Bewegungen der Flagellen von essentieller Bedeutung. In Abb. 31 A ist der Aufbau eines Flagellenaxonems dargestellt. Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* dient als Modellorganismus für Untersuchungen zum Aufbau und Funktion von Flagellen. Sehr gut charakterisiert ist der äußere Dynein-Arm (Pazour and Witman, 2000; Wilkerson *et al.*, 1994). Diese Dyneine produzieren 4/5 der Kraft der Flagellenbewegung (Brokaw, 1994) und binden mit ihrer Unterseite an spezifische Stellen des A-Tubulus des äußeren Mikrotubuli-Dubletts. Die globulären Köpfe (bestehend aus den so genannten schweren Ketten) besitzen eine Bindungsstelle für den B-Tubulus. Sie sind in einem regelmäßigen Abstand von 24 nm über die gesamte Länge des Axonems angeordnet. Der äußere Dynein-Arm besteht aus mehreren Polypeptidketten: es handelt sich hierbei um drei schwere Ketten (HC $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), zwei intermediäre Ketten (IC78 und IC69) und mehrere leichte Ketten (LC1-8). Die zwei intermediären Ketten und die meisten der leichten Ketten liegen in einem Komplex auf der Unterseite des Moleküls vor (siehe Abb. 31 B) (King and Witman, 1990). IC78 steht in direktem Kontakt mit dem Strukturprotein Tubulin *in vivo* (King *et al.*, 1991) und ist ein Mikrotubuli-bindendes Protein *in vitro* (King *et al.*, 1995). Es scheint eine der Komponenten zu sein, die das Dynein mit dem A-Tubulus verankert. Diese Bindung ist ATP-unabhängig. Takada und Kamiya konnten einen weiteren Proteinkomplex identifizieren, der für die Assoziation des äußeren Dynein-Arms an die Mikrotubuli verantwortlich ist, den *outer dynein arm docking complex* (ODA-DC) (Takada and Kamiya, 1994). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex aus drei Proteinen besteht, die in äquimolaren Mengen und in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit den Polypeptidketten des äußeren Dynein-Arms vorliegen (Casey *et al.*, 2003; Koutoulis *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 2002). Diese Arbeiten führten zu den in Abb. 31 B dargestellten Modellen. Die Untereinheiten DC1 (~105 kDa) (Koutoulis *et al.*, 1997) und DC2 (~70 kDa) (Takada *et al.*, 2002) besitzen *coiled-coil* Domänen und sind  $\alpha$ -helikal umeinander gewunden. DC3 (~25 kDa) (Casey *et al.*, 2003), Mitglied einer EF-Hand-Superfamilie Ca<sup>2+</sup>-bindender Proteine, ist ebenfalls essentiell für den Aufbau des äußeren Dynein-Arms sowie des ODA-DC.

Die Flagellen von den hier untersuchten trypanosomatiden Parasiten weisen neben der bereits beschriebenen Struktur des Axonems eine Besonderheit auf. Das *paraflagellar*

*rod* (PFR) besteht aus einem einzigartigen Netzwerk aus Filamenten des Cytoskeletts, das entlang des gesamten Axonems zu finden ist (Bastin *et al.*, 1996). Diese Struktur findet man ausschließlich in den Flagellen von Kinetoplastiden, Euglenida und Dinoflagellaten. Es konnte gezeigt werden, dass es in *L. mexicana* und *T. brucei* essentiell für die Bewegung der Zellen ist (Bastin *et al.*, 1998; Santrich *et al.*, 1997). Über weitere Funktionen ist bisher wenig bekannt. Bis auf diese Besonderheit ist der Flagellenaufbau in Kinetoplastiden mit dem anderer Eukaryoten zu vergleichen.



#### 4.3.1 Analyse der Aminosäuresequenz von *LdDC2*

Bei der hier identifizierten Untereinheit des ODA-DC handelt es sich um die 70 kDa Untereinheit DC2. Das Produkt des entsprechenden *L. donovani* Gens ergab ein 70 kDa Protein, dessen Sequenz insgesamt vier Regionen besitzt, die hohe Wahrscheinlichkeiten zur Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen aufweisen. Die Funktion dieser Strukturen liegt im Allgemeinen in der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren (Lupas, 1996). Für das homologe Protein aus *C. reinhardtii* konnte gezeigt werden, dass diese Regionen höchstwahrscheinlich für die Interaktion des CrDC2 mit der zweiten Untereinheit des ODA-DC, DC1, verantwortlich sind (Takada *et al.*, 2002). DC1 besitzt ähnliche Strukturmerkmale und liegt mit DC2 assoziiert vor (Koutoulis *et al.*, 1997).

Der C-terminale Teil des CrDC2 beinhaltet einen kurzen, Glutaminsäure-reichen Sequenzabschnitt, der von einer Region gefolgt wird, die durch einen hohen Anteil an geladenen Aminosäureresten charakterisiert ist. Es wird vermutet, dass über diese Region

eine Interaktion mit den Tubulinen des äußeren Dynein-Arms sowie mit der intermediären Kette (IC78) stattfindet. *LdDC2* besitzt ebenfalls eine solche Region, allerdings ist sie etwas kürzer, als in dem *Chlamydomonas* Homolog.

Im Gegensatz zu *CrDC2* konnte für *LdDC2* ein zusätzliches EF-Hand-Motiv in der Nähe des C-Terminus identifiziert werden. Solche Motive konnten auch für *CrDC3*, der dritten Untereinheit des ODA-DC, bestimmt werden (Casey *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass das Protein in die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation der Aktivität des äußeren Dynein-Arms involviert ist.

Bei der Durchsuchung der *L. major* Proteindatenbank konnten homologe Proteine sowohl für *CrDC1* als auch für *CrDC3* gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass auch in Leishmanien die äußeren Dynein-Arme über einen ODA-DC mit dem A-Tubulus verankert sind. Der Aufbau von Flagellen und Cilien zeigt über die gesamte Evolution eine bemerkenswerte Konservierung (Silflow and Lefebvre, 2001).

Eine große Anzahl an Proteinen ist für den korrekten Aufbau eines Flagellums notwendig. Das Axonem besteht aus mindestens 250 verschiedenen Polypeptidketten (Piperno and Mead, 1997), die aus dem Cytoplasma importiert werden müssen, da Flagellen keine eigenen Ribosomen besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Signalsequenzen den Transport von Proteinen in die Flagellen von Kinetoplastiden vermitteln (Bastin *et al.*, 1999; Snapp and Landfear, 1999). Allerdings werden z. B. die Dynein-Arme vor dem Transport in die Flagellen im Cytoplasma zusammengesetzt (Fok *et al.*, 1994). Für die korrekte intrazelluläre Lokalisierung sind Signalsequenzen somit wahrscheinlich nur für einige Proteine dieser großen Komplexe notwendig. Es konnte für das *LdDC2* keine zu den bereits bei anderen Kinetoplastiden beschriebenen Flagellenimportsignalen ähnliche Sequenz gefunden werden. Es scheint im Verbund mit anderen Proteinen in die Flagellen transportiert zu werden.

