

**Genetische und biochemische Analyse des Aktivators der
Hsp90-ATPase-Aktivität (Aha1)
aus *Leishmania donovani* (Ross, 1903)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich der Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharina Bartsch

aus Achim

Hamburg, 2017

Genehmigt vom Fachbereich der Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

auf Antrag von PD Dr. Joachim Clos

Weiterer Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. Wolfgang Streit

Tag der Disputation: 24. Mai 2017

Hamburg, den 30. Mai 2017

Diese Arbeit wurde zwischen März 2014 und März 2017 in der Arbeitsgruppe und unter Anleitung von PD Dr. Joachim Clos am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Joachim Clos
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Sektion Molekularbiologie und Immunologie
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit
Biozentrum Klein Flottbek
Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie
Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Joachim Clos für die Möglichkeit meine Doktorarbeit unter seiner Leitung durchzuführen und die Begutachtung meiner Arbeit herzlichst bedanken. Joachim, vielen Dank für die Betreuung, deine Unterstützung und dein offenes Ohr für all meine Fragen. Ich habe viel gelernt und eine tolle Zeit in deiner AG gehabt!

Prof. Dr. Wolfgang Streit möchte ich vielmals für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Ich möchte mich auch herzlichst bei Tobias Spielmann und Monica Hagedorn für die Unterstützung als Co-Betreuer und das Feedback bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte AG Clos. Vielen Dank für diese wunderbare Zeit mit euch! Ganz besonders danke ich Antje, Eugenia, Julia, Henner und Paloma als stetige Begleiter in den drei Jahren. Ich danke euch so sehr für die stetige Hilfsbereitschaft, die Unterstützung jeglicher Art, das Korrekturlesen, diesen unfassbar guten Zusammenhalt in der Gruppe und eine tolle Arbeitsatmosphäre. Danke für so viele witzige Tage mit euch!

Großer Dank gilt auch meinen Mitbewohnern und Freunden für die ständige Unterstützung, ihr immer offenes Ohr und die sehr gute Ablenkung, wenn ich sie brauchte. Marc, wirklich großen Dank für das Korrekturlesen! Ich freue mich jetzt schon auf den Sommer mit euch allen!

Insbesondere möchte ich mich bei Ann-Katrin bedanken - nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch dafür, dass du in all den Jahren immer und egal bei welcher Entfernung für mich da warst und bist und mich immerzu unterstützt hast. Das weiß ich wirklich sehr zu schätzen!

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester für die stetige Unterstützung in all den Jahren danken und dass ich mich immer auf euch verlassen konnte. Danke, dass ihr immer Vertrauen in mich hattet und mir das auch zeigen konntet!

Ein so so großes Dankeschön geht an Ben für die stetige Gelassenheit, Unterstützung und die sehr gute Verpflegung. Danke für deine Geduld bei all meinen Launen und dafür, dass du immer, wirklich immer für mich da bist. Ich freue mich so sehr auf die Zeit, die uns bevorsteht!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1. Leishmaniose	5
1.2. Der Lebenszyklus von <i>Leishmania</i> spp.	7
1.3. In vitro Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i>	8
1.4. Die Hitzeschock-Antwort in Leishmanien	9
1.5. Das molekulare Chaperon Hsp90	11
1.6. Die Hsp90 Co-Chaperonen	12
1.7. Der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex	14
1.7.1. Der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex in Leishmanien	16
1.8. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Organismen und Stämme	21
2.1.1.1. Versuchstiere	21
2.1.1.2. Leishmanien	21
2.1.1.3. Bakterienstämme	21
2.1.2. Plasmide und Oligonukleotide	22
2.1.2.1. Benutzte Plasmide	22
2.1.2.2. Benutzte Oligonukleotide	24
2.1.3. Antikörper	25
2.1.4. Kits	26
2.1.5. Enzyme und Größenstandards	26
2.1.6. Nährmedien, Puffer, Lösungen und Zusätze	27
2.1.6.1. Zellkulturmedien	27
2.1.6.2. Puffer und Lösungen	27
2.1.6.3. Antibiotika	29
2.1.7. Geräte und sonstige Materialien	29
2.2. Methoden	31
2.2.1. Zellkultur von Leishmanien	31

2.2.1.1.	Kultivierung von Promastigoten	31
2.2.1.2.	Kryokonservierung von Leishmanien	32
2.2.1.3.	Transfektion von Leishmanien	32
2.2.1.4.	In vitro Differenzierung	33
2.2.1.5.	In vitro Proliferationsstudien	33
2.2.1.6.	In vitro Infektionsstudien	34
2.2.1.7.	Limiting dilution-Analyse	35
2.2.1.8.	Sekretionsassay	35
2.2.1.9.	Isolierung von Exosomen aus Leishmanien	36
2.2.1.10.	Fixierung von Leishmanien auf Objektträgern	37
2.2.1.11.	Färbung der Zellen nach Giemsa	37
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.2.3.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen	40
2.2.2.4.	Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
2.2.2.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.2.6.	Ligation von DNA-Fragmenten (In-Fusion HD Cloning Kit)	41
2.2.2.7.	Transformation von E. coli	41
2.2.2.8.	Transformation von Stellar kompetenten Zellen	41
2.2.2.9.	Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien	42
2.2.2.10.	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	42
2.2.2.11.	Isolierung hochreiner Plasmid-DNA	43
2.2.2.12.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.2.13.	DNA-Sequenzierung	44
2.2.2.14.	Isolierung von RNA aus Leishmanien	44
2.2.2.15.	Semi-quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	45
2.2.2.16.	Semi-quantitative real-time TaqMan-PCR (qPCR)	46
2.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.3.1.	Denaturierender Zellaufschluss	47
2.2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.2.3.3.	Coomassie-Brillant-Blau Färbung	49
2.2.3.4.	Kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung	49
2.2.3.5.	Western Blot	49
2.2.3.6.	Immunblot	50
2.2.3.7.	Nachweis von Proteinen aus Saccharose-gereinigten Vesikeln	51
2.2.3.8.	Aha1-Antigen-Aufreinigung aus Bakterien	51

2.2.3.9. Dialyse von Proteinlösungen	53
2.2.3.10. Immunisierung von Legehennen und IgY-Extraktion aus einem Dotter	53
2.2.3.11. Zellfraktionierung	54
2.2.3.12. Ko-Immunitätspräzipitation	55
2.2.4. Mikroskopische Methoden	56
2.2.4.1. Lichtmikroskopie	56
2.2.4.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	56
2.2.5. Datenverarbeitung	57
2.2.5.1. Bildbearbeitung	57
2.2.5.2. Statistische Auswertung	57
3. Ergebnisse	58
<hr/>	
3.1. Erzeugung eines Aha1-spezifischen Antikörpers	58
3.1.1. Herstellung des rekombinanten Aha1	58
3.1.2. Antikörpergewinnung und Western Blot-Analyse	59
3.2. Expression während der Stadiendifferenzierung	60
3.3. Interaktionsnachweis mittels Ko-Immunitätspräzipitation	62
3.4. Subzelluläre Lokalisation von Aha1	65
3.5. Aha1-Nullmutanten, Herstellung und Verifizierung	66
3.5.1. Herstellung der Aha1-Nullmutanten	66
3.5.2. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf DNA-Ebene	69
3.5.3. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf mRNA-Ebene	71
3.5.4. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf Protein-Ebene	72
3.6. Charakterisierung der Aha1-Mutanten	73
3.6.1. Morphologische Analyse der Aha1-Mutanten	74
3.6.2. Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten	77
3.6.3. Analyse der Wachstumskinetik unter RAD- und GA-Selektion	81
3.6.4. In vitro Infektiosität von Aha1-Nullmutanten	85
3.7. Aha1 und das Sekretom	87
4. Diskussion	90
<hr/>	
4.1. Aha1-Nachweis und Expression während der Stadiendifferenzierung	91
4.2. Aha1 interagiert mit Hsp90	92
4.3. Analyse von Aha1 durch Gen-Austauschmutanten	93
4.4. Schützender Effekt von Aha1 unter Ethanol-Stress	95
4.5. Unterschiedliche Auswirkungen der RAD- und GA-Behandlung auf die Aha1-abhängige Proliferation	96

4.6. Fehlen von Aha1 führt zu reduzierten Parasitenlasten in infizierten Makrophagen	99
4.7. Aha1 ist Teil der Exosomenbeladung	99
4.8. Ausblick	101
5. Literaturverzeichnis	103
<hr/>	
6. Abkürzungsverzeichnis	117
<hr/>	

Zusammenfassung

Die Leishmaniose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu den wichtigsten vernachlässigten, tropischen Krankheiten gezählt wird. Verursacht wird sie durch die humanpathogenen protozoischen Parasiten der Gattung *Leishmania* (*L.*). Die obligat intrazellulären Parasiten werden durch den Biss einer infizierten weiblichen Sandmücke auf den Menschen übertragen. Beim Wirtswechsel vom poikilothermen Insektenvektor auf den homoiothermen Säugetierwirt erfahren die Parasiten drastische Veränderungen der Umgebung. Die rasche Erhöhung der Umgebungstemperatur und der saure pH-Wert im Phagosom infizierter Makrophagen induzieren die Stadiendifferenzierung der Parasiten von extrazellulären Promastigoten in der Mücke zu pathogenen Amastigoten im Wirt.

Bislang ist unbekannt, welche molekularen Mechanismen der Stadienumwandlung zugrunde liegen. Bekannt ist, dass eine Hitzeschock-Antwort in Leishmanien ausgelöst wird, bei der vermehrt Hitzeschockproteine (Hsps) synthetisiert werden. Zudem führt eine pharmakologische Inhibition des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90) durch die spezifischen Inhibitoren Radicicol (RAD) oder Geldanamycin (GA) ebenfalls zu einer Stadienumwandlung von Leishmanien. Hsp90 spielt somit eine wichtige Rolle in der Stadiendifferenzierung und ist sowohl für das Promastigoten- als auch das Amastigotenstadium von Leishmanien essentiell.

Hsp90 ist ein hoch konserviertes und konstitutiv exprimiertes Chaperon, das in allen untersuchten Eukaryoten vorkommt. Als molekulares Chaperon weist es wichtige Funktionen in der Zelle auf und dient u. a. der Reifung und Aktivierung einer Vielzahl von Klientenproteinen. Hsp90 wird dabei von einer Reihe von Co-Faktoren unterstützt. Diese regulieren und stabilisieren den Hsp90 Chaperonen-Zyklus. Zu diesen gehören Chaperonen und Co-Chaperonen wie Hsp70, Stip1, Sgt, P23 und Aha1. Zusammen bilden diese Proteine den Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex.

In *Leishmania* spp. ist Hsp90 ein zytosolisch lokalisiertes Protein, das von mehreren, identischen Genkopien in der Zelle codiert wird. Im Chaperonen-Zyklus erfährt Hsp90 ATP-induzierte Konformationsänderungen, die durch Co-Chaperonen reguliert werden. Eines dieser Co-Chaperonen ist Aha1, der stärkste bekannte Aktivator der Hsp90-ATPase-Aktivität. Strukturelle Analysen zu Aha1 wurden bereits veröffentlicht, jedoch ist

wenig über die Bedeutung von Aha1 in *Leishmania* spp. bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher die Charakterisierung von Aha1 in *L. donovani*, dem Verursacher der tödlichen, viszeralen Form der Leishmaniose. Für Expressions-Analysen und Lokalisationsstudien wurden zunächst spezifische polyklonale Antiseren hergestellt. Die Analysen ergaben, dass Aha1 über den Lebenszyklus von *L. donovani* hinweg konstitutiv exprimiert wird. Ko-Präzipitationen mit Hsp90 bestätigen eine Interaktion von Aha1 und Hsp90. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit mittels homologer Rekombination Aha1 Gen-Austauschmutanten in *L. donovani* erzeugt. Dies stellt die erste Deletion von Aha1 in einem protozoischen Parasiten dar. Die lebensfähigen Nullmutanten wiesen keine auffälligen morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Auch in *in vitro* Wachstumsversuchen zeigten sich keine Auswirkungen der Deletion von Aha1. Somit ist Aha1 kein essentielles Protein im Promastigotenstadium von *L. donovani*. Dennoch wurde eine Sensitivität der Nullmutanten gegenüber Ethanol-Stress beobachtet, was Hinweise darauf gibt, dass Aha1 eine Rolle in der Proteinfaltung spielt. Interessant war, dass die Hsp90-Inhibitoren RAD und GA gegensätzliche Wirkungen auf die Aha1-abhängige Proliferation haben. Parasiten, die Aha1 überexprimieren sind hypersensitiv gegen RAD-Behandlung, während Aha1-Nullmutanten sensitiv gegen GA sind. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Bindungsmechanismen von RAD und GA hin. Aha1 spielt außerdem eine wichtige Rolle für das intrazelluläre Überleben des pathogenen Amastigotenstadiums von *L. donovani*. Zudem wird Aha1 über Exosomen in die Wirtszelle von *L. donovani* sekretiert, was Hinweise darauf gibt, dass Aha1 immun-modulatorische Effekte in Makrophagen hat.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dienen dem Verständnis eines weiteren am Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex beteiligten Co-Chaperons in *L. donovani*. Diese liefern die Grundlage für zukünftige Untersuchungen von Aha1, insbesondere im Hinblick auf die Interaktion mit Hsp90 sowie Hsp90-unabhängige Funktionen.

Abstract

Leishmaniasis is distributed worldwide and classified as an important neglected tropical disease by the World Health Organisation (WHO). It is caused by human-pathogenic protozoan parasites of the genus *Leishmania* (*L.*). The obligate intracellular parasites are transmitted via the bite of female infected sandflies to mammalian hosts. During the transmission from a poikilothermic insect vector to a homeothermic mammalian host, parasites encounter radical changes. The rapid increase in temperature and the acidic milieu in the phagosomes of infected macrophages induce the stage differentiation from extracellular promastigotes in the sandfly to pathogenic amastigotes in the host.

It is still unknown which molecular mechanisms exactly regulate this stage conversion. It is however known that a heat shock response is induced in *Leishmania* with an increased synthesis of several heat shock proteins (Hsps). Moreover, a pharmacological inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) by the specific inhibitors radicicol (RAD) or geldanamycin (GA) also induces a stage conversion. Therefore Hsp90 plays a key role during stage differentiation of *Leishmania* and is essential both for the promastigote and amastigote stages.

Hsp90 is a highly conserved and constitutively expressed chaperone in all studied eukaryotes. As a molecular chaperone Hsp90 has important functions in the cell and is involved in the maturation and activation of a multitude of client proteins, many of them key regulators. In doing so, Hsp90 is supported by several co-factors. These regulate and stabilise the Hsp90 chaperone cycle. The co-factors include chaperones and co-chaperones, e.g. Hsp70, Stip1, Sgt, P23 and Aha1. Together, they assemble the Hsp90 multi-chaperone complex.

In *Leishmania* spp. Hsp90 is a cytosolic protein encoded by a high gene copy number. During the chaperone cycle Hsp90 experiences ATP-induced conformational changes that are regulated by co-chaperones. One of these co-chaperones is Aha1, the strongest known activator of the Hsp90 ATPase activity. Structural analyses were published but little is known about Aha1 functions and role in *Leishmania* spp.. In this work a characterisation of Aha1 in *L. donovani*, the causative agent of the most severe form of leishmaniasis, was performed. Firstly, specific polyclonal antisera were produced for expression and localisation studies. Analyses showed Aha1 to be constitutively ex-

pressed during an *in vitro* stage conversion of *L. donovani*. Co-precipitation with Hsp90 and the cytosolic localisation of Aha1 confirmed an interaction of Aha1 and Hsp90. Secondly, Aha1 gene replacement mutants were generated in *L. donovani* using homologous recombination. This represents the first deletion of Aha1 in a protozoan parasite. The viable null mutants exhibited no morphological changes compared with wild type parasites, and *in vitro* growth experiments also showed no effects for the deletion of Aha1. Therefore, Aha1 is not essential in *L. donovani* promastigotes. However, a sensitivity of null mutants to ethanol stress could be observed, suggesting an Aha1 function in protein folding. Interestingly, the Hsp90 inhibitors RAD and GA have opposing effects on Aha1-dependent proliferation. Parasites over-expressing Aha1 are hypersensitive to RAD treatment while Aha1 null mutants are sensitive to GA. The results suggest different binding mechanisms of RAD and GA. Moreover Aha1 has an important role in the intracellular survival of the pathogenic amastigote stage of *L. donovani*. Aha1 is also secreted via exosomes into the host cells, suggesting an immune-modulatory effect of Aha1 in macrophages.

The results obtained in this study add to the understanding of another Hsp90 co-chaperone's function in *L. donovani*. This opens the way for further studies of Aha1, especially regarding the interaction with Hsp90 and its Hsp90-independent functions.

1. Einleitung

1.1. Leishmaniose

Leishmaniosen sind Infektionskrankheiten, die durch protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* (*L.*) hervorgerufen werden. W. B. Leishman und C. Donovan beschrieben 1903 unabhängig voneinander die Erreger (Fulton und Joyner, 1949). Die obligat intrazellulären Parasiten gehören der Ordnung Trypanosomatida und der Klasse der Kinetoplastea an. Diese sind durch das Vorhandensein eines Kinetoplasten gekennzeichnet. Der Kinetoplast ist ein DNA-enhaltendes Organell, das sich im einzigen Mitochondrium der Zelle befindet (Englund et al., 1982). Beim Biss einer infizierten, weiblichen Sandmücke (Phlebotominae) erfolgt die Übertragung der Leishmanien auf verschiedene Säugetiere und den Menschen.

Leishmaniosen werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu den wichtigsten vernachlässigten, tropischen Infektionskrankheiten (*neglected tropical diseases*) gezählt. Sie treten primär in von Armut betroffenen Regionen auf. Dabei sind Leishmaniosen mit Mangelernährung, schlechten Wohnbedingungen, Analphabetismus, Immunschwächen und fehlendem Zugang zu Ressourcen assoziiert. In 98 Ländern auf fünf Kontinenten besteht das Risiko einer *Leishmania*-Infektion, während sich schätzungsweise zwei Millionen Menschen jährlich infizieren (Alvar et al., 2012, <http://www.who.int/leishmaniasis>). Die Art und Verbreitung der Krankheit wird dabei durch die Spezies des Parasiten sowie das Vorhandensein geeigneter Insektenvektoren bestimmt (Sacks, 2001). Mehr als 30 Sandmücken-Spezies verbreiten die Parasiten in der alten Welt (Gattung *Phlebotomus*) und der neuen Welt (Gattung *Lutzomyia*) (Kamhawi, 2006). Leishmaniosen können zudem zoonotisch (Tiere als Reservoir, Tier-zu-Mensch) oder anthroponotisch (Mensch-zu-Mensch) übertragen werden. Mehr als 20 *Leishmania*-Spezies verursachen drei unterschiedliche Formen der Leishmaniose: kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniosen (Sacks, 2001).

Die kutane Leishmaniose (Orientbeule) ist die häufigste Form der Krankheit. Verursacht wird sie u. a. durch *L. major* und *L. tropica*. 95 % der Fälle treten in Südamerika, rund um das Mittelmeer, im Mittleren Osten und in Zentralasien auf. Dabei gibt es über 1,2 Mio Neuinfektionen jährlich (Alvar et al., 2012). Bei der kutanen Leishmaniose ist

die Haut betroffen. Nach dem Biss einer Sandmücke bilden sich Papeln an der Einstichstelle. Daraus kann sich ein Geschwür entwickeln, das nach Abklingen eine Narbe hinterlässt. Die ulzerierenden Läsionen treten hauptsächlich auf dem Gesicht, den Armen oder Beinen auf und heilen spontan ab. Die entstehenden Narben führen oft zu sozialer Stigmatisierung (Myler und Fasel, 2008, <http://www.who.int/leishmaniasis>).

Die mukokutane Leishmaniose (*Espundia*) wird durch Parasiten der Subgattung *Viannia* und dabei hauptsächlich durch *L. braziliensis* verursacht. Fast 90 % aller mukokutanen Leishmaniose-Fälle treten in Bolivien, Brasilien und Peru auf. Die Erkrankung ist eine Variante der kutanen Leishmaniose, die auch die Schleimhäute in Nase und Mund betrifft. Diese werden partiell oder komplett zerstört, was zu schweren Entstellungen führen kann (Myler und Fasel, 2008, <http://www.who.int/leishmaniasis>).

Die viszerale Leishmaniose (*Kala-Azar*) ist die schwerste Form der Leishmaniose mit 20.000-30.000 Todesfällen jährlich. Verursacht wird diese Form durch *L. donovani* (anthroponotisch) und *L. infantum* (zoonotisch). Dabei treten fast 90 % aller Fälle in nur sechs Staaten auf (Indien, Brasilien, Südsudan, Sudan, Äthiopien, Somalia). Die viszerale Leishmaniose ist dabei hoch endemisch auf dem indischen Subkontinent und in Ostafrika. Jährlich treten weltweit 200.000-400.000 neue Fälle auf. Infizierte Menschen zeigen zahlreiche Symptome wie unregelmäßige Fieberschübe, erheblichen Gewichtsverlust, Anämie und Schwellung von Leber, Milz und Lymphknoten. Die viszerale Leishmaniose verläuft i. d. R. tödlich (95 % aller Fälle), wenn sie nicht behandelt wird. Zudem kommt es bei gleichzeitiger HIV-Infektion oft zu besonders schweren Erkrankungsbildern (Murray et al., 2005; Myler und Fasel, 2008, <http://www.who.int/leishmaniasis>).

Die Diagnose einer Leishmaniose ist oftmals schwierig, da der Zugang zu medizinischer Versorgung in den betroffenen Regionen nur eingeschränkt möglich ist. Zudem gibt es bislang keine verlässliche Therapie für Patienten. Medikamente wie Natriumstibogluconat (Antimon^V), Amphotericin B, Miltefosin, Paromomycin und Pentamidin sind mit Nebenwirkungen und/ oder hohen Kosten verbunden. Gleichzeitig nimmt die Zahl der Antimon-resistenten *Leishmania*-Stämme zu und Impfstoffe fehlen bislang (Singh et al., 2012). Diese Faktoren machen die Entwicklung neuer und effizienterer Therapien notwendig.

1.2. Der Lebenszyklus von *Leishmania* spp.

Leishmania spp. weisen einen biphasischen Entwicklungszyklus auf. Im Insektenvektor, der weiblichen Sandmücke, finden sich extrazelluläre Promastigote. Diese weisen eine längliche Form und ein bewegliches Flagellum auf. Im Säugetierwirt liegen Leishmanien als pathogene, amastigote Form vor. Amastigote leben als intrazelluläre Parasiten in Immunzellen, vor allem in Makrophagen. Die amastigote Form weist einen ovalen Zellkörper und rudimentäres Flagellum auf und ist nicht beweglich (Kaye und Scott, 2011).

Wenn während der Blutmahlzeit einer Sandmücke hochinfektiöse, metazyklische Promastigote auf einen Säugetierwirt übertragen werden, beginnt der *Leishmania*-Lebenszyklus (Abb. 1). Die Promastigoten werden im Wirt von neutrophilen Granulozyten phagozytiert. Anschließend gelangen sie in Makrophagen (Peters et al., 2008), wobei die größte Herausforderung ist, sich in der parasitophoren Vakuole (Phagosom) aufzuhalten ohne das Wirtsimmunsystem zu aktivieren. Die promastigoten Parasiten wandeln sich im Phagosom des Makrophagen in Amastigote um. Diese vermehren sich klonal bis zur Zerstörung des Makrophagen. Freigesetzte Amastigote infizieren anschließend neue Makrophagen. Wenn die Leishmanien-Infektion lokalisiert bleibt, entsteht eine kutane Leishmaniose. Eine systemische Infektion des gesamten Retikuloendothelialen Systems hingegen wird viszerale Leishmaniose genannt (Sacks, 1989). Sobald der Säugetierwirt von einer weiteren weiblichen Sandmücke gebissen wird, können amastigote Parasiten und infizierte Makrophagen aufgenommen werden. Die Parasiten werden zunächst im Darm der Mücke von einer peritrophischen Membran umhüllt. Diese Hülle zerreißt und Amastigote differenzieren sich zu prozyklischen Promastigoten. Diese haben einen länglichen, begeißelten Zellkörper und sind beweglich. Mit Hilfe des Oberflächenmoleküls Lipophosphoglycan (Lpg) haften sich prozyklische Promastigote an die Mikrovilli des Darms an, um einer Ausscheidung über den Enddarm zu entkommen (Dostalova und Volf, 2012). Anschließend vermehren sich die nicht-infektiösen Promastigoten rasch und wandeln sich in metazyklische Parasiten um, die sich von der Darmwand lösen. Diese teilen sich nicht mehr und wandern zum Vorderdarm. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden aus der Speicheldrüse der Sandmücke 100-1.000 Parasiten auf den Säugetierwirt übertragen (Kaye und Scott, 2011; Sacks, 2001).