#### 4.3.2 Expressionsmuster von *lddc2*

Während der Proteomanalyse der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani* wurde das *LdDC2* als amastigoten-spezifisches Protein identifiziert (siehe 3.1). Eine Western Blot-Analyse mit einem spezifischen Antiserum ergab allerdings eine Synthese des Proteins ausschließlich im promastigoten Stadium der Parasiten (siehe 3.3.4). Auf Grund der Funktion des Proteins ist eine Expression in den amastigoten Zellen nicht zu erwarten, da der Parasit in diesem Lebensstadium nur noch ein rudimentäres Flagellum besitzt. Tabelle 3 (siehe 3.1.4) zeigt eine Abweichung des theoretisch erwarteten und experimentell bestimmten Molekulargewichts des identifizierten Proteins. Der theoretische Wert betrug 70 kDa während das tatsächlich vorhandene und auf den 2D-Gelen detektierte Protein ca. 35 kDa groß war. Eventuell könnte es sich hierbei um ein Abbauprodukt von *LdDC2* handeln, das während der Rückbildung des Flagellums im Verlauf der Stadiendifferenzierung entsteht. In der Proteomanalyse der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. mexicana* wurde das *paraflagellar rod*-Protein 2C als amastigoten-spezifisch identifiziert (Nugent *et al.*, 2004). Auch hierbei handelte es sich allerdings nur um ein

Fragment des Proteins. Im Verlauf der Differenzierung zur amastigoten Zelle scheinen Abbauprodukte des Flagellums zu entstehen, die noch über einen längeren Zeitraum nachzuweisen sind.

Eine Northern Blot-Analyse der *lddc2* Expression zeigte eine im Verlauf der Stadiendifferenzierung abnehmende Intensität des Transkripts. Das Protein hingegen konnte schon an Tag 1 der Transformation nicht mehr detektiert werden. So konnte ein weiteres Mal bestätigt werden, dass in trypanosomatiden Organismen die Menge an vorhandener RNA nicht unbedingt mit der Proteinabundanz korreliert. Obwohl in diesem Fall eine ähnliche Tendenz beobachtet wurde.

Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass das untersuchte Protein in *L. donovani* eine flagellare Lokalisierung aufweist. Dies bestätigte erneut die sich aus der Aminosäuresequenz ergebende Funktion von *LdDC2*.

### 4.3.3 Generierung einer $\Delta lddc2$ -Mutante

Durch die hohe Konservierung der 5`- und 3`-UTR des DC2-Gens zwischen *L. donovani* und *L. major* konnte mit aus *L. major* Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden *L. donovani* DNA amplifiziert werden. Die Transfektion von *L. donovani* Zellen mit den so hergestellten DNA-Konstrukten ergab einen Austausch beider Allele des *lddc2*-Gens. Dies konnte in zwei unabhängigen Transfektionsexperimenten erreicht werden. PCR- und Western Blot-Analysen der beiden klonierten Zelllinien zeigten, dass sowohl das *lddc2*-Gen als auch das *LdDC2*-Protein nicht mehr vorhanden waren. Dies führte zu identischen phänotypischen Auswirkungen, weswegen davon ausgegangen werden konnte, dass diese auf die Deletion von *lddc2* zurückzuführen waren. Durch Transfektion mit einem *lddc2*-kodierenden Plasmid konnte der Wildtyp-Phänotyp komplementativ wieder hergestellt werden, ein weiterer Beweis für den genetischen *knock-out* als Ursache der Veränderungen.

### 4.3.4 Phänotypische Veränderungen der $\Delta lddc2$ -Mutanten

#### 4.3.4.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die  $\Delta lddc2$  *knock-out*-Zellen wiesen, im Vergleich zum Wildtyp, mehrere morphologische Veränderungen sowie eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit auf. Die Parasiten, denen *LdDC2* fehlte, waren wesentlich kleiner und zeigten eine abgerundete Zellform. Die Flagellen waren deutlich verkürzt bis fast gar nicht mehr vorhanden und die Zellen waren entsprechend nicht so beweglich wie *L. donovani* Wildtyp Parasiten. Die so genannte *oda1* Mutante von *C. reinhardtii* zeigt einen ähnlichen Phänotyp (Kamiya, 1988; Takada and Kamiya, 1997; Takada *et al.*, 2002). Den Zellen fehlt der äußere Dynein-Arm sowie der ODA-DC. Sie wurden erstmalig auf Grund ihres verlangsamten Schwimmens mit einer stark verringerten Frequenz sowie auch Kraft der Flagellenbewegung, nach einer chemischen Mutagenese isoliert (Kamiya, 1988). Später konnte gezeigt werden, dass der

Phänotyp auf eine Mutation des *crdc2*-Gens zurückzuführen ist, die auf der Generierung eines Stopcodons direkt nach der Translationsinitiationsstelle beruht (Takada *et al.*, 2002).

Immunfluoreszenzanalysen sowie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe 3.3.8.1 und 3.3.8.2) der  $\Delta$ *lddc2* Leishmanien zeigen verkürzte Geißeln. Um diesen Phänotyp weiter zu untersuchen, könnten transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Geißel durchgeführt werden. Hierbei ließe sich genau feststellen, welche Struktur in den zurückgebildeten Flagellen fehlt. Anscheinend führt der *knock-out* des *lddc2*-Gens bei den hier untersuchten Leishmanien zu einer etwas stärker ausgeprägten phänotypischen Veränderung als bei *Chlamydomonas*, da nicht nur die Beweglichkeit der Flagellen, sondern auch ihr gesamtes morphologisches Erscheinungsbild beeinträchtigt ist. Es könnte überprüft werden, wie sich der *knock-out* auf die Expression und Lokalisierung anderer Flagellenproteine, wie z. B. den *paraflagellar rod* Proteinen oder den Mitgliedern der intraflagellaren Transport-Maschinerie, auswirkt. Die PFR-Proteine sind essentiell für Bewegungen der Flagellen in *Trypanosoma* und *Leishmania* (Bastin *et al.*, 1998; Santrich *et al.*, 1997). Der Zusammenbau und die Erhaltung eukaryotischer Flagellen sind von einem Transportsystem abhängig, das als *intraflagellar transport* (IFT) bezeichnet wird. Es konnte gezeigt werden, dass in *Chlamydomonas* die Stabilität des Axonems und die Erhaltung der Flagellenlänge von diesem Transportmechanismus abhängig sind (Silflow and Lefebvre, 2001). Untereinheiten der Axonemstruktur werden aus dem Cytoplasma, in dem sie synthetisiert werden, zu den Spitzen der Flagellen transportiert, wo sie an die Enden der Mikrotubuli gefügt werden (Johnson and Rosenbaum, 1992). Kinesin II und ein cytoplasmatisches Dynein (DHC1b) sind die Schlüsselproteine dieser Transportmaschinerie, die in den anterograden (vom Basalkörper zur Spitze) und den retrograden IFT (von der Spitze zum Basalkörper) unterteilt wird (Kozminski *et al.*, 1993; Pazour *et al.*, 1998; Pazour *et al.*, 1999). Für Kinetoplastiden konnte gezeigt werden, dass die beiden Hauptkomponenten des PFR, PFR-A und C, vorwiegend an der Spitze des wachsenden PFR eingebaut werden. Einige Proteine werden allerdings auch über die gesamte Länge eingefügt (Bastin *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise für das Vorhandensein von anterogradem sowie auch retrogradem IFT in Trypanosomen und Leishmanien (Bastin *et al.*, 1999; Maga *et al.*, 1999).

Wiese und Mitarbeiter postulierten, dass eine MAP-Kinase-Kinase (MKK) von *L. mexicana* in die Regulation der Flagellenlänge von promastigoten Zellen involviert ist. Das Gen wird promastigoten-spezifisch exprimiert, und ein *knock-out* führte zu einer reduzierten Flagellenlänge. Die Mutanten waren in der Lage, während einer Infektion von BALB/c Mäusen Läsionen hervorzurufen, allerdings mit großer zeitlicher Verzögerung (Wiese *et al.*, 2003). Bisher ist nicht klar, wie die Flagellenlänge in begeißelten Organismen reguliert wird. Es gibt aber Hinweise auf das Vorhandensein von klassischen Signaltransduktionswegen und es konnten über 80 phosphorylierte Proteine in den Flagellen von *Chlamydomonas* identifiziert werden (Piperno *et al.*, 1981; Tuxhorn *et al.*, 1998). Die Involvierung von Kinasen scheint somit sehr wahrscheinlich. Phosphorylierungsstudien mit dem hier untersuchten *LdDC2* könnten weitere Aufschlüsse über die Mechanismen dieser Regulation bringen.

Ein weiterer auftretender Phänotyp war das klar verlangsamte Teilungsverhalten der *knock-out* Zellen. Dies konnte bei den *Chlamydomonas* Zellen nicht beobachtet werden. Das Fehlen eines Strukturproteins des Axonems führt damit in Leishmanien zu weitaus größeren Veränderungen als in der Grünalge *Chlamydomonas*.

#### 4.3.4.2 Synthese amastigoten-spezifischer Proteine

Um zu überprüfen, wie sich die  $\Delta lddc2$  *knock-out*-Zellen im Verlauf einer *in vitro*-Stadiendifferenzierung verhalten, wurde das Synthesemuster der bereits erwähnten amastigoten-spezifischen Proteine, der A2-Familie und HSP100 untersucht. Im Gegensatz zu den *ldmprx* überexprimierenden Zellen zeigte die genetische Veränderung der Leishmanien einen Einfluss auf die Synthese dieser Proteine. Schon in den promastigoten Zellen lässt sich eine leichte Expression der A2-Genfamilie nachweisen, die sich an Tag 1 noch verstärkt. Die Expression von *hsp100* hingegen ist unbeeinflusst.

Über welche Mechanismen sich das Fehlen eines Strukturproteins der Geißel auf die Expression anderer Proteine auswirken kann, bleibt unklar. Die Rückbildung des Geißelapparates ist jedoch ein zentrales Ereignis in der Differenzierung von der promastigoten zur amastigoten Zelle. Es ist somit vorstellbar, dass genetisch manipulierte Zellen, denen schon im promastigoten Stadium die Geißel fehlt, ein verändertes Synthesemuster amastigoten-spezifischer Proteine aufweisen.

#### 4.3.4.3 *In vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen

Die Infektiosität der  $\Delta lddc2$  *knock-out*-Zellen war im Vergleich zu Wildtyp Zellen erhöht. Die Untersuchungen zeigten, dass zwar eine Interaktion zwischen Wildtyp Zellen und ihren potentiellen Wirtszellen stattfindet, eine große Anzahl der Zellen allerdings nicht in der Lage ist, die Makrophagen zu invadieren. Zu dem untersuchten Zeitpunkt (24 h) wurde ein Anheften der Leishmanien an ihre Zielzellen beobachtet, aber nur ein geringer Prozentsatz der Zellen zeigte intrazelluläre Parasiten. Für die  $\Delta lddc2$  *knock-out*-Zellen konnten weitaus höhere Infektionsraten bestimmt werden. Sie waren jeweils um das Doppelte erhöht und es wurden weniger nicht-intrazelluläre Parasiten beobachtet. Die rekonstituierten Zellen zeigten wieder ein Verhalten ähnlich dem Wildtyp.

Die Interaktion zwischen Leishmanien und ihren Wirtszellen ist sehr komplex. Die zwei Hauptoberflächenmoleküle, die in die Makrophagen-Bindung der Promastigoten involviert sind, sind GP63 und verschiedene Phosphoglykane (Alexander and Russell, 1992). Zu ihnen zählt das bereits beschriebene LPG. LPG-Moleküle bilden eine dichte Glykokalyx auf der Oberfläche der Promastigoten, die auch das Flagellum einschließt. Das *L. major* und *L. donovani* LPG sind die Parasitenproteine, die für eine spezifische Interaktion der Promastigoten mit den Makrophagen verantwortlich sind. Es handelt sich bei ihnen um Virulenzfaktoren, die essentiell für das Überleben der Parasiten sowohl im Insektenvektor, als auch im Säugetierwirt sind (Beverley and Turco, 1998; Handman and Goding, 1985). Parasiten denen LPG fehlt, sind avirulent (McNeely and Turco, 1990; Opat *et al.*, 1996).

Zhang und Matlashewski konnten zudem zeigen, dass es sich bei den A2-Proteinen um Virulenzfaktoren handelt. Parasiten, bei denen die Synthese der A2-Proteine mittels *antisense*-RNA ausgeschaltet wurde, zeigten eine stark verminderte Infektiosität, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Zhang and Matlashewski, 1997). Eine erhöhte Infektiosität der  $\Delta lddc2$ -Zellen begründet sich damit eventuell in der veränderten Expression der A2-Gene. Eine Veränderung der Expression anderer bekannter Virulenzfaktoren und Wirtszellen-Interaktionsmolekülen, wie LPG und GP63 wurde nicht untersucht. Es wäre denkbar, dass auch hier eine Abweichung des Expressionsmuster im Vergleich zu Wildtyp Zellen festzustellen ist, da es innerhalb der Differenzierung zur Amastigoten auch in der Zusammensetzung der Zelloberfläche zu enormen Veränderungen kommt.

Zudem müsste die Infektion im Zeitverlauf untersucht werden, um festzustellen, ob die veränderte Infektiosität stabil ist. Eventuell hat der veränderte Phänotyp der *knock-out*-Zellen nur einen Einfluss auf die Anfangsphase der Zellinvasion. Daran anschließen würden sich *in vivo*-Infektionsstudien. Leider sind die für die viszeralisierende *Leishmania*-Spezies *L. donovani* etablierten Tiermodelle, der Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) und die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) durch sehr lange Inkubationszeiten, von bis zu einem Jahr, gekennzeichnet. Außerdem lässt sich der Infektionsverlauf nicht äußerlich verfolgen. Dies macht sie in der Anwendung sehr schwierig und für solche, zeitlimitierten Arbeiten ungeeignet. Eine weitere Möglichkeit bietet die Infektion von BALB/c Mäusen. Mäuse weisen eine natürliche Resistenz gegenüber *L. donovani* Infektionen auf. Nach Infektion kommt es in der Anfangsphase zu einem Anstieg der Parasitenlast, nach 4-8 Wochen sind die Mäuse allerdings in der Lage, die Infektion zu kontrollieren (Melby *et al.*, 2001). Dieses Modell kann deshalb nur für die Beobachtung der frühen Infektionsphase herangezogen werden, wobei die Parasitenlast in der Leber untersucht wird. Eine solche Infektion wurde auch innerhalb der *in vivo*-Untersuchungen der Infektiosität von A2-defizienten Amastigoten durchgeführt (Zhang and Matlashewski, 1997).

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse einen großen Einfluss der Geißel auf die untersuchten Eigenschaften von *Leishmania*-Zellen. Das Fehlen eines einzigen Strukturproteins des Flagellums führt zu einer veränderten Morphologie sowie einem abweichenden Teilungsverhalten der Zellen. Außerdem ist ihre Fähigkeit, Wirtszellen zu invadieren verändert. Als Ausblick vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung anderer Strukturproteine des Flagellums. Da der Abbau der Geißel eine sehr wichtige Rolle im Rahmen der Stadiendifferenzierung spielt, wäre es interessant zu untersuchen, ob auch das Fehlen anderer Strukturproteine hier ähnliche Auswirkungen zeigt.