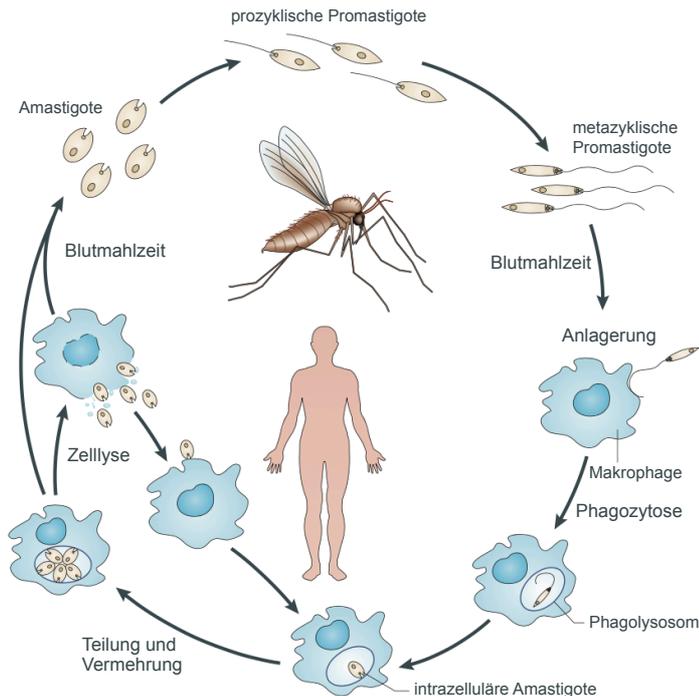


Abb. 1: *Leishmania* spp. Lebenszyklus

Während der Blutmahlzeit einer weiblichen Sandmücke (Vektor) werden metazyklische Promastigote auf einen Säugetierwirt übertragen. Die hochinfektiösen Parasiten werden anschließend von Makrophagen phagozytiert. Im Phagosom der Makrophagen differenzieren sich metazyklische Promastigote zu Amastigoten. Diese intrazellulären Parasiten vermehren sich durch klonale Teilung bis die Zelle lysiert. Freigesetzte Amastigote können dann neue Makrophagen infizieren. Bei einer nächsten Blutmahlzeit einer Sandmücke können freie Amastigote und infizierte Makrophagen aufgenommen werden. Im Darm der Mücke wandeln sich Amastigote in nicht-infektiöse prozyklische Promastigote um. Anschließend differenzieren diese sich zu hochinfektiösen metazyklischen Promastigoten. (modifiziert nach Kaye und Scott, 2011)

1.3. *In vitro* Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

Durch die Übertragung der Leishmanien von einem poikilothermen Insektenvektor (25 °C) auf einen homoiothermen Säugetierwirt (37 °C) erleben die Parasiten eine erhebliche Temperaturerhöhung. Dadurch wird die sog. Hitzeschock-Antwort in Leishmanien induziert. Zudem erfahren die Parasiten eine Änderung des pH-Wertes. Im Darm der Sandmücke herrscht ein pH-Wert von 7,4, während der pH-Wert im Phagosom des Makrophagen 5,5 beträgt. Diese beiden Faktoren zusammen führen in *L. donovani* bereits zur Stadienumwandlung (Saar et al., 1998; Zilberstein und Shapira, 1994).

Eine *in vitro* Stadiendifferenzierung von *L. donovani* kann ohne Säugetierwirt imitiert werden. Zunächst wird die Umgebungstemperatur der kultivierten Parasiten von 25 °C auf 37 °C erhöht. Dies simuliert den Übertritt in den Säugetierwirt. Durch die anschließende Ansäuerung des Kulturmediums wandeln sich *L. donovani* Promastigote in axenische Amastigote um. Diese Differenzierung ist reversibel (Barak et al., 2005; Krobitsch et al., 1998; Rosenzweig et al., 2008; Saar et al., 1998).

1.4. Die Hitzeschock-Antwort in Leishmanien

Die meisten Organismen reagieren auf einen Temperaturanstieg und chemische Stressoren mit der verstärkten Synthese von Hitzeschockproteinen (Hsps), wobei Stressfaktoren Ethanol, Schwermetallionen, oxidativer Stress und niedriger pH-Wert sein können. Die erhöhte Synthese der Hsps wird dabei auf Ebene der mRNA-Synthese, mRNA-Stabilität und Translation reguliert (Lindquist, 1986, 1992; Parsell und Lindquist, 1993).

Hitzeschockproteine sind ubiquitär und hoch konserviert. Die Größen der Proteine variieren zwischen 8 und 150 kD. Die Benennung der Hsps folgt grundsätzlich der molekularen Masse des Proteins. Die Einteilung erfolgt in verschiedene Familien: Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp10 und kleine Hitzeschockproteine (smHsps). Die Funktionen und Strukturen der Hsp-Familien untereinander sind nicht verwandt; außerdem weisen Proteine einer Familie evolutionäre Variationen auf (Feder und Hofmann, 1999; Gething, 1997; Whitley et al., 1999).

Die Aufgabe von Hsps unter Hitzestress ist die korrekte Faltung von funktionellen Proteinen zu ermöglichen. Zudem erkennen sie denaturierte Proteine und führen sie der Reparatur oder dem Abbau zu. Durch die Stabilisierung der Proteine werden Zellen vor einer schädlichen Aggregation von Proteinen geschützt und die zelluläre Homöostase aufrechterhalten. Unter physiologischen Bedingungen agieren Hsps als molekulare Chaperonen. Sie sind an der Reifung, Faltung, Translokation und dem Abbau von Proteinen beteiligt (Bukau und Horwich, 1998; Bukau et al., 2006; Rutherford und Zuker, 1994).

In *Leishmania* spp. erfahren die Parasiten bei dem Wirtswechsel vom poikilothermen Insektenvektor zum homoiothermen Säugetierwirt eine Temperatur- und pH-Wert Veränderung. Diese beiden Faktoren induzieren die Promastigoten-zu-Amastigoten Dif-

ferenzierung (Saar et al., 1998; Zilberstein und Shapira, 1994).

Die Hsp-Synthese wird in *L. donovani* hingegen nicht durch chemische Stressoren wie Cadmium, Kupfer, Arsen oder pentavalentes Antimon induziert (Clos et al., 1998). Allerdings wird die Synthese einiger Hsps durch die Erhöhung der Temperatur induziert. Dies ist jedoch nicht als Stress anzusehen, sondern als Signal zur zellulären Differenzierung, da das intrazelluläre Stadium normaler Teil des *Leishmania*-Lebenszyklus ist (Wiesgigl und Clos, 2001a, b). Die Hitze-induzierte Hsp-Synthese verleiht den Parasiten eine Thermotoleranz (Hübel et al., 1997).

Proteine, die im Zusammenhang mit einer Hitzeschock-Antwort stehen, wurden zuerst in *L. mexicana* identifiziert. Aufgrund ihrer molekularen Masse wurden diese sieben Proteine als Hsps bezeichnet (Hunter et al., 1984). Daraufhin wurden in drei weiteren Spezies (*L. donovani*, *L. enrietti* und *L. tropica*) Hsps identifiziert (Lawrence und Robert-Gero, 1985). Hsp70 und Hsp90 sind hoch abundant im Promastigotenstadium von *L. donovani* mit 2,1 % und 2,8 % des Gesamtproteingehalts der Zelle. Diese beiden Proteine sind Hitze-induzierbar, jedoch ist aufgrund der ohnehin hohen Konzentration kein wesentlicher Anstieg des Proteinniveaus zu erkennen (Brandau et al., 1995). Es sind mehrere, identische Genkopien von Hsp70 und Hsp90 in *Leishmania* spp. vorhanden, die tandemartig angeordnet sind (Folgueira und Requena, 2007; MacFarlane et al., 1990). Hsp100 hingegen ist in *L. donovani* ein Hitze-induzierbares Protein und wird Amastigoten-spezifisch exprimiert (Hübel et al., 1995; Hübel et al., 1997; Krobitch et al., 1998; Krobitch und Clos, 1999). Weiterhin wurden vier Hsp60-Genfamilien (Cpn60.1, Cpn60.2, Cpn60.3, Cpn60.4) in *L. donovani* identifiziert (Zirpel et al., unveröffentlichte Daten). Dabei ist Cpn60.1 in Promastigoten nicht nachweisbar und Cpn60.2 ein Hitze-induzierbares Protein, das vermehrt in axenischen Amastigoten auftritt (Schlüter et al., 2000). Auch Cpn10 ist ein Amastigoten-spezifisches Protein. Cpn10 und Cpn60.2 interagieren miteinander und lokalisieren innerhalb des Mitochondriums (Zamora-Veyl et al., 2005). Das konservierte Strukturmerkmal der kleinen Hitzeschockproteine ist die α -Crystallin-Domäne (ACD). Zu den ACD-enthaltenden Proteinen zählt u. a. Hsp20 (Fraga et al., 2013). Hsp23 gehört derselben Familie von kleinen Hitzeschockproteinen an und wird durch Hitze induziert. Es ist essentiell für die Thermotoleranz von *L. donovani* (Hombach et al., 2014). Die Hitzeschock-Antwort wird in *Leishmania* spp. ausschließlich posttranslational reguliert (Brandau et al., 1995).

1.5. Das molekulare Chaperon Hsp90

Das molekulare Chaperon Hsp90 ist ein hoch abundantes Protein, das 1-2 % des Gesamtproteingehalts der Zelle ausmacht. Die Hsp90-Familie ist hoch konserviert und Mitglieder kommen in allen eukaryotischen und bakteriellen Organismen vor, mit Ausnahme von Archaeen. Aufgrund des Aufbaus und Aktivität der Hsp90-ATPase werden Hsp90-Isoformen in die GHKL (*gyrase, Hsp90, histidine kinase, MutL*)-ATPase Superfamilie eingeordnet. Die Hsp90-Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Funktion und Struktur in der subzellulären Lokalisation, wobei HtpG (*high-temperature protein G*) ausschließlich in Bakterien vorkommt. Während Hsp90 unter allen Bedingungen essentiell für Eukaryoten ist, hat das bakterielle HtpG nur unter Stress Bedeutung. Neben den weit-verbreiteten zytosolischen Hsp90 gehört auch Grp94 (*glucose-regulated protein 94*) zur Hsp90-Familie. Grp94 lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird nicht durch Temperatur induziert. Trap-1 (*tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*) ist ebenfalls ein Hsp90-Homolog und mitochondrial lokalisiert. Zudem existieren extrazelluläre Hsp90-Formen (eHsp90), die in Zellbewegungsprozessen und der Wundheilung eine Rolle spielen.

Pflanzen weisen sieben unterschiedliche Hsp90 auf, die im Zytosol, Mitochondrium, ER und Chloroplasten lokalisieren. Die am besten charakterisierte Rolle von Hsp90 in Pflanzen liegt in der angeborenen Immunantwort. Trotz hoher Sequenzhomologie weisen die Mitglieder der Hsp90-Familie unterschiedliche Funktionen auf (Jackson, 2013; Prodromou, 2016; Zuehlke et al., 2015).

Das zytosolische Hsp90 besteht aus drei konservierten Domänen. Die N-terminale Domäne enthält die ATP-Bindungstasche; einige Hsp90-Inhibitoren binden hier ebenfalls. Durch eine *variable charged linker* Region ist die N-terminale Domäne mit der mittleren Domäne verbunden. Diese beherbergt die katalytische Schleife (*loop*), die essentiell für die Hsp90-ATPase-Aktivität ist. Zudem ist die mittlere Domäne wichtig für die Interaktion mit Klientenproteinen. Angrenzend an die mittlere Domäne befindet sich die C-terminale Domäne, die der Dimerisierung der Hsp90-Monomere dient und ein konserviertes Co-Chaperonen-Bindemotiv enthält (Jackson, 2013).

Hsp90 spielt in diversen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Es steht dabei im Zusammenhang mit Zellzykluskontrolle, hormoneller Regulation, Signaltransduktion und

dem Überleben von Zellen. Zu den Funktionen von Hsp90 gehört die Hitzeschock-Antwort und Antwort auf weitere Stressoren sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Dabei ist Hsp90 für die Reifung, Faltung und Modifikation wichtiger Signalproteine, insbesondere regulatorischer Kinasen, Steroidhormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Rutherford und Zuker, 1994). Eine weitere Funktion von Hsp90 ist der Auf- und Abbau von Proteinkomplexen. Eine Vielzahl von Hsp90-Klientenproteinen konnte bereits identifiziert werden (Jackson, 2013; Prodromou, 2016).

Posttranslationale Modifikationen regulieren und modifizieren die Hsp90- und Co-Chaperonen-Aktivität. Phosphorylierungen und Acetylierungen wirken sich auf die Funktion von Hsp90 durch Veränderung der ATPase-Aktivität sowie Bindung von Co-Chaperonen und Klientenproteinen aus. Weitere posttranslationale Modifikationen sind Methylierungen, S-Nitrosylierungen, Ubiquitylierungen und SUMOylierungen (Molapour und Neckers, 2012; Zuehlke et al., 2015).

Hsp90 wird in diversen Zusammenhängen als *drug target* untersucht. Zahlreiche Hsp90-Klientenproteine spielen eine wichtige Rolle in onkogenen Signalwegen, sodass Hsp90 als Ziel von Anti-Tumorwirkstoffen untersucht wird. Insbesondere die Hsp90-Inhibitoren Radicicol (RAD) und Geldanamycin (GA) wurden intensiv getestet (Whitesell und Lindquist, 2005). RAD und GA konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindungstasche von Hsp90. Dadurch wird die Hsp90-ATPase-Aktivität und Funktion als Chaperon gehemmt. Weiterhin wird die Hemmung von Hsp90 im Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten und viralen oder protozoischen Infektionen untersucht (Jackson, 2013).

1.6. Die Hsp90 Co-Chaperonen

Für die vielfältigen Funktionen von Hsp90 sind diverse Partnerproteine, sog. Co-Chaperonen, erforderlich. Diese binden an Hsp90 und unterstützen damit die Aktivierung und Regulierung von Klientenproteinen. Bislang konnten 19 Co-Chaperonen identifiziert werden, die mit dem zytosolischen Hsp90 interagieren, wobei kein Organismus jedes dieser Co-Chaperonen aufweist (Johnson und Brown, 2009).

Co-Chaperonen können strukturell unterschieden werden. Zum einen existieren TPR (*tetratricopeptide repeat*) Domäne-enthaltende Proteine. Diese binden mit der TPR-

Domäne an die konservierten Co-Chaperonen-Bindemotive, die an den C-Termini von Hsp90 und Hsp70 lokalisiert sind. Ein Protein, das mehrere TPR-Domänen enthält, ist Stip1 (*stress-inducible protein 1*), auch Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) genannt. Stip1 dient u. a. der Verbindung der Hsp90 und Hsp70 Chaperonen-Komplexe (Johnson und Brown, 2009; Scheufler et al., 2000). Ein weiteres TPR Domäne-enhaltendes Protein ist Pp5 (*protein phosphatase 5*), das u. a. die Hsp90-vermittelte Substratreifung optimiert. Auch Sgt1 (*small glutamine-rich protein 1*) ist ein TPR Domäne-enhaltendes Co-Chaperon. Weitere Co-Chaperonen weisen kein TPR-Bindemotiv auf. Dazu gehört Cdc37 (*cell division cycle 37*), das die Substratübertragung vermittelt.

Andere Co-Chaperonen sind für die ATP-induzierten Konformationsänderungen von Hsp90 wichtig. P23 reguliert die ATP-Hydrolyse, während Aha1 (Aktivator der Hsp90-ATPase-Aktivität) die ATP-Bindung reguliert (Johnson und Brown, 2009).

Aha1 ist ein relativ neu identifiziertes Hsp90 Co-Chaperon. Die Hsp90-ATPase-Aktivität wird durch Bindung von Aha1 stimuliert (Lotz et al., 2003; Panaretou et al., 2002). Dadurch erfolgt eine Konformationsänderung des Hsp90-Dimers, die eine Interaktion der katalytischen Schleife (*loop*) mit dem N-terminal gebundenen ATP ermöglicht, die für die ATP-Hydrolyse notwendig ist. Verantwortlich dafür ist das konservierte RKxK-Bindemotiv von Aha1 (Meyer et al., 2004). Es kann eine bis zu 30-fache Stimulierung der Hsp90-ATPase-Aktivität durch Aha1 erfolgen (Panaretou et al., 2002; Retzlaff et al., 2010).

Aha1 ist ein Co-Chaperon, das in vielen Organismen vorkommt. Es besteht aus einer N-terminalen Domäne, die durch eine gewundene Struktur mit einer C-terminalen Domäne verbunden ist. Diese Struktur variiert jedoch Organismen-spezifisch. In höheren Eukaryoten existiert zusätzlich ein Aha1-verwandtes Protein, Aha2 (Rehn und Buchner, 2015; Singh et al., 2014). In niederen Eukaryoten, wie *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, tritt ebenfalls das Aha1-Homolog Hch1 (*high copy suppressor of Hsp90 temperature-sensitive mutants*) auf (Nathan et al., 1999; Pearl und Prodromou, 2006). Protozoische Parasiten, wie *Plasmodium (P.) falciparum* oder *Toxoplasma gondii*, weisen hingegen zwei Varianten von Aha1 auf. Ein Homolog besteht dabei aus zwei N-terminalen Domänen und ein zweites aus der C-terminalen Domäne (Singh et al., 2014).

Bekannt ist außerdem, dass Aha1 eine Rolle bei der Faltung und Aktivierung von

Hsp90-Klientenproteinen, wie der viralen Tyrosinkinase (v-Src), dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) oder dem Regulator der zystischen Fibrose (CFTR) spielt (Harst et al., 2005; Panaretou et al., 2002; Wang et al., 2006).

1.7. Der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex

Die Aktivierung der Hsp90-Klientenproteine ist essentiell für das Überleben von Organismen. Reguliert wird die Aktivierung der Proteine durch den Hsp90-ATPase-Zyklus, Co-Chaperonen und posttranslationale Modifikationen von Hsp90. Im Chaperonen-Zyklus erfährt das Hsp90-Dimer ATP-induzierte Konformationsänderungen. Der dynamische Zyklus verläuft über eine offene Form des Hsp90-Dimers hin zu einer geschlossenen Form, die für die ATP-Hydrolyse notwendig ist. Der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex interagiert zusätzlich mit dem Hsp70-ATPase-Zyklus und weiteren Co-Chaperonen (Hessling et al., 2009; Li et al., 2011; Li et al., 2012; Prodromou et al., 2000). Abb. 2 stellt ein Modell des Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplexes schematisch dar.

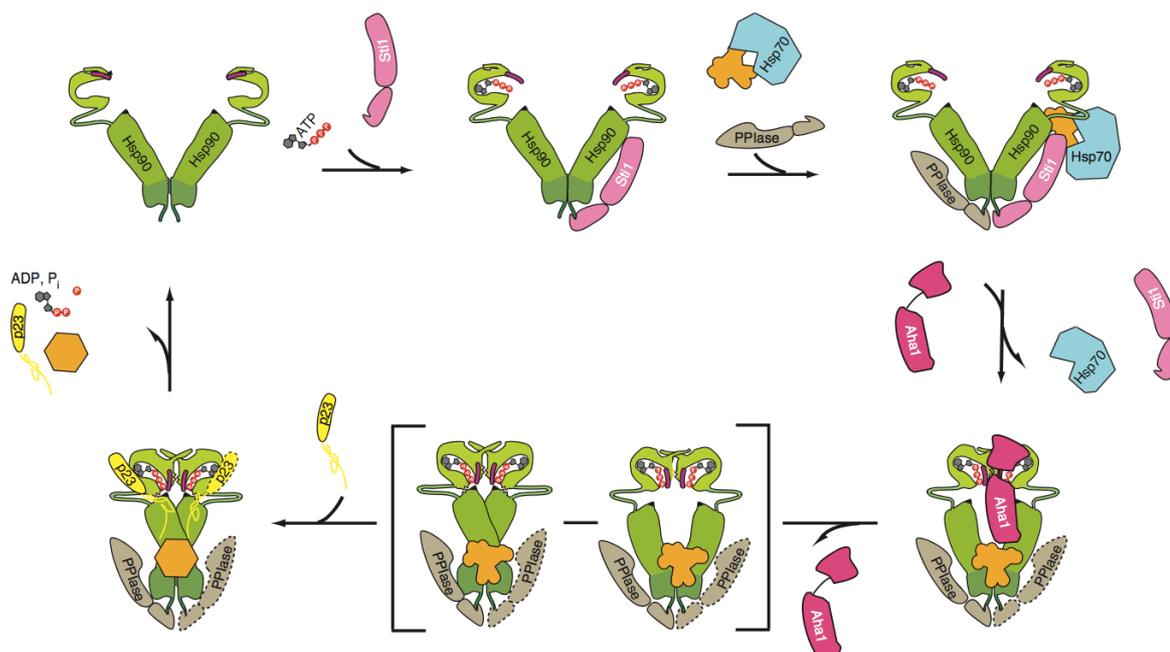


Abb. 2: Modell des Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplexes

Ein Stip1-Monomer und ATP binden an ein Hsp90-Dimer, das sich in der offenen Konformation befindet. Stip1 hemmt die Hsp90-ATPase-Aktivität und ermöglicht zugleich die Bindung von Hsp70, das das Klientenprotein trägt. PPIase Co-Chaperonen können an die zweite C-terminale TPR-Bindedomäne von Hsp90 binden, wodurch ein asymmetrischer Komplex entsteht. Anschließend bindet ein Aha1-Monomer an Hsp90 und interagiert mit der PPIase und ATP, sodass Stip1 und Hsp70 vom Hsp90-Komplex dissoziieren. Das Klientenprotein wird dabei auf Hsp90 übertragen. Aha1 stimuliert die Hsp90-ATPase-Aktivität und beschleunigt die Konformationsänderung des Hsp90-Dimers zur geschlossenen, asymmetrischen Form. Anschließend löst P23 Aha1 ab, wodurch die zweite geschlossene Konformation von Hsp90 stabilisiert wird. Nach ATP-Hydrolyse werden P23, die PPIase und das gereifte Hsp90-Klientenprotein freigesetzt. (modifiziert nach Li et al., 2013)

Der Hsp90-ATPase-Zyklus beginnt damit, dass neben ATP, Stip1 an ein Molekül des Hsp90-Dimers bindet, das sich in der offenen Konformation befindet. Damit dient Stip1 als Verbindung zwischen Hsp90- und Hsp70-ATPase-Zyklus. Ein Stip1-Monomer ist dabei ausreichend für die Hemmung der Hsp90-ATPase-Aktivität. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Hsp70 bereits an Stip1 gebunden hat bevor die Bindung an Hsp90 erfolgt. Zum anderen könnte das Hsp90-Klientenprotein an Hsp70 gebunden in den Komplex eintreten. An das zweite C-terminale TPR-Bindemotiv kann das Co-Chaperon PPIase (*peptidyl prolyl isomerase*) binden. Zu den PPIasen zählen Immunophiline wie Fkbp51, Fkbp52 oder Cyp40, die ebenfalls mehrere TPR-Domänen enthalten (Buchner, 1999). Dadurch entsteht ein asymmetrischer Hsp90-Komplex. Die synergistische Interaktion von Aha1, PPIase und ATP führt dazu, dass Stip1 und Hsp70 vom Komplex freigesetzt werden. Die N-terminale Aha1-Domäne bindet dabei an die mittlere

Domäne von Hsp90, während die C-terminale Aha1-Domäne an die N-terminale Hsp90-Domäne bindet (Meyer et al., 2004; Retzlaff et al., 2010). Ein Aha1-Monomer ist ausreichend für die Bindung an ein Hsp90-Dimer. Zudem erfolgt diese Bindung asymmetrisch, sodass ein Hsp90-Monomer frei für die Bindung von Klientenproteinen ist (Retzlaff et al., 2010). Das Hsp90-Klientenprotein wird somit von Hsp70 auf Hsp90 übertragen und bindet an die mittlere Hsp90-Domäne. Aha1 ermöglicht die N-terminale Dimerisierung von Hsp90 und beschleunigt die Konformationsänderung des Dimers zur geschlossenen Form. Durch die Bindung von P23 wird Aha1 freigesetzt und die zweite Konformation des geschlossenen Zustands stabilisiert. P23 hemmt zudem die Hsp90-ATPase-Aktivität. Somit haben Aha1 und P23 gegensätzliche Funktionen im Hsp90 Chaperonen-Zyklus (Rehn und Buchner, 2015). Nach der ATP-Hydrolyse dissoziieren auch P23, PPlase und das gereifte Hsp90-Klientenprotein vom Multi-Chaperonen-Komplex. Anschließend nimmt Hsp90 wieder den geöffneten Zustand ein, sodass es sich an der Reifung weiterer Klientenproteine beteiligen kann (Li et al., 2011; Li et al., 2013).

1.7.1. Der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex in Leishmanien

Leishmania spp. weisen einen konservierten Genlocus mit bis zu 17 Genkopien des Hsp90, auch Hsp83 genannt, auf. Diese Genkopien sind tandemartig angeordnet (Angel et al., 1996; Fogueira und Requena, 2007; Hübel und Clos, 1996; Shapira und Pinelli, 1989; Silva et al., 2013). Hsp90 ist in *Leishmania* spp. zytoplasmatisch lokalisiert (Brandau et al., 1995; Clos und Krobitsch, 1999; Shapira und Pinelli, 1989).