## 5. Zusammenfassung

Der Lebenszyklus des parasitischen Protozoons *Leishmania donovani* ist in zwei Phasen untergliedert. Die begeißelte promastigote Form des Parasiten lebt extrazellulär im Darmlumen der als Überträgerinsekten dienenden Sandmücken. Sie wird durch einen Biss dieser Mücken auf ihre Säugetierwirte übertragen, in denen die Leishmanien durch Makrophagen aufgenommen werden und in deren sauren Phagolysosomen überleben. Hier kommt es zu einer Differenzierung vom promastigoten zum amastigoten Stadium. Die Amastigoten proliferieren intrazellulär bis zur Lyse ihrer Wirtszellen. Die Parasiten werden freigesetzt und sind dann in der Lage, weitere Zellen zu invadieren. Durch einen erneuten Biss einer Sandmücke können die Leishmanien in den Insektenvektor zurückgelangen, wo sie wieder zum promastigoten Stadium differenzieren und der Infektionskreislauf geschlossen wird. Für *L. donovani* ist es möglich, die Stadiendifferenzierung *in vitro* zu vollziehen. Durch Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C und Ansäuerung des Kulturmediums kann eine Differenzierung der promastigoten zu amastigoten Parasiten ausgelöst werden. Im Verlauf dieser Differenzierung kommt es zu morphologischen, wie auch zu einer Vielzahl von biochemischen Veränderungen. Dies bedarf einer Regulation der beteiligten Proteine. Da Leishmanien zur Ordnung der Kinetoplastida gehören, findet die Genregulation größtenteils auf post-transkriptioneller Ebene statt. Um Unterschiede im Expressionsmuster zu bestimmen, ist es daher sinnvoll Protein- und nicht RNA-Mengen der verschiedenen Stadien miteinander zu vergleichen.

In der vorgestellten Arbeit wurde eine Proteomanalyse der beiden Lebensstadien des Parasiten *L. donovani* durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine von promastigoten, als auch *in vitro*-differenzierten amastigoten Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese getrennt und die Proteome miteinander verglichen. Differenzielle Protein-*spots* wurden mit Hilfe der MALDI TOF Massenspektrometrie analysiert. Unter Verwendung von unterschiedlichen pH-Gradienten in der ersten Dimension konnten ca. 700 Proteine auf den 2D-Gelen separiert werden. Für 40 wurde ein differenzielles Muster detektiert. In der anschließenden MALDI TOF Analyse konnten 33 der erhaltenen Peptidmassenspektren eindeutigen Datenbankeinträgen zugeordnet werden. Diese Analyse ergab 29 verschiedene Proteine, bei denen es sich um 21 mit bereits bekannter Funktion und acht hypothetische Proteine handelte. 19 zeigten eine promastigoten- und 10 eine amastigoten-spezifische Regulation.

Im Anschluss wurden zwei amastigoten-spezifische Proteine näher charakterisiert. Bei einem dieser Proteine handelte es sich um ein mitochondriales Peroxiredoxin. Peroxiredoxine sind antioxidantische Enzyme, deren Aufgabe in der Entgiftung reaktiver Sauerstoff (ROS)- und Stickstoffspezies (RNS) liegt. Ihnen werden aber auch andere Funktionen in grundlegenden Zellprozessen, wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose zugeschrieben. Für das untersuchte mitochondriale Peroxiredoxin von *L. donovani* (*LdmPrx*) konnte die in der Proteomanalyse ermittelte amastigoten-spezifische Regulation des Proteins im Western Blot bestätigt werden. Im Verlauf der *in vitro*-Stadiendifferenzierung wurde eine gesteigerte Proteinmenge

nachgewiesen. Zusätzlich kam es auch während der Kultur promastigoter Zellen von der früh- zur spät-logarithmischen Wachstumsphase sowie bei der Selektion rekombinanter Leishmanien mit einem Antibiotikum zu gesteigerter Proteinsynthese. Diese Untersuchungen zeigten somit, dass verschiedene Stressbedingungen wie Hitzeschock, Ansäuerung des Kulturmediums, dichter werdende Zellkultur und Antibiotika-Behandlung einen Einfluss auf die Synthese des Peroxiredoxins ausüben. Die durch die Aminosäuresequenz vorgegebene mitochondriale Lokalisierung von *LdmPrx* wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie Immunfluoreszenzstudien bestätigt. Es zeigte sich, dass das Protein in den promastigoten Zellen in der Nähe des Kinetoplasten akkumuliert. In den amastigoten Zellen konnte es zusätzlich über das gesamte Mitochondrium verteilt nachgewiesen werden. Desweiteren wurde gezeigt, dass das rekombinante *LdmPrx* in der Lage ist vor durch Hydroxylradikalen ausgelösten DNA-Strangbrüchen zu schützen sowie  $H_2O_2$  und t-BOOH zu entgiften. Somit könnte eine Funktion des *LdmPrx* der Schutz der mitochondrialen DNA vor oxidativen Schäden sein. Da es nicht möglich war, einen genetischen *knock-out* für *LdmPrx* zu erzeugen, sollte die Funktion des Proteins mittels Überexpression des Gens in *L. donovani* untersucht werden. Transfizierte Parasiten aus der früh-logarithmischen Wachstumsphase zeigten, im Vergleich zu Kontrollzellen, einen signifikanten Unterschied der zellulären Menge an *LdmPrx*. Die erhöhte Menge an Protein konnte allerdings weder promastigote, noch amastigote Zellen vor exogen produziertem oxidativem Stress schützen. Auch blieb die Synthese anderer stadien-spezifischer Proteine, wie die A2-Familie und HSP100, in den *ldmprx*-überexprimierenden Zellen unbeeinflusst. Eine erhöhte Menge an *LdmPrx* führte jedoch zum Schutz der Parasiten vor durch  $H_2O_2$  ausgelöster Fragmentierung der zellulären DNA, einem Merkmal der Apoptose. Diese Eigenschaft konnte bisher nur für das mitochondriale Peroxiredoxin von Säugetierzellen, nicht aber für die homologen Proteine aus Protozoen gezeigt werden.

Als weiteres amastigoten-spezifisches Protein wurde ein bei der Proteomanalyse als hypothetisches Protein identifiziertes Molekül untersucht. Bei der Analyse der Aminosäuresequenz wurde eine Homologie zu der 70 kDa Untereinheit des *outer dynein arm docking complex* von *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrDC2*) festgestellt. Hierbei handelt es sich um ein Strukturprotein des flagellaren Axonems. Erstaunlicherweise zeigten Western Blot-Analysen von Zellextrakten der verschiedenen Lebensstadien von *L. donovani*, dass es sich bei *LdDC2* um ein promastigoten-spezifisches Molekül handelt. Ebenso bestätigten Immunfluoreszenzstudien die sich durch die gefundene Homologie bereits andeutende Lokalisierung des Proteins innerhalb der Flagellen, einer bei Leishmanien promastigoten-spezifischen Zellstruktur. Wahrscheinlich handelte es sich bei dem in der anfänglichen Proteomanalyse identifizierten Protein um ein Abbauprodukt, das bei der Rückbildung des Flagellums im Verlauf der Differenzierung entstanden ist. Mittels homologer Rekombination wurde eine *lddc2 knock-out*-Mutante hergestellt. Diese Mutanten wiesen, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, deutlich verkürzte Flagellen und eine abgerundete Zellform auf. Außerdem waren ihre Zellteilungsraten herabgesetzt. Durch eine episomale Expression von *lddc2* in den Mutanten konnten die phänotypischen Merkmale rekonstituiert werden. Zusätzlich führte das Fehlen von *LdDC2* bei einer *in vitro*-Stadiendifferenzierung