Hsp90-Sequenzvergleiche von *L. braziliensis* mit *L. donovani* und *L. major* ergaben eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 93 %. Vergleiche von *L. braziliensis* mit *T. cruzi* und *T. brucei* Hsp90-Orthologen ergaben Übereinstimmungen von 85 %. Ein Vergleich von *L. braziliensis* mit dem humanem Hsp90 und Hsp90 aus der Hefe ergab ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (63 %). Das *L. braziliensis* Hsp90 weist zudem wichtige Aminosäuresequenzen auf, die mit der Bindung von ATP oder der Co-Chaperonen Aha1 und P23 korrelieren. Strukturanalysen des rekombinanten *L. braziliensis* Hsp90 ergaben, dass es in der Lage ist, Homodimere auszubilden. Während die N-terminale Domäne ebenfalls die ATP-Bindungstasche enthält, ist die C-terminale Domäne für die Dimerisierung der Hsp90-Monomere ver-

antwortlich. *L. braziliensis* Hsp90 hat außerdem eine geringe eigene ATPase-Aktivität, wie es auch für Hsp90-Orthologe beschrieben wurde. Zudem weist das Protein Chaperonen-Aktivität auf und verhindert die Bildung schädlicher Proteinaggregate. Somit ist das *L. braziliensis* Hsp90 sowohl strukturell als auch funktionell ähnlich zu humanen und *S. cerevisiae* Hsp90-Orthologen (Silva et al., 2013).

Leishmania spp. besitzen weitere Hsp90-Homologe. So wurde im Serum von Hunden, die mit *L. infantum* infiziert waren, das *L. infantum* Grp94 identifiziert. Damit sind Leishmanien die ersten protozoischen Organismen, in denen Grp94 identifiziert werden konnte. Die ER-lokalisierende Hsp90-Isoform weist in *L. infantum* hohes immunogenes Potential auf und liegt in nur einer Kopie pro haploidem Chromosomensatz vor. Auch strukturell ist es ähnlich aufgebaut wie das Säuger-Grp94 oder pflanzliches Grp94 (Larreta et al., 2000). *L. donovani* weist ebenfalls ein Grp94-Homolog auf. Dieses ist mit der Synthese des Oberflächenproteins Lpg assoziiert. Im Gegensatz zu anderen Organismen ist es wichtig für die Virulenz von Leishmanien und nicht für deren Überleben (Descoteaux et al., 2002). Ein Grp94-Homolog konnte auch in *L. major* identifiziert werden. Zudem wurde in *L. major* das mitochondriale Trap-1 identifiziert dessen Funktion in den Parasiten bislang unbekannt ist (Folgueira und Requena, 2007).

Die Behandlung von *L. donovani* mit dem Hsp90-Inhibitor GA führt zu einem Wachstumsarrest der Parasiten in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Durch die Überexpression von Hsp90 kann der Phänotyp komplementiert werden. Zudem wird die Synthese von Hitzeschockproteinen in Inhibitor-behandelten Parasiten induziert. Die Inaktivierung von Hsp90 in *L. donovani* durch die Inhibitoren RAD und GA induziert zudem die Stadiendifferenzierung der Parasiten und induziert die Promastigoten-zu-Amastigoten Umwandlung. Auch die Expression des Amastigoten-spezifischen Proteins A2 wird nach RAD- oder GA-Behandlung hochreguliert (Wiesgigl und Clos, 2001a). Auch andere Proteine, die im Zuge der Amastigoten-Differenzierung verstärkt synthetisiert werden, werden durch Hsp90-Hemmung induziert (Bente et al., 2003). Somit stabilisiert Hsp90 in Leishmanien das Promastigotenstadium.

Die Herstellung von lebensfähigen Hsp90-Nullmutanten blieb bislang erfolglos, woraus sich schließen lässt, dass Hsp90 ein essentielles Protein in Leishmanien ist. Dennoch konnte eine Methode entwickelt werden, womit die Funktion von *L. donovani* Hsp90 besser charakterisiert werden kann. Durch einen Aminosäureaustausch in der hoch

konservierten ATP-Bindungstasche von Hsp90 konnten RAD-resistente (Hsp90rr) Leishmanien erzeugt werden. Somit besteht die Möglichkeit einen pharmakologischen *knockout* mit einer genetischen Komplementation (CKC) zu kombinieren, d. h. episodale modifizierte Hsp90-Transgene unter RAD-Behandlung zu analysieren. Mit Hilfe dieses Systems konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Hsp90 sowohl im Insektenstadium als auch im Säugetierstadium essentiell ist (Hombach et al., 2013).

Hsp90-Klientenproteine konnten in *Leishmania* spp. bislang nicht identifiziert werden. Hsp90 spielt jedoch möglicherweise eine Rolle in der Wirkstoffresistenz in *L. donovani*. So wurde gezeigt, dass die Hsp90-Expression in SbV-resistenten Feldisolaten erhöht war und die Isolate Kreuzresistenzen gegen Miltefosin aufwiesen (Vergnes et al., 2007). Die Selektion von Wirkstoffresistenz-Genen durch *functional cloning* (Clos und Choudhury, 2006; Nühs et al., 2014; Tejera Nevado et al., 2016) wies jedoch nicht auf Hsp90-Gene als dominante Resistenzmarker hin. Genauso wenig konnte durch gezielte Überexpression von Hsp90 eine messbare Antimon-Resistenz erzeugt werden (A. Hombach-Barrigah, unveröffentlichte Daten).

Weiterhin werden sowohl Hsp90 als auch die Co-Chaperonen Stip1 und Cyp40 in *L. donovani* Amastigoten-spezifisch phosphoryliert (Morales et al., 2010).

Eine Studie zu Hsp90 Co-Chaperonen fand neun von zehn untersuchten Co-Chaperonen in *L. major*. Die identifizierten Co-Chaperonen sind Stip1, Sgt, Cyp40, Fkbp52, Pp5, Cns1, Pih1, P23 und Aha1 (Johnson und Brown, 2009).

Stip1 wurde als Bindeglied zwischen Hsp90- und Hsp70-ATPase-Zyklus identifiziert, was ebenfalls für Leishmanien bestätigt werden konnte. Es konnte sowohl in *L. major* (Webb et al., 1997) als auch in *L. donovani* (Hombach et al., 2013) eine Interaktion von Stip1 mit Hsp90 und Hsp70 nachgewiesen werden. Zuerst wurde das Co-Chaperon jedoch in *L. donovani* Amastigoten identifiziert, die in Sera von Leishmaniose-erkrankten Hunden gefunden wurden (Joshi et al., 1993). Stip1 ist in Leishmanien ein essentielles, strukturell und funktionell konserviertes Protein, das in Folge der Hitzeschock-Antwort hochreguliert wird (Batista et al., 2016; Morales et al., 2010; Webb et al., 1997).

Ein atypisches Sgt-Ortholog konnte in *L. donovani* identifiziert werden. Dem Co-Chaperon fehlt die C-terminale Glutamin-reiche Region, die typisch für Proteine der Sgt-Familie ist. Dennoch wird Sgt in Leishmanien konstitutiv exprimiert und ist essentiell

für das Wachstum und Überleben der Parasiten. Zudem interagiert das zytoplasmatische Protein mit Hsp90 und Hsp70 (Ommen et al., 2010).

Ein weiteres TPR Domäne-enthaltendes Co-Chaperon, Cyp40, wurde in *L. major* identifiziert (Yau et al., 2010). Das Protein wird konstitutiv in *L. donovani* exprimiert, aber stadienspezifisch phosphoryliert (Morales et al., 2010; Yau et al., 2014). Cyp40 ist nicht essentiell in Promastigoten, jedoch zeigen Cyp40-Nullmutanten einen konditionalen Phänotyp und weisen Defekte in der Morphologie und Bewegung von Promastigoten in der Stationärphase auf. Zudem ist Cyp40 essentiell für die Infektion von Makrophagen (Yau et al., 2014). Um den Defekt von Cyp40-Nullmutanten in Makrophagen zu kompensieren werden Hitzeschockproteine hochreguliert und vermehrt in Exosomen sekretiert (Yau et al., 2016). Exosomen sind 30-100 nm große Vesikel in denen Virulenzfaktoren in die Wirtszelle von *L. donovani* geschleust werden (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010a).

Interessanterweise wurden zwei P23-Homologe in *Leishmania* spp. identifiziert (Folgueira und Requena, 2007). Die Proteine ähneln sich in ihrer Struktur und weisen Hsp90-Bindungseigenschaften auf (Batista et al., 2015), haben jedoch unterschiedliche Funktionen. Eine P23-Isoform, Hsp23, ist essentiell für das Überleben von *L. donovani* über 30 °C und in Makrophagen (Hombach et al., 2014). Die zweite P23-Isoform, P23, wird konstitutiv exprimiert und ist nicht essentiell in *L. donovani*, schützt Hsp90 jedoch vor den Inhibitoren RAD und GA. Somit konnte P23 als Hsp90 Co-Chaperon in *L. donovani* bestätigt werden (Hombach et al., 2015).

Das Co-Chaperon Aha1 konnte in *L. braziliensis* identifiziert werden. Hier besteht es aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die durch einen flexiblen *linker* verbunden sind (Seraphim et al., 2013). Wie für andere Organismen bereits beschrieben (Meyer et al., 2004; Retzlaff et al., 2010), bindet auch die N-terminale Aha1-Domäne die mittlere Hsp90-Domäne. Das rekombinante *L. braziliensis* Aha1 verhält sich wie ein gestrecktes Monomer in Lösung (Seraphim et al., 2013). Im Gegensatz zu anderen Organismen (Retzlaff et al., 2010) binden zwei rekombinante *L. braziliensis* Aha1-Monomere ein Hsp90-Dimer. Dennoch ist auch in *L. braziliensis* die N-terminale Aha1-Domäne für die Aktivierung der Hsp90-ATPase-Aktivität verantwortlich. Diese wird ca. 10-fach (Seraphim et al., 2013) und somit geringer als in anderen Organismen (Panaretou et al., 2002; Retzlaff et al., 2010) stimuliert. Aha1 wird in *L. braziliensis* kon-

stitutiv während einer Stadiendifferenzierung exprimiert (Seraphim et al., 2013). Weitere funktionelle Analysen in *Leishmania* spp. fehlen bislang.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Ein wichtiges Anliegen der aktuellen Forschung ist es, die molekularen Mechanismen des essentiellen Chaperons Hsp90 in *Leishmania* spp. aufzudecken. Hsp90 ist ein hoch abundantes Protein in Leishmanien und übernimmt wichtige Funktionen als molekulares Chaperon. Die Ausführung der Vielzahl von Funktionen erfolgt im Zusammenspiel mit diversen Co-Chaperonen. Dabei reguliert der Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex die Reifung und Aktivierung wichtiger Klientenproteine. Die beteiligten Co-Chaperonen sind Organismus- und Klienten-spezifisch. In Leishmanien sind diese essentiell für das Überleben der Parasiten, für die Zellzykluskontrolle, die Stresstoleranz oder Infektiosität.

Im Hsp90 Chaperonen-Zyklus erfährt das Hsp90-Dimer ATP-induzierte Konformationsänderungen. Als stärkster bekannter Aktivator der Hsp90-ATPase-Aktivität agiert Aha1. Strukturell ist das *L. braziliensis* Aha1 ähnlich zu Aha1-Orthologen in anderen Organismen, dennoch ist bislang wenig über die Aha1-Funktion in Leishmanien bekannt. Daher ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die genetische und biochemische Analyse von Aha1 in *L. donovani*. Es sollen subzelluläre Lokalisationsstudien und Co-Immunpräzipitationen durchgeführt werden, die Auskunft über die Funktion von Aha1 als Co-Chaperon und die Wechselwirkung mit Hsp90 geben. Zudem sollen Aha1 Gen-Austauschmutanten erzeugt werden, die phänotypisch charakterisiert werden. Dabei soll die Morphologie der Aha1-Mutanten untersucht werden. Außerdem sollen Wachstumsversuche, auch unter verschiedenen Stress-Einwirkungen, durchgeführt werden. Um die Interaktion zwischen Aha1 und Hsp90 näher zu ergründen, sollen Wachstumsversuche mit Aha1-Mutanten ebenfalls unter den Hsp90-Inhibitoren RAD und GA erfolgen. Zudem soll die *in vitro* Infektiosität von Aha1-Nullmutanten getestet werden. Weiterhin soll die Frage beantwortet werden, ob Aha1, wie andere Hsp90 Komplex-Proteine, als Teil der Exosomenbeladung in die Wirtszelle sekretiert wird.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Organismen und Stämme

2.1.1.1. Versuchstiere

Die Herstellung von *Leishmania*-Antigen spezifischen Antikörpern erfolgte in Legehennen (Geflügelzucht Zahrt, 29559 Wrestedt), die mit Antigen immunisiert wurden.

2.1.1.2. Leishmanien

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Parasitenstamm *L. donovani* gearbeitet. Der *L. donovani* Stamm 1SR (MHOM/SD/??/Lo8) wurde von D. Zilberstein (Technion, Israel Institute of Science, Haifa, Israel) zur Verfügung gestellt. *L. donovani* P23^{-/-} wurde von A. Hombach-Barrigah (BNITM, Hamburg) hergestellt.

2.1.1.3. Bakterienstämme

Für die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden wurde der Stamm *E. coli* DH5 α *subcloning efficiency* (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet. Bei der Verwendung des *In-Fusion HD Cloning Kits* (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde mit dem Stamm *E. coli* HST08 (Stellar kompetente Zellen, Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) gearbeitet. Für die Proteinexpression wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) [pAPlacI^Q] (Sarstedt, Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet.

2.1.2. Plasmide und Oligonukleotide

2.1.2.1. Benutzte Plasmide

Alle verwendeten Plasmide tragen das β -Laktamase-Gen, welches eine Ampicillin-Resistenz verleiht.

pUC19

Der Klonierungsvektor pUC19 ist ein *high copy number* Plasmid und das am häufigsten benutzte Plasmid zur Klonierung und Expression von Genen in *E. coli*. Das Plasmid hat eine Größe von 2686 bp.

pCL2N

Der Expressionsvektor pCL2N (pCL2neo) codiert für die Neomycinphosphotransferase (neo), die das Antibiotikum G418 inaktiviert. Das Plasmid hat eine Größe von 7647 bp.

pTL.v6

Der Expressionsvektor pTL.v6 codiert für die Neomycinphosphotransferase (neo), die das Antibiotikum G418 inaktiviert. Zusätzlich trägt das Plasmid die *T. cruzi* GA3PDH-NCs für eine stabile Transfektion in Leishmanien. Das Plasmid hat eine Größe von 8126 bp.

pCL2S

Der Expressionsvektor pCL2S (pCL2sat) codiert für die Streptothricin-Acetyltransferase (sat), die das Antibiotikum Nourseothricin inaktiviert. Das Plasmid hat eine Größe von 7367 bp.

pCLN3HA

Das Plasmid pCLN3HA (pCLneo3HA) besteht aus dem Transfektionsvektor pCLN und einem drei HA (Hämagglutinin)-Fragment. Das Glycoprotein HA ist ursprünglich eines der integralen Membranproteine des humanen Influenzavirus und wird an das N-terminale Ende von Genen gekoppelt und als Fusionsprotein exprimiert. Das Plasmid codiert für die Neomycinphosphotransferase (neo), die das Antibiotikum G418 inaktiviert und hat eine Größe von 7727 bp.

pJC57

Der bakterielle Expressionsvektor pJC57 trägt zehn Histidine (His₁₀), die an das N-terminale Ende von Genen gekoppelt und als Fusionsprotein exprimiert werden. Der Vektor stammt von dem Expressionsvektor pJC45 (Clos und Brandau, 1994) und unterscheidet sich von diesem in der Peptidase-Sequenz zwischen den Histiden und der *multiple cloning site*. Das Plasmid hat eine Größe von 2408 bp.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Plasmide

Angegeben sind die Bezeichnung, die Eigenschaft sowie die Herkunft des Plasmids.

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft
pUC19	Klonierungsvektor	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
pTLv.6	<i>Leishmania</i> -Expressionsvektor	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pCL2N	<i>Leishmania</i> -Expressionsvektor	D. Zander-Dinse, BNITM, Hamburg
pCL2S	<i>Leishmania</i> -Expressionsvektor	D. Zander-Dinse, BNITM, Hamburg
pCLN3HA	<i>Leishmania</i> -Expressionsvektor	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pJC57	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	J. Clos, BNITM, Hamburg
pUC19-Aha1-5'bleo3'NC	Nullmutanten-Klonierungsplasmid	diese Arbeit
pUC19-Aha1-5'puro3'NC	Nullmutanten-Klonierungsplasmid	diese Arbeit
pCL2N-Aha1	<i>LdAha1</i> -Expressionsplasmid	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pCL2S-Aha1	<i>LdAha1</i> -Expressionsplasmid	diese Arbeit
pCLN3HA::Aha1	<i>Ld3HA::Aha1</i> -Expressionsplasmid	diese Arbeit
pCLN3HA::Hsp90	<i>Ld3HA::Hsp90</i> -Expressionsplasmid	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pJC57-Aha1	<i>E. coli</i> -Expressionsplasmid mit (His ₁₀)::Aha1	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pTL.v6-Hsp90rr	<i>LdHsp90rr</i> -Expressionsplasmid	A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg
pCL2N-P23	<i>LdP23</i> -Expressionsplasmid	diese Arbeit

2.1.2.2. Benutzte Oligonukleotide

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Angegeben sind die Bezeichnungen, die 5'-3' Sequenzen sowie die Verwendungszwecke der Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide werden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendung
Aha1-5'NC-F	TGAGAGTGCACCATAATTTAAAT TCAAGCACGGTCCGATGAC	Amplifikation von Aha1 für Klonierung pUC19-Aha1-5'-3'NC
Aha1-5'NC-B	GGATCCTATGGTACCGAGGTGC CTCTGTTATTTCTGG	Amplifikation von Aha1 für Klonierung pUC19-Aha1-5'-3'NC
Aha1-3'NC-F	GGTACCATAGGATCCGGAGGAA GAACGAAGTCAAGAG	Amplifikation von Aha1 für Klonierung pUC19-Aha1-5'-3'NC
Aha1-3'NC-B	CGACTCTAGAGGATCATTTAAAT ACGAGTTTGACCAG	Amplifikation von Aha1 für Klonierung pUC19-Aha1-5'-3'NC
Aha1-5'-NdeI	GGAGCATATGGCCAAGGTCGGT GAG	Amplifikation von Aha1 für pCLN3HA::Aha1
Aha1-3'-BamHI	GAGGGGATCCTCACATGTACTC GAG	Amplifikation von Aha1 für pCLN3HA::Aha1
Aha1-ORF-fwd	ATGGCCAAGGTCGGTGAG	Nachweis von Aha1-DNA
Aha1-ORF-rev	TCACATGTACTCGAGCGAG	Nachweis von Aha1-DNA
Aha1-5'-flank	TTATTATTAAGACCGTGGTGAG	Nachweis von Aha1-NC-DNA
Aha1-3'-flank	CACACGCACTCGTTACGTGC	Nachweis von Aha1-NC-DNA
BleoR-5'rev	GGAACGGCACTGGTCAAC	Nachweis von Bleomycin-DNA
BleoR-3'fwd	GCAACTGCGTGCCTTCG	Nachweis von Bleomycin-DNA
PuroAC-5'rev	GTGGGCTTGTACTCGGTC	Nachweis von Puromycin-DNA
PuroAC-3'fwd	GGTGCATGACCCGCAAGC	Nachweis von Puromycin-DNA
Hsp23-fwd	ATGTCCACCAGCGGCCCA	Nachweis von Hsp23-DNA
Hsp23-rev	CTCGAGGAGGACACGTGA	Nachweis von Hsp23-DNA
Primer für qRT-PCR		
RT-actin-F1	TGGCACCATACCTTCTACAACG AG	Nachweis von Maus Aktin-cDNA
RT-actin-B2	CGTCATCTTCTCACGGTTCTGC	Nachweis von Maus Aktin-cDNA
Aha1-fwd	CACATGTCAGGATAACGACGC	Nachweis von Aha1-cDNA
Aha1-rev	GATACTCGGTGAAGAGGGCAT	Nachweis von Aha1-cDNA
Aha1-NC-fwd	GGGCAAACCTTCTTCGAGGCTA	Unterscheidung zwischen endogener und episomaler Aha1-cDNA
Aha1-NC-rev	GACTTCGTTCTTCCTCCTCCG	Unterscheidung zwischen endogener und episomaler Aha1-cDNA

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendung
Primer für qPCR		
Mouse_Acb-F	CTGGAGAAGAGCTATGAG	Nachweis von Maus Aktin-DNA
Mouse_Acb-R2	CTTACCCAAGAAGGAAGGCTG	Nachweis von Maus Aktin-DNA
Mouse_Acb-Probe	Cy5- CATCACTATTGGCAACGAGCGG -BHQ3	Nachweis von Maus Aktin-DNA
Leish_AC-F2	CAGAACCGTGAGAAGATG	Nachweis von <i>Leishmania</i> Aktin-DNA
Leish_AC-R	ACAGCCTGAATACCAATG	Nachweis von <i>Leishmania</i> Aktin-DNA
Leish_AC-Probe	FAM- CCTGGCTGGCCGGGACCTGAC- BHQ1	Nachweis von <i>Leishmania</i> Aktin-DNA
Sequenzierprimer		
M13-24R	CGGATAACAATTTACACAGG	pUC19-Sequenzierung
pIR-P-fwd2	GGCTCTGCGTTTCACTTGC	pCL2S-Sequenzierung
pIR-p-fwd	CTGCGTTGTTGCCTGTGATG	pCL2N-Sequenzierung
pIR-p-rev	GCGAACTGGTCGTAGAAATC	pCL2S-Sequenzierung

2.1.3. Antikörper

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Antikörper

Angegeben sind die Bezeichnungen der Antikörper, deren Verdünnungen sowie die Herkunft.

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
anti-Hsp90 IgY (pk, aus Huhn)	1:1.000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Cpn 60.2 IgY (pk, aus Huhn)	1:1.000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Aha1 IgY (pk, aus Huhn)	1:500	diese Arbeit
anti-P23 IgY (pk, aus Huhn)	1:500	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-HslU1 IgG (pk, aus Maus)	1:1.000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti- α -Tubulin IgG (mk, aus Maus)	1:4.000	Sigma-Aldrich, München
anti-HA Biotin IgG	1:5.000	Roche, Mannheim
anti-Huhn IgY AP-konjugiert	1:5.000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG AP-konjugiert	1:1.000	Dianova, Hamburg
Streptavidin-AP-konjugiert	1:5.000	Dianova, Hamburg
Biotin-SP-konjugiert anti-Huhn IgY	1:1.000	Dianova, Hamburg

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
Biotin-SP-konjugiert anti-Maus IgG	1:10.000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG Alexa Fluor 594	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAPI	1:50	Sigma-Aldrich, München

2.1.4. Kits

Bezeichnung

DyNAmo cDNA Synthese Kit
 Gentra Puregene Tissue Kit
 In-Fusion HD Cloning Kit
 InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit
 ISOLATE II Genomic DNA Kit
 NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Qiagen, Hilden
 Takara Bio Europe
 Stratec, Birkenfeld
 Biotline, Luckenwalde
 Macherey-Nagel, Düren

2.1.5. Enzyme und Größenstandards

Bezeichnung

DyNAmo Color Flash SYBR Green qPCR Kit
 GeneRuler 1kb DNA Ladder
 iProof High-Fidelity PCR Kit
 Kapa Probe Fast qPCR Master Mix Kit
 PageRuler Unstained Protein Ladder
 ProSieve QuadColor Protein Marker
 Restriktionsenzyme
 RNase A
 T4 DNA Ligase
 Taq DNA Polymerase Kit
 Trypsin

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Bio-Rad, München
 VWR, Darmstadt
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Biozym, Hessisch Oldendorf
 New England Biolabs, Beverly, USA
 Sigma-Aldrich, München
 New England Biolabs, Beverly, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Promega, München

2.1.6. Nährmedien, Puffer, Lösungen und Zusätze

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität ‚pro analysis‘ eingesetzt und von den Firmen Amersham (Freiburg), Roche (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serra (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in ddH₂O angesetzt.