der Leishmanien zu einem veränderten Expressionsmuster der amastigoten-spezifischen A2-Genfamilie. Schon in den Promastigoten war eine leichte Synthese zu beobachten, die im Verlauf der Differenzierung zunahm. Die Produktion von HSP100 war nicht beeinflusst. Bei einer *in vitro*-Infektion von peritonealen Exsudat Zellen konnte nach 24 h Inkubation eine, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, zweifach gesteigerte Infektiosität der  $\Delta lddc2$ -Mutanten beobachtet werden. Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der Abbau des Flagellums ein zentrales Ereignis innerhalb der Stadiendifferenzierung von *L. donovani* darstellt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abeliovich, H., Tzfati, Y., and Shlomai, J. (1993) A trypanosomal CCHC-type zinc finger protein which binds the conserved universal sequence of kinetoplast DNA minicircles: isolation and analysis of the complete cDNA from *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* 13: 7766-7773.
- Agabian, N. (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2004) Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol* 76: 95-103.
- Al-Olayan, E.M., Williams, G.T., and Hurd, H. (2002) Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 32: 1133-1143.
- Alexander, J., and Russell, D.G. (1992) The interaction of Leishmania species with macrophages. *Adv Parasitol* 31: 175-254.
- Almeida, R., Norrish, A., Levick, M., Vetrie, D., Freeman, T., Vilo, J., Ivens, A., Lange, U., Stober, C., McCann, S., and Blackwell, J.M. (2002) From genomes to vaccines: Leishmania as a model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 5-11.
- Alphey, M.S., Bond, C.S., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., and Hunter, W.N. (2000) The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol* 300: 903-916.
- Aly, R., Argaman, M., Halman, S., and Shapira, M. (1994) A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in Leishmania. *Nucleic Acids Res* 22: 2922-2929.
- Ameisen, J.C. (1996) The origin of programmed cell death. *Science* 272: 1278-1279.
- Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Multo, O., Loyens, M., Yissier, J.P., Potentier, A., and Ouaiissi, A. (1996) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Parasitol Today* 12: 49.
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P.X., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2002) On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9: 65-81.
- Atherton, J.C. (1998) *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 54: 105-120.
- Avila, A.R., Yamada-Ogatta, S.F., da Silva Monteiro, V., Krieger, M.A., Nakamura, C.V., de Souza, W., and Goldenberg, S. (2001) Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 117: 169-177.

- Barr, S.D., and Gedamu, L. (2001) Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *J Biol Chem* 276: 34279-34287.
- Bastin, P., Matthews, K.R., and Gull, K. (1996) The paraflagellar rod of kinetoplastida: solved and unsolved questions. *Parasitol Today* 12: 302-307.
- Bastin, P., Sherwin, T., and Gull, K. (1998) Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391: 548.
- Bastin, P., MacRae, T.H., Francis, S.B., Matthews, K.R., and Gull, K. (1999) Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 19: 8191-8200.
- Bates, E.J., Knuepfer, E., and Smith, D.F. (2000) Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 28: 1211-1220.
- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., and Coombs, G.H. (1992) Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105 ( Pt 2): 193-202.
- Beetham, J.K., Myung, K.S., McCoy, J.J., Wilson, M.E., and Donelson, J.E. (1997) Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 272: 17360-17366.
- Bellatin, J.A., Murray, A.S., Zhao, M., and McMaster, W.R. (2002) *Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Exp Parasitol* 100: 44-53.
- Beverley, S.M., and Turco, S.J. (1998) Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* 6: 35-40.
- Beverley, S.M., Akopyants, N.S., Goyard, S., Matlib, R.S., Gordon, J.L., Brownstein, B.H., Stormo, G.D., Bukanova, E.N., Hott, C.T., Li, F., MacMillan, S., Muo, J.N., Schwertman, L.A., Smeds, M.R., and Wang, Y. (2002) Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 47-53.
- Bloodgood, R.A. (2000) Protein targeting to flagella of trypanosomatid protozoa. *Cell Biol Int* 24: 857-862.
- Bordier, C. (1987) The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitol Today* 3: 151-153.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M., and Papadopoulou, B. (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277: 19511-19520.
- Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J. (1995) High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J* 310 ( Pt 1): 225-232.

- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., and Mosser, D.M. (1995) Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 155: 3102-3111.
- Brittingham, A., Miller, M.A., Donelson, J.E., and Wilson, M.E. (2001) Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 112: 51-59.
- Brokaw, C.J. (1994) Control of flagellar bending: a new agenda based on dynein diversity. *Cell Motil Cytoskeleton* 28: 199-204.
- Bryceson, A. (2001) Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190: 81-84.
- Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215.
- Burchmore, R.J., and Hart, D.T. (1995) Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 74: 77-86.
- Burchmore, R.J., and Landfear, S.M. (1998) Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem* 273: 29118-29126.
- Butterfield, L.H., Merino, A., Golub, S.H., and Shau, H. (1999) From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 1: 385-402.
- Button, L.L., Russell, D.G., Klein, H.L., Medina-Acosta, E., Karess, R.E., and McMaster, W.R. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. *Mol Biochem Parasitol* 32: 271-283.
- Casey, D.M., Inaba, K., Pazour, G.J., Takada, S., Wakabayashi, K., Wilkerson, C.G., Kamiya, R., and Witman, G.B. (2003) DC3, the 21-kDa subunit of the outer dynein arm-docking complex (ODA-DC), is a novel EF-hand protein important for assembly of both the outer arm and the ODA-DC. *Mol Biol Cell* 14: 3650-3663.
- Cash, P., Argo, E., Ford, L., Lawrie, L., and McKenzie, H. (1999) A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* 20: 2259-2268.
- Cash, P. (2000) Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* 21: 1187-1201.
- Castro, H., Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B., Lunsdorf, H., Wissing, J., and Tomas, A.M. (2002a) Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 33: 1563-1574.
- Castro, H., Sousa, C., Santos, M., Cordeiro-da-Silva, A., Flohe, L., and Tomas, A.M. (2002b) Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 33: 1552-1562.
- Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269: 27670-27678.