2.1.6.1. Zellkulturmedien

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Nährmedien

Angegeben sind die Bezeichnungen sowie die Zusammensetzungen der Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
M199, komplementiert, pH 7,4	1 × M199, 20 % inaktiviertes FCS (30 min bei 56 °C), 2 mM L-Glutamin, 100 U Penicillin, 0,1 mg mL ⁻¹ Streptomycin, 20 µg/ml, 40 mM HEPES (pH 7,4), 15,3 µM Hämin, 100 mM Adenin, 5 µM 6-Biopterin
Einfriermedium	30 % komplementiertes M199, 50 % inaktiviertes FCS (30 min bei 56 °C), 20 % DMSO
DMEM, komplementiert	DMEM, 10 % inaktiviertes FCS (30 min bei 56 °C), 5 % Pferdeserum, 1 × GlutaMAX, 1 × Pen/Strep, 10-30 % Überstand von LADMAC Zellen
Cycle Grow LB-Flüssigmedium	2% LB
Cycle Grow LB-Agarplatten	2% LB, 1,5% LB-Agar

2.1.6.2. Puffer und Lösungen

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Angegeben sind die Bezeichnungen sowie die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂
APS	10 % in ddH ₂ O
B5 Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 M KCl, 5 mM Imidazol
B100 Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 M KCl, 100 mM Imidazol
B1000 Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 M KCl, 1 M Imidazol
Blockierungslösung (Immunblot)	5 % w/v Magermilchpulver in TBS, 0,1 % Tween 20

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)	2 % w/v BSA in PBS, 0,1 % Triton X-100
6 × DNA-Ladepuffer	90 % Formamid, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylenyanol
Ethidiumbromid	50 mg mL ⁻¹ in ddH ₂ O
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES (pH 7,5), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 6 mM Glucose
Kalium-Phosphatpuffer	71,2 mM K ₂ HPO ₄ , 28,3 mM KH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl
2 × Laemmli Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin
Lysepuffer (Ko-Immunpräzipitation)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 2 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin
MES-Puffer	0,25 M Saccharose, 20 mM MOPS, 3 mM EDTA
Mowiol Eindeckmedium	25 % Glycerin, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 10 % Mowiol 4-88
1 × PBS	0,137 M NaCl, 10,14 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,68 mM KCl, 1,76 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
Permeabilisierungslösung	50 mM NH ₄ Cl, PBS (pH 7,4), 0,1 % Triton X-100
Plasmid-Lösung 1	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8,0)
Plasmid-Lösung 2	0,2 N Natriumhydroxid, 1 % SDS (pH 14)
Plasmid-Lösung 3	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure (pH 5,5)
Puffer 1	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol
Puffer 2	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 8 M Harnstoff
Saccharoselösung	20 mM Tris-HCl, 1 M Saccharose (pH 7,4)
5 % Sammelgel	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1, 40 %), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
1 × SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS
1 × TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)
10 × TBE-Puffer	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8,2)
1 × TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,04 % SDS, 20 % Methanol
10 % Trenngel	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1, 40 %), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
Trypsin-EDTA Lösung	0,5 mg mL ⁻¹ Trypsin, 0,2 mg mL ⁻¹ EDTA in PBS
Waschlösung	PBS (pH 7,4), 0,1 % Triton X-100
Waschpuffer (Immunblot)	TBS, 0,02 % Tween 20

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer (Ko-Immunpräzipitation)	1 × TBS, 0,05 % Tween 20, 1mM PMSF, 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin

2.1.6.3. Antibiotika

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Angegeben sind die Bezeichnungen der Antibiotika, die Konzentrationen der Stocklösungen sowie deren Endkonzentrationen.

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg mL ⁻¹ in ddH ₂ O	100 µg mL ⁻¹
Bleocin	2,5 mg mL ⁻¹	5 µg mL ⁻¹
Geneticindisulfat/G418	50 mg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹
Geldanamycin	1 mM in DMSO	150-200 nM
Kanamycin	10 mg mL ⁻¹ in ddH ₂ O	10 µg mL ⁻¹
L-Glutamin Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	200 mM L- Glutamin, 10.000 U Penicillin, 10 mg mL ⁻¹ Streptomycin	2 mM L- Glutamin, 100 U Penicillin, 0,1 mg mL ⁻¹ Streptomycin
Nourseothricin/clonNAT	150 mg mL ⁻¹ in ddH ₂ O	150 µg mL ⁻¹
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	10.000 U Penicillin, 10 mg mL ⁻¹ Streptomycin	100 U Penicillin, 0,1 mg mL ⁻¹ Streptomycin
Puromycin	2,5 mg mL ⁻¹ in M199	25 µg mL ⁻¹
Radicalol	1 mM in Ethanol	20-80 nM

2.1.7. Geräte und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
3 MM Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Amicon Ultra-15 (MWCO 100.000 Da)	Millipore, Schwalbach
anti-HA magnetic beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biomate 3 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biometra Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Biometra UV Band Eluator	Biometra, Göttingen
Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
CASY Cellcounter & Analyzer	Roche, Mannheim

Bezeichnung	Hersteller
Electrophoresis Power Supply-EPS301	Amersham, Buckinghamshire, UK
Elektroporationsküvetten (0,4 cm)	Bio-Rad, München
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Evos FL Auto Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Evos XL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Faltenfilter (∅ 185 mm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Gene Pulser	Bio-Rad, München
His Bind Resin	Novagen, Madison, USA
Inkubator WTC Binder	Binder, Tuttlingen
Innova™ 4400 incubator shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
J2-21 Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
J2-HS Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Microfuge Tube	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)	Assistent, Sondheim
New Brunswick Galaxy 170S	Eppendorf, Hamburg
Optima TL Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Optima XE-90	Beckman Coulter, Fullerton, USA
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen
pH-Meter Micropocessor pH 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
PVDF Membran Fluorotrans (0,2 µM)	Pall, Craislheim
Quick-seal tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Rotor-Gene 6000	Corbett, Sydney, Australien
Ribolyser Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hannover
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sonovex Super (Ultraschallbad)	Bandelin, Berlin
Spectra/Por Dialyseschlauch (MWCO 6-8 kD)	Spectrum, Rancho Dominguez, USA

Bezeichnung	Hersteller
Taumel Rollenmischer CAT RM5	neoLab, Heidelberg
Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
TrayCell	Hellma, Müllheim
Ultra-Clear centrifuge tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Vortexer VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zellophan Folien (24x24 cm)	Carl Roth, Karlsruhe
Zellschaber M	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatte 12-well	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur von Leishmanien

2.2.1.1. Kultivierung von Promastigoten

Promastigote *L. donovani* existieren in der weiblichen Sandmücke. Hier haften sie sich an das Darmepithel mittels ihrer Geißel an.

Im Labor werden die Promastigoten bei 25 °C im Brutschrank in komplementiertem M199 (pH 7,4) unter reduzierter Luftzufuhr in 25 cm² Zellkulturflaschen (T25 Sarstedt) gehalten, um vergleichbare Kultivierungsbedingungen zur Natur zu erzielen. Idealerweise werden die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten, wofür sie zweimal wöchentlich auf eine Zelldichte von 1×10^5 - 1×10^6 Zellen mL⁻¹ verdünnt werden. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt mit Hilfe eines *CASY Cellcounter & Analyzer*. Hierbei werden die Zellen 1:1.000 in der Elektrolytlösung *CASYton* verdünnt und in Doppelbestimmung gemessen. Das Prinzip des *CASY Cellcounter & Analyzer* beruht auf der Messung eines veränderten Widerstands während des Ansaugens von 1×200 µL Probe durch eine Kapillare. Zur Selektion von transfizierten Zellen wird dem Medium bei der Kultivierung Antibiotikum hinzugefügt.

2.2.1.2. Kryokonservierung von Leishmanien

Für die Konservierung über einen langen Zeitraum werden Leishmanien in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür werden 1×10^8 Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 × g). Das Sediment wird in 500 µL kaltem komplementiertem M199 (pH 7,4) resuspendiert, mit 1 Vol kaltem Einfriermedium gemischt und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Kristallbildung der Flüssigkeit im Zellplasma. Zunächst werden die Zellen für 24 h bei -70 °C gelagert und anschließend in den Kryotank überführt.

Für das erneute Kultivieren von Leishmanien wird das Kryoröhrchen dem Kryotank entnommen. Die Zellsuspension wird bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit komplementiertem M199 (pH 7,4) in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der Leishmanien erfolgt bei 25 °C.

2.2.1.3. Transfektion von Leishmanien

Transfektion bedeutet das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eine eukaryotische Zelle. Es wird zwischen zwei Arten der Transfektion unterschieden. Bei einer stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA ins Genom der Zelle integriert, bei einer transienten Transfektion wird die zirkuläre DNA (Plasmid) episomal exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Arten der Transfektion durchgeführt. Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation. Hierbei werden Zellmembranen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes permeabel und Fremd-DNA kann aufgenommen werden.

Für die Transfektion durch Elektroporation werden 4×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur entnommen und sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 × g). Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS (pH 7,4) und einmal mit eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Das Zellsediment wird in 400 µL Elektroporationspuffer resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Zudem werden 2 µg Fremd-DNA (stabile Transfektion) bzw. 50 µg zirkuläre DNA (transiente Transfektion) hinzugegeben. Als Kontrolle bei der Elektroporation dient ein Ansatz ohne Fremd-DNA. Die Elektroporation erfolgt durch drei Stromstöße mit dem *Gene Pulser* (Bio-Rad) (1,5 kV, 200 Ω, 25 µF, Zeitkonstante ~1 ms). Anschließend werden die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert, in 25 cm² Zellkulturflaschen mit komple-

mentiertem M199 (pH 7,4) gegeben und bei 25 °C inkubiert. Nach 24 h wird den Zellen zur Selektion transfizierter Parasiten ein Antibiotikum zugesetzt. Dieses richtet sich nach dem gewählten Transfektionsplasmid. Die Kontrollgruppe wird ebenfalls mit dem Antibiotikum selektiert und alle Ansätze werden gleich verdünnt. Sobald die Kontrollgruppe keine lebenden Leishmanien mehr aufweist, gilt die Selektion auf rekombinante Zellen als erfolgreich beendet (i. d. R. 10-14 Tage nach Transfektion).

2.2.1.4. *In vitro* Differenzierung

Die *in vitro* Stadiendifferenzierung ermöglicht es, einen vollständigen Lebenszyklus der Parasiten im Labor nachzustellen.

Hierfür werden zunächst 1×10^7 Zellen mL^{-1} Leishmanien im Promastigotenstadium in komplementiertes M199 (pH 7,4) in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit gasundurchlässigem Deckel überführt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h werden die Hitze-geschockten Parasiten sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 \times g), in doppeltes Anfangsvolumen komplementiertes M199 (pH 5,5) aufgenommen und in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit gasdurchlässigem Deckel überführt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO_2 . Drei Tage nach Ansäuerung wird das Medium erneuert. Nach weiteren drei Tagen werden die nun axenischen Amastigoten sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 \times g), in komplementiertem M199 (pH 7,4) aufgenommen und in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit gasundurchlässigem Deckel überführt. Die Inkubation für die Rückumwandlung in das Promastigotenstadium erfolgt bei 25 °C. Für weitere Versuche werden täglich Zelllysate abgenommener Parasiten hergestellt (s. 2.2.3.1) sowie Leishmanien auf Objektträgern für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie fixiert (s. 2.2.4.2).

2.2.1.5. *In vitro* Proliferationsstudien

Bei Proliferationsstudien wird das Wachstum der transfizierten Leishmanien im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bestimmt und somit der Einfluss der eingebrachten Fremd-DNA untersucht. Zudem wird bestimmt, welchen Einfluss Inhibitoren und andere Chemikalien auf das Wachstum der Parasiten haben.

Es werden 1×10^5 Promastigote mL^{-1} einer logarithmisch wachsenden Kultur entnommen, in 10 mL komplementiertes M199 (pH 7,4) eingesät sowie gegebenenfalls zu tes-

tende Wirkstoffe hinzugefügt. Die Zelldichte wird über einen Zeitraum von vier Tagen täglich mittels *CASY Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Die eingesetzten Wirkstoffe werden vor Beginn des Experiments getestet und die mittlere inhibitorische Konzentration (*inhibitory concentration*, IC), die für eine fünfzigprozentige Hemmung des Wachstums von Wildtyp-Zellen notwendig ist, bestimmt.

2.2.1.6. *In vitro* Infektionsstudien

Pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen wachsen durch Zugabe von CSF-1 (*colony stimulating factor-1*) im Medium innerhalb weniger Tage zu unreifen Makrophagen heran. Das zugegebene CSF-1 wird von der Makrophagen-Zelllinie LADMAC (ATCC CRL-2420) in den Überstand sezerniert und kann dann gewonnen werden. Die ausdifferenzierten Makrophagen können nach ca. zehn Tagen für *in vitro* Experimente eingesetzt werden.

Nach vollständiger Ausdifferenzierung der aus C57BL/6 Mäusen stammenden Makrophagen werden diese zwei Tage vor der Infektion in 12-*well* Platten eingesät. Hierfür werden die Makrohagen zweimal in vorgewärmtem PBS (pH 7,4) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wird vorgewärmte Trypsin-EDTA Lösung hinzugefügt und für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird doppeltes Vol DMEM zur Hemmung des Trypsins hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wird sedimentiert (10 min, 4 °C, 500 × g) und das Zellse-diment in DMEM aufgenommen und auf Eis gelagert, um ein Absetzen der Makropha-gen zu verhindern. Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Makrophagen 1:1 mit Try-panblaulösung verdünnt und die Zelldichte mit einer Zählkammer nach Neubauer (0,1 mm Tiefe) bestimmt. Pro *well* werden 2×10^5 Knochenmarksmakrophagen in 2 mL vorgewärmtem DMEM eingesät. Die Inkubation erfolgt für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Am Tag der Infektion wird das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen, die Zelldichte einer stationären Promastigotenkultur bestimmt und die Leishmanien für ein Makrophagen/*Leishmania*-Verhältnis von 1:10 in 500 µL vorgewärmtem DMEM in jedes *well* gegeben. Es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 4 h werden freie Parasiten durch zweimaliges Waschen mit vorgewärmtem PBS entfernt und 2 mL vorgewärmtes DMEM hinzugegeben. Die infizierten Makrophagen werden weitere 44 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4,5 h und 48 h werden freie Zellen sedimentiert

(10 min, 4 °C, 1.250 × g). Währenddessen werden adhärenente, infizierte Makrophagen durch die Zugabe von Lysepuffer abgelöst und lysiert und zu dem Zellsediment gegeben. Für die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) von Makrophagen und Parasiten wird das *ISOLATE II Genomic* DNA Kit (Bioline) verwendet. Intrazelluläre Parasiten werden anschließend durch die semi-quantitative *real-time TaqMan-PCR* quantifiziert.

2.2.1.7. Limiting dilution-Analyse

Um eine stabile Transfektion zu verifizieren, wird mit Einzelklonen gearbeitet, da so verhindert werden kann, dass eine Phänotyp-Analyse einer Mischpopulation vorgenommen wird.

Die Vereinzelnung der Mischpopulation zu Einzelklonen erfolgt in 96-*well* Platten. Hierfür wird die Zelldichte mittels Verdünnungsreihe auf 2,5 Zellen mL⁻¹ eingestellt. 200 µL der in komplementiertem M199 (pH 7,4) verdünnten Parasiten sowie das entsprechende Antibiotikum werden pro *well* eingesät und die Platte mit Parafilm verschlossen. Es werden zwei Platten pro Vereinzelnungsversuch hergestellt. Die Inkubation erfolgt für 10-14 Tage bei 25 °C. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch bis zum sichtbaren Zellwachstum. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um Einzelklone handelt, wenn in maximal der Hälfte aller *wells* Leishmanien angewachsen sind. Anschließend werden zehn Einzelklonkulturen angelegt, die geno- und phänotypisch untersucht werden.

2.2.1.8. Sekretionsassay

Der Sekretionsassay ermöglicht die Identifizierung aller sekretierten Proteine eines Parasiten. Diese werden nach Inkubation in serumfreiem Medium aus dem Zellüberstand einer Kultur isoliert.

Aus einer spät-logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur werden 2 × 10⁸ Zellen sedimentiert (10 min, 4 °C, 500 × g) und dreimal in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen, um das Serum des Mediums zu entfernen. Das Zellsediment wird in 4 mL 5 % Saccharose in PBS resuspendiert und 2 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut sedimentiert (10 min, 4 °C, 500 × g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 1,10-Phenanthrolin (in Methanol, Endkonzentration 10 mM) als Proteasein-

hibitor überführt. Die Suspension wird durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert und zum Aufkonzentrieren auf einen Einengefilter (Amicon Ultra-15, MWCO 100.000 D, Millipore) gegeben, der vorher mit sterilem ddH₂O gespült wird. Die Zentrifugation erfolgt für 10-30 min bei 1.400 × g und 4 °C. Das Konzentrat wird in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 10 mM 1,10-Phenanthrolin versetzt und bei -70 °C gelagert. Zur Verifizierung der isolierten Vesikel wird der Trypsinverdau (s. 2.2.3.7.) durchgeführt.

2.2.1.9. Isolierung von Exosomen aus Leishmanien

Ähnlich wie bei einem Sekretionsassay werden für die Isolierung von Exosomen 3×10^9 Zellen aus einer spät-logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur sedimentiert (10 min, 4 °C, 500 × g) und dreimal in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Das Zellsediment wird in 15 mL 5 % Saccharose in PBS resuspendiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden erneut sedimentiert (10 min, 4 °C, 500 × g), wobei das Sediment in PBS resuspendiert und für eine mikroskopische Analyse zur Verifizierung intakter Leishmanien verwendet wird. Der zellfreie Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 1,10-Phenanthrolin (in Methanol, Endkonzentration 10 mM) überführt. Der Überstand wird durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert und zum Aufkonzentrieren auf einen Einengefilter (Amicon Ultra-15, MWCO 100.000 Da, Millipore) gegeben. Die Ultrafiltration erfolgt für 10-30 min bei 1400 × g und 4 °C. Parallel wird ein Saccharose-Kissen (2 mL kaltes PBS unterschichtet mit 750 µL eiskalter 1 M Saccharoselösung) in einem 5,2 mL *Ultra-Clear* Röhrchen (Beckman Coulter) vorbereitet. Die konzentrierten Exosomen werden darauf gegeben und die Röhrchen bis zum Rand mit PBS aufgefüllt. Die Röhrchen werden anschließend in den vorgekühlten SW 55 Ti-Rotor (Beckman Coulter) eingespannt und 2 h bei 100.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Aufgrund ihrer Dichte (1,13 g mL⁻¹) wandern die Exosomen bei der Sedimentation in die Saccharoselösung. Die Saccharoselösung wird nach der Zentrifugation in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (*Microfuge Tube*, Beckman Coulter) überführt, welches mit PBS aufgefüllt, in den vorgekühlten TLA 55 Rotor (Beckman Coulter) eingespannt und 1 h bei 125.000 × g und 4 °C zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen und das Sediment, bestehend aus konzentrierten Exosomen, in 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) resuspendiert und bei 4 °C über Nacht gelöst. Zur Verifizierung der isolierten Exosomen wird der Trypsinverdau (s. 2.2.3.7.) durchgeführt.

2.2.1.10. Fixierung von Leishmanien auf Objektträgern

Zur mikroskopischen Analyse von Leishmanien werden die Zellen auf einem Objektträger fixiert. Hierfür werden 1×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur entnommen, sedimentiert (10 min, 4 °C, $1.250 \times g$) und zweimal mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Das Zellsediment wird in 1 mL PBS resuspendiert. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden 2×10^5 Zellen kreisförmig auf einem Objektträger ausgestrichen. Für die Färbung nach Giemsa (s. 2.2.1.11.) werden 5×10^5 Zellen ausgestrichen. Anschließend werden die Objektträger luftgetrocknet und 3 min mit eiskaltem Methanol zur Fixierung der Zellen behandelt. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden die kreisförmig ausgestrichenen Zellen mit einem Fettstift (Pap Pen, Kisker Biotech) umrandet, um das Auslaufen der Probe zu verhindern. Die Objektträger werden bei 4 °C gelagert.

2.2.1.11. Färbung der Zellen nach Giemsa

Die Färbung nach Giemsa dient der Zellmorphologieanalyse. Hierbei werden Bereiche einer Zelle durch deren unterschiedliche pH-Werte voneinander differenziert. Das in der Giemsa-Lösung enthaltene Azur bindet an saures Chromatin, das enthaltene Eosin an basische Bestandteile, wie das Zytoplasma. Somit erscheint der Zellkern rötlich, der Kinetoplast violett und die Zelle insgesamt schwach violett.

Hierzu werden die in 2.2.1.10. beschriebenen fixierten *Leishmania*-Ausstriche 10 min in einer Giemsa-Lösung (1:10 Verdünnung mit Leitungswasser) bei RT inkubiert. Die Objektträger werden anschließend mit Leitungswasser gewaschen und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es, eine bestimmte DNA-Sequenz *in vitro* zu amplifizieren. Hierbei werden spezifische DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotiden (Primer) enzymatisch vermehrt. Eine exponen-

tielle Vervielfältigung wird durch Erhitzen und Abkühlen der Reaktionslösung in drei zyklischen Schritten erreicht. Die Oligonukleotide binden dabei gegenläufig an komplementäre Stränge der DNA (*template*). Ein PCR-Zyklus besteht aus Denaturierung der DNA (Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen), Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge und DNA-Synthese durch die hitzebeständige DNA-Polymerase (Elongation). Vor dem ersten Zyklus wird die Probe zur initialen Denaturierung erhitzt. Nach dem letzten Zyklus wird die Probe erneut auf 72 °C zur finalen Elongation erhitzt.

Die Bedingungen für jede PCR werden individuell erstellt und sind abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide (Primerhybridisierungstemperatur) sowie von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (Elongationszeit).

Für die Klonierung von Plasmiden wird das *iProof High-Fidelity* PCR Kit (Bio-Rad) verwendet. Zur Identifizierung von integrierter DNA wird das *Taq* DNA Polymerase Kit (Thermo Fisher Scientific) benutzt.

Beispielhafte Pipettierschemata sowie PCR-Programme sind in Tab. 7 und 8 zusammengefasst.

Tab. 7: PCR-Ansatz und PCR-Programm (*iProof High-Fidelity* PCR Kit)

PCR-Ansatz	PCR-Programm
500 ng gDNA (<i>template</i>)	Initiale Denaturierung 98 °C 30 s
13 µL 2 × <i>iProof Master Mix</i>	
1 µL 10 µM <i>forward</i> Primer	Denaturierung 98 °C 10-40 s
1 µL 10 µM <i>reverse</i> Primer	Primerhybridisierung 45-65 °C 30 s
3 µL DMSO	Elongation 72 °C 15-30 s kb ⁻¹
x µL ddH ₂ O	
25,5 µL Gesamtvolumen	Finale Elongation 72 °C 5 min

Tab. 8: PCR-Ansatz und PCR-Programm (Taq DNA Polymerase Kit)

PCR-Ansatz	PCR-Programm
500 ng gDNA (<i>template</i>)	Initiale Denaturierung 95 °C 5 min
0,25 µL Taq DNA Polymerase (5 U µL ⁻¹)	Denaturierung 95 °C 1 min Primerhybridisierung 55-60 °C 30 s Elongation 72 °C 90 s kb ⁻¹ Finale Elongation 72 °C 2 min
2,5 µL 10 × Taq PCR-Puffer	
0,75 µL 50 mM MgCl ₂	
0,5 µL 10 mM dNTP Mix	
0,5 µL 10 µM <i>forward</i> Primer	25 Zyklen
0,5 µL 10 µM <i>reverse</i> Primer	
x µL ddH ₂ O	
25,5 µL Gesamtvolumen	

Als Kontrolle der PCR dient der Einsatz von Wasser anstatt DNA als *template*. Die PCR-Produkte werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden negativ geladene Nukleinsäure-Moleküle in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Molekülgröße aufgetrennt. Je nach prozentualem Anteil der Agarose variiert die Porengröße der kreuzvernetzten Agarosepolymere, wodurch DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden können.

Die hier eingesetzte Agarosekonzentration liegt bei 1 % w/v Agarose in 1 × TAE-Puffer. Diese wird aufgeköcht und mit Ethidiumbromid (0,1 µg mL⁻¹) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, sodass die aufgetrennte DNA in einem UV-Transilluminator nachgewiesen und dokumentiert werden kann. Das Agarosegel wird mit DNA-Proben, die mit 6 × DNA-Ladepuffer versetzt werden, beladen und an ein elektrisches Feld angeschlossen. Das Auftrennen der DNA erfolgt bei 10 V cm⁻¹ für 1-2 h. Zur Längenbestimmung der aufgetrennten DNA wird der 1 kb DNA-Längenstandard verwendet.

2.2.2.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen

Aufgetrennte DNA-Fragmente können aus Agarosegelen extrahiert werden. Hierfür wird das *NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit* (Macherey-Nagel) verwendet.

Das DNA-Fragment wird unter langwelligem UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten und die Agarose bei 50 °C aufgelöst. Die DNA wird anschließend durch Zentrifugation an das Säulenmaterial gebunden, zweimal gewaschen und von der Säule gelöst. Die reine DNA kann anschließend weiterverwendet werden.

2.2.2.4. Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA. Jedes Enzym erkennt eine spezifische, palindromische Sequenz. Hierbei entstehen einzelsträngige DNA-Fragmente mit glatten (*blunt*) oder überhängenden (*sticky*) Enden. Sowohl die zu verwendenden Puffer als auch die Temperaturoptima sind bei jedem Enzym spezifisch. Es wird unterschieden zwischen der Identifizierung von DNA-Konstrukten (analytische Zwecke) und der gerichteten Klonierung (präparative Zwecke).

Für das analytische Verfahren werden 1 µg Plasmid-DNA und 5 U Enzym für 1 h inkubiert. Für das präparative Verfahren werden 10 µg DNA und 45 U für 2 h inkubiert. Durch Einfrieren der Proben bei -20 °C wird die enzymatische Reaktion gestoppt.

2.2.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente enzymatisch über eine Phosphodiesterbindung verknüpft. Die T4 DNA Ligase, welche aus dem Bakteriophagen T4 gewonnen wird, katalysiert unter ATP-Verbrauch diese Reaktion.

Die zu verknüpfenden DNA-Fragmente sind das Insert und ein Vektor. Das Insert zu Vektor-Verhältnis liegt bei 3:1, wobei in einem Ansatz von 10 µL 4 U T4 DNA Ligase in dem dazugehörigen Puffer eingesetzt werden. Die Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden erfolgt über Nacht bei 4 °C. Anschließend werden kompetente Bakterien mit dem Ligationsprodukt transformiert.

2.2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten (In-Fusion HD Cloning Kit)

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit dem *In-Fusion HD Cloning Kit* (Takara Bio Europe) ist es möglich zwei DNA-Fragmente gleichzeitig mit einem Vektor zu verknüpfen. Dies geschieht mittels des *In-Fusion* Enzyms, welches effizient und exakt 15 bp lange überlappende Enden der DNA-Fragmente erkennt