- Chang, K.P. (1980) Human cutaneous leishmaniasis in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* 209: 1240-1242.
- Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W., and Rhee, S.G. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* 279: 41975-41984.
- Charest, H., and Matlashewski, G. (1994) Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 14: 2975-2984.
- Charest, H., Zhang, W.W., and Matlashewski, G. (1996) The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 271: 17081-17090.
- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* 21: 1881-1888.
- Clement, M.V., Ponton, A., and Pervaiz, S. (1998) Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett* 440: 13-18.
- Clos, J., and Brandau, S. (1994) pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 5: 133-137.
- Cochrane, C.G. (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12: 137-147.
- Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J.D., and Golstein, P. (1994) Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 107 ( Pt 10): 2691-2704.
- Coughlin, B.C., Teixeira, S.M., Kirchhoff, L.V., and Donelson, J.E. (2000) Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J Biol Chem* 275: 12051-12060.
- Coulson, R.M., and Smith, D.F. (1990) Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 40: 63-75.
- Cruz, A., and Beverley, S.M. (1990) Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* 348: 171-173.
- Cruz, A.K., Titus, R., and Beverley, S.M. (1993) Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1599-1603.
- Cuvillier, A., Redon, F., Antoine, J.C., Chardin, P., DeVos, T., and Merlin, G. (2000) LdARL-3A, a *Leishmania* promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11): 2065-2074.
- D'Mello, R.A., Langford, P.R., and Kroll, J.S. (1997) Role of bacterial Mn-cofactored superoxide dismutase in oxidative stress responses, nasopharyngeal colonization,

- and sustained bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 65: 2700-2706.
- Das, M., Mukherjee, S.B., and Shaha, C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 114: 2461-2469.
- Davis, M.C., Ward, J.G., Herrick, G., and Allis, C.D. (1992) Programmed nuclear death: apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating *Tetrahymena*. *Dev Biol* 154: 419-432.
- Descoteaux, A., and Turco, S.J. (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1455: 341-352.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., Tamar, S., Olivier, M., and Papadopoulou, B. (1997) Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J* 16: 2590-2598.
- Duncan, R. (2004) DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* 20: 211-215.
- Duncan, R.C., Salotra, P., Goyal, N., Akopyants, N.S., Beverley, S.M., and Nakhasi, H.L. (2004) The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research. *Curr Mol Med* 4: 611-621.
- El Fakhry, Y., Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (2002) A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2: 1007-1017.
- Ellis, H.R., and Poole, L.B. (1997) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36: 13349-13356.
- Espinosa, J.M., Portal, D., Lobo, G.S., Pereira, C.A., Alonso, G.D., Gomez, E.B., Lan, G.H., Pomar, R.V., Flawia, M.M., and Torres, H.N. (2003) *Trypanosoma cruzi* poly-zinc finger protein: a novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein. *Mol Biochem Parasitol* 131: 35-44.
- Fairlamb, A.H., and Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46: 695-729.
- Ferguson, M.A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1295-1302.
- Fischer, C., Voss, A., and Engel, J. (2001) Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190: 85-87.
- Flinn, H.M., and Smith, D.F. (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 20: 755-762.

- Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H.J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 397: 324-335.
- Fok, A.K., Wang, H., Katayama, A., Aihara, M.S., and Allen, R.D. (1994) 22S axonemal dynein is preassembled and functional prior to being transported to and attached on the axonemes. *Cell Motil Cytoskeleton* 29: 215-224.
- Freedman, D.J., and Beverley, S.M. (1993) Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 62: 37-44.
- Frommel, T.O., Button, L.L., Fujikura, Y., and McMaster, W.R. (1990) The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 38: 25-32.
- Gantt, K.R., Goldman, T.L., McCormick, M.L., Miller, M.A., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Britigan, B.E., and Wilson, M.E. (2001) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167: 893-901.
- Ghedini, E., Zhang, W.W., Charest, H., Sundar, S., Kenney, R.T., and Matlashewski, G. (1997) Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 530-535.
- Ghosh, M., and Mukherjee, T. (2000) Stage-specific development of a novel adenosine transporter in *Leishmania donovani* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 108: 93-99.
- Gibson, W.C., Swinkels, B.W., and Borst, P. (1988) Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* 201: 315-325.
- Glaser, T.A., Wells, S.J., Spithill, T.W., Pettitt, J.M., Humphris, D.C., and Mukkada, A.J. (1990) *Leishmania major* and *L. donovani*: a method for rapid purification of amastigotes. *Exp Parasitol* 71: 343-345.
- Glaser, T.A., and Mukkada, A.J. (1992) Proline transport in *Leishmania donovani* amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential. *Mol Biochem Parasitol* 51: 1-8.
- Gradoni, L., and Gramiccia, M. (1994) *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitol Today* 10: 264-267.
- Graham, S.V. (1995) Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol Today* 11: 217-223.
- Guerrero, S.A., Flohe, L., Kalisz, H.M., Montemartini, M., Nogoceke, E., Hecht, H.J., Steinert, P., and Singh, M. (1999) Sequence, heterologous expression and functional characterization of tryparedoxin1 from *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem* 259: 789-794.
- Hanahan, D., and Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 100: 333-342.

- Handman, E., and Goding, J.W. (1985) The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *Embo J* 4: 329-336.
- Handman, E., Osborn, A.H., Symons, F., van Driel, R., and Cappai, R. (1995) The Leishmania promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 74: 189-200.
- Hart, D.T., and Coombs, G.H. (1982) Leishmania mexicana: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* 54: 397-409.
- Hausler, T., Stierhof, Y.D., Blattner, J., and Clayton, C. (1997) Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes Crithidia, Trypanosoma and Trichomonas. *Eur J Cell Biol* 73: 240-251.
- Henderson, G.B., Fairlamb, A.H., and Cerami, A. (1987) Trypanothione dependent peroxide metabolism in Crithidia fasciculata and Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* 24: 39-45.
- Hendriks, E.F., Abdul-Razak, A., and Matthews, K.R. (2003) tbCPSF30 depletion by RNA interference disrupts polycistronic RNA processing in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* 278: 26870-26878.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S.I., Hirschberg, K., and Jaffe, C.L. (1991) Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J* 10: 4061-4067.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383: 347-364.
- Huang, J., and Van der Ploeg, L.H. (1991) Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *Embo J* 10: 3877-3885.
- Hubel, A., Krobisch, S., Horauf, A., and Clos, J. (1997) Leishmania major Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17: 5987-5995.
- Ilg, T. (2000) Proteophosphoglycans of Leishmania. *Parasitol Today* 16: 489-497.
- Jacobson, M.D., and Raff, M.C. (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374: 814-816.
- Johnson, K.A., and Rosenbaum, J.L. (1992) Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. *J Cell Biol* 119: 1605-1611.
- Joshi, M., Dwyer, D.M., and Nakhasi, H.L. (1993) Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol* 58: 345-354.
- Jungblut, P.R., Schaible, U.E., Mollenkopf, H.J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., and Kaufmann, S.H. (1999a) Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 33: 1103-1117.

- Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K.P., Otto, A., Muller, E.C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G., and Stoffler, G. (1999b) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20: 2100-2110.
- Jungblut, P.R., Bumann, D., Haas, G., Zimny-Arndt, U., Holland, P., Lamer, S., Siejak, F., Aebischer, A., and Meyer, T.F. (2000) Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 36: 710-725.
- Kamiya, R. (1988) Mutations at twelve independent loci result in absence of outer dynein arms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 107: 2253-2258.
- Kapler, G.M., Coburn, C.M., and Beverley, S.M. (1990) Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 10: 1084-1094.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301.
- Kawazu, S., Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y., and Kano, S. (2000) Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 109: 165-169.
- Kelly, B.L., Nelson, T.N., and McMaster, W.R. (2001) Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of L. major leishmanolysin genes (GP63). *Mol Biochem Parasitol* 116: 101-104.
- King, S.M., and Witman, G.B. (1990) Localization of an intermediate chain of outer arm dynein by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 265: 19807-19811.
- King, S.M., Wilkerson, C.G., and Witman, G.B. (1991) The Mr 78,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein interacts with alpha-tubulin in situ. *J Biol Chem* 266: 8401-8407.
- King, S.M., Patel-King, R.S., Wilkerson, C.G., and Witman, G.B. (1995) The 78,000-M(r) intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein is a microtubule-binding protein. *J Cell Biol* 131: 399-409.
- Knecht, M., Regitz-Zagrosek, V., Pleissner, K.P., Jungblut, P., Steffen, C., Hildebrandt, A., and Fleck, E. (1994) Characterization of myocardial protein composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur Heart J* 15 Suppl D: 37-44.
- Koutoulis, A., Pazour, G.J., Wilkerson, C.G., Inaba, K., Sheng, H., Takada, S., and Witman, G.B. (1997) The *Chlamydomonas reinhardtii* ODA3 gene encodes a protein of the outer dynein arm docking complex. *J Cell Biol* 137: 1069-1080.
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., and Rosenbaum, J.L. (1993) A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5519-5523.
- Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2003) Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 967: 152-160.

- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hubel, A., and Clos, J. (1998) Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* 273: 6488-6494.
- Krobitsch, S., and Clos, J. (1999) A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite Leishmania donovani. *Cell Stress Chaperones* 4: 191-198.
- Krobitsch, S., and Clos, J. (2000) Cross-species homologous recombination in Leishmania donovani reveals the sites of integration. *Mol Biochem Parasitol* 107: 123-128.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamontagne, J., and Papadopoulou, B. (1999) Developmental regulation of spliced leader RNA gene in Leishmania donovani amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J Biol Chem* 274: 6602-6609.
- Langen, H., Berndt, P., Roder, D., Cairns, N., Lubec, G., and Fountoulakis, M. (1999) Two-dimensional map of human brain proteins. *Electrophoresis* 20: 907-916.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., and Beverley, S.M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev* 7: 996-1007.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., and Nakhasi, H.L. (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. *Cell Death Differ* 9: 53-64.
- Levick, M.P., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., and Blackwell, J.M. (1998) Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from Leishmania major. *Mol Biochem Parasitol* 96: 125-137.
- Li, S., Wilson, M.E., and Donelson, J.E. (1996) Leishmania chagasi: a gene encoding a protein kinase with a catalytic domain structurally related to MAP kinase kinase. *Exp Parasitol* 82: 87-96.
- Lim, Y.S., Cha, M.K., Kim, H.K., Uhm, T.B., Park, J.W., Kim, K., and Kim, I.H. (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 273-280.
- Lim, Y.S., Cha, M.K., Yun, C.H., Kim, H.K., Kim, K., and Kim, I.H. (1994) Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 199-206.
- Liu, K., Zinker, S., Arguello, C., and Salgado, L.M. (2000) Isolation and analysis of a new developmentally regulated gene from amastigotes of Leishmania mexicana mexicana. *Parasitol Res* 86: 140-150.
- Lu, W., Egerton, G.L., Bianco, A.E., and Williams, S.A. (1998) Thioredoxin peroxidase from Onchocerca volvulus: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 91: 221-235.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* 21: 375-382.

- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., and Frohlich, K.U. (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 41: 208-216.
- Maga, J.A., Sherwin, T., Francis, S., Gull, K., and LeBowitz, J.H. (1999) Genetic dissection of the *Leishmania paraflagellar rod*, a unique flagellar cytoskeleton structure. *J Cell Sci* 112 ( Pt 16): 2753-2763.
- McConville, M.J., Bacic, A., Mitchell, G.F., and Handman, E. (1987) Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8941-8945.
- McConville, M.J., and Bacic, A. (1989) A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. Isolation, characterization, and antigenicity. *J Biol Chem* 264: 757-766.
- McConville, M.J., Thomas-Oates, J.E., Ferguson, M.A., and Homans, S.W. (1990) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 265: 19611-19623.
- McConville, M.J., and Blackwell, J.M. (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266: 15170-15179.
- McGonigle, S., Curley, G.P., and Dalton, J.P. (1997) Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 115 ( Pt 1): 101-104.
- McNeely, T.B., and Turco, S.J. (1987) Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 653-657.
- McNeely, T.B., and Turco, S.J. (1990) Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 144: 2745-2750.
- Medina-Acosta, E., Karess, R.E., Schwartz, H., and Russell, D.G. (1989) The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol* 37: 263-273.
- Medina-Acosta, E., Karess, R.E., and Russell, D.G. (1993) Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol Biochem Parasitol* 57: 31-45.
- Melby, P.C., Tabares, A., Restrepo, B.I., Cardona, A.E., McGuff, H.S., and Teale, J.M. (2001) *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 99: 17-25.
- Moore, L.L., Santrich, C., and LeBowitz, J.H. (1996) Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana paraflagellar rod* protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol* 80: 125-135.
- Moreira, M.E., Del Portillo, H.A., Milder, R.V., Balanco, J.M., and Barcinski, M.A. (1996) Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 167: 305-313.

- Mosser, D.M., and Edelson, P.J. (1987) The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327: 329-331.
- Mottram, J.C., Frame, M.J., Brooks, D.R., Tetley, L., Hutchison, J.E., Souza, A.E., and Coombs, G.H. (1997) The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* 272: 14285-14293.
- Mukherjee, S.B., Das, M., Sudhandiran, G., and Shaha, C. (2002) Increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 277: 24717-24727.
- Mukkada, A.J., Meade, J.C., Glaser, T.A., and Bonventre, P.F. (1985) Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science* 229: 1099-1101.
- Murray, H.W. (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol* 129: 351-357.
- Murray, H.W., and Nathan, C.F. (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189: 741-746.
- Nathan, C., and Shiloh, M.U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8841-8848.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-490.
- Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kiess, M., Kalisz, H.M., and Flohe, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem* 378: 827-836.
- Noll, T.M., Desponds, C., Belli, S.I., Glaser, T.A., and Fasel, N.J. (1997) Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 84: 215-227.
- Nonn, L., Berggren, M., and Powis, G. (2003) Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* 1: 682-689.
- Nugent, P.G., Karsani, S.A., Wait, R., Tempero, J., and Smith, D.F. (2004) Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 136: 51-62.
- Opat, A., Ng, K., Currie, G., Handman, E., and Bacic, A. (1996) Characterization of lipophosphoglycan from a ricin-resistant mutant of *Leishmania major*. *Glycobiology* 6: 387-397.
- Orlandi, P.A., Jr., and Turco, S.J. (1987) Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 262: 10384-10391.

- Passwell, J.H., Shor, R., Smolen, J., and Jaffe, C.L. (1994) Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int J Exp Pathol* 75: 277-284.
- Pazour, G.J., Wilkerson, C.G., and Witman, G.B. (1998) A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *J Cell Biol* 141: 979-992.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L., and Witman, G.B. (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 144: 473-481.
- Pazour, G.J., and Witman, G.B. (2000) Forward and reverse genetic analysis of microtubule motors in *Chlamydomonas*. *Methods* 22: 285-298.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuetes, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., and Spyrou, G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275: 16296-16301.
- Penketh, P.G., and Klein, R.A. (1986) Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 20: 111-121.
- Penketh, P.G., Kennedy, W.P., Patton, C.L., and Sartorelli, A.C. (1987) Trypanosomatid hydrogen peroxide [corrected] metabolism. *FEBS Lett* 221: 427-431.
- Peshenko, I.V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med* 31: 292-303.
- Pimenta, P.F., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., and Sacks, D.L. (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815.
- Piperno, G., Huang, B., Ramanis, Z., and Luck, D.J. (1981) Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition and phosphorylation of stalk components. *J Cell Biol* 88: 73-79.
- Piperno, G., and Mead, K. (1997) Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4457-4462.
- Piqueras, B., Autran, B., Debre, P., and Gorochoy, G. (1996) Detection of apoptosis at the single-cell level by direct incorporation of fluorescein-dUTP in DNA strand breaks. *Biotechniques* 20: 634-640.
- Polson, A., von Wechmar, M.B., and van Regenmortel, M.H. (1980) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun* 9: 475-493.
- Poole, L.B., and Ellis, H.R. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* 35: 56-64.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 25: 745-750.

- Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H., and Joiner, K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* 145: 4311-4316.
- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., and Requena, J.M. (2000) Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 110: 79-91.
- Quivey, R.G., Jr., Kuhnert, W.L., and Hahn, K. (2000) Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol* 42: 239-274.
- Ridgley, E.L., Xiong, Z.H., and Ruben, L. (1999) Reactive oxygen species activate a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 340 ( Pt 1): 33-40.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S.J., and Zilberstein, D. (1998) Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 95: 9-20.
- Sacks, D.L. (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69: 100-103.
- Sacks, D.L., Saraiva, E.M., Rowton, E., Turco, S.J., and Pimenta, P.F. (1994) The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 108 Suppl: S55-62.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P., and Turco, S.J. (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181: 685-697.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J., and Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* 143: 161-178.
- Santrich, C., Moore, L., Sherwin, T., Bastin, P., Brokaw, C., Gull, K., and LeBowitz, J.H. (1997) A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. *Mol Biochem Parasitol* 90: 95-109.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001) Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* 183: 2041-2045.
- Sauri, H., Butterfield, L., Kim, A., and Shau, H. (1995) Antioxidant function of recombinant human natural killer enhancing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 964-969.
- Saxena, A., Worthey, E.A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K.D., and Myler, P.J. (2003) Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol* 129: 103-114.
- Schneider, P., Ferguson, M.A., McConville, M.J., Mehlert, A., Homans, S.W., and Bordier, C. (1990) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J Biol Chem* 265: 16955-16964.

- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., and Fiers, W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267: 5317-5323.
- Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (2001) Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 127: 1500-1507.
- Snapp, E.L., and Landfear, S.M. (1999) Characterization of a targeting motif for a flagellar membrane protein in *Leishmania enriettii*. *J Biol Chem* 274: 29543-29548.
- Steinert, P., Dittmar, K., Kalisz, H.M., Montemartini, M., Nogoceke, E., Rohde, M., Singh, M., and Flohe, L. (1999) Cytoplasmic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. *Free Radic Biol Med* 26: 844-849.
- Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H., and Meade, J.C. (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 781-807.
- Streit, J.A., Donelson, J.E., Agey, M.W., and Wilson, M.E. (1996) Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infect Immun* 64: 1810-1818.
- Takada, S., and Kamiya, R. (1994) Functional reconstitution of *Chlamydomonas* outer dynein arms from alpha-beta and gamma subunits: requirement of a third factor. *J Cell Biol* 126: 737-745.
- Takada, S., and Kamiya, R. (1997) Beat frequency difference between the two flagella of *Chlamydomonas* depends on the attachment site of outer dynein arms on the outer-doublet microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 36: 68-75.
- Takada, S., Wilkerson, C.G., Wakabayashi, K., Kamiya, R., and Witman, G.B. (2002) The outer dynein arm-docking complex: composition and characterization of a subunit (oda1) necessary for outer arm assembly. *Mol Biol Cell* 13: 1015-1029.
- Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, A.R., Parkin, D.W., Baltz, D., Biteau, N., Baltz, T., and Fairlamb, A.H. (2001) Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 116: 171-183.
- Thurman, R.G., Ley, H.G., and Scholz, R. (1972) Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem* 25: 420-430.
- Turco, S.J., and Descoteaux, A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 46: 65-94.
- Turrens, J.F., and Cazzulo, J.J. (1987) Inhibition of growth and respiration of *Leishmania mexicana* by the antitumor agent lonidamine. *Comp Biochem Physiol C* 88: 193-196.
- Tuxhorn, J., Daise, T., and Dentler, W.L. (1998) Regulation of flagellar length in *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton* 40: 133-146.
- Ullu, E., Matthews, K.R., and Tschudi, C. (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* 13: 720-725.

- Vardi, A., Berman-Frank, I., Rozenberg, T., Hadas, O., Kaplan, A., and Levine, A. (1999) Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO<sub>2</sub> limitation and oxidative stress. *Curr Biol* 9: 1061-1064.
- Vaux, D.L., and Strasser, A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2239-2244.
- Vijayarathy, S., Ernest, I., Itzhaki, J.E., Sherman, D., Mowatt, M.R., Michels, P.A., and Clayton, C.E. (1990) The genes encoding fructose biphosphate aldolase in *Trypanosoma brucei* are interspersed with unrelated genes. *Nucleic Acids Res* 18: 2967-2975.
- Voth, B.R., Kelly, B.L., Joshi, P.B., Ivens, A.C., and McMaster, W.R. (1998) Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Mol Biochem Parasitol* 93: 31-41.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.
- Webb, J.R., and McMaster, W.R. (1993) Molecular cloning and expression of a *Leishmania major* gene encoding a single-stranded DNA-binding protein containing nine "CCHC" zinc finger motifs. *J Biol Chem* 268: 13994-14002.
- Welburn, S.C., Lillico, S., and Murphy, N.B. (1999) Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense* --identification of differentially expressed genes during con A induced death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 229-234.
- White, T.C., Marr, K.A., and Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11: 382-402.
- Wiese, M. (1998) A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *Embo J* 17: 2619-2628.
- Wiese, M., Wang, Q., and Gorcke, I. (2003) Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* 33: 1577-1587.
- Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001) Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12: 3307-3316.
- Wilkerson, C.G., King, S.M., and Witman, G.B. (1994) Molecular analysis of the gamma heavy chain of *Chlamydomonas* flagellar outer-arm dynein. *J Cell Sci* 107 ( Pt 3): 497-506.
- Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., and Kelly, J.M. (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 275: 8220-8225.
- Wilkinson, S.R., Horn, D., Prathalingam, S.R., and Kelly, J.M. (2003) RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *J Biol Chem* 278: 31640-31646.
- Wilson, M.E., Andersen, K.A., and Britigan, B.E. (1994) Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun* 62: 5133-5141.

- Wood, Z.A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650-653.
- Wu, Y., El Fakhry, Y., Sereno, D., Tamar, S., and Papadopoulou, B. (2000) A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 110: 345-357.
- Zangger, H., Mottram, J.C., and Fasel, N. (2002) Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 9: 1126-1139.
- Zhang, W.W., Charest, H., Ghedin, E., and Matlashewski, G. (1996) Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 78: 79-90.
- Zhang, W.W., and Matlashewski, G. (1997) Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8807-8811.
- Zhang, W.W., and Matlashewski, G. (2001) Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol* 39: 935-948.
- Zilberstein, D., and Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48: 449-470.

## Danksagung

Bei Frau PD Dr. Iris Bruchhaus möchte ich mich ganz herzlich für die Vergabe des Themas, die großartige Betreuung bei der Durchführung der Versuche und ihre ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Egbert Tannich danke ich für die Unterstützung des Projektes und seine wertvollen Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Matthias Leippe danke ich für die Tätigkeit als Gutachter meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn PD Dr. Joachim Clos und seine gesamte Arbeitsgruppe für die fachlichen Anregungen und Hilfe im Umgang mit Leishmanien. Insbesondere danke ich Manfred Krömer für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Anne McDonald für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie.

Dr. Uwe Ritter und Thomas Bickert danke ich für die Hilfe bei den *in vitro*-Infektionsexperimenten.

Ein ganz großes Dankeschön geht zudem an meine Kollegen aus Labor 4, 5 und 6 für die tolle Zeit, das nette Arbeitsklima, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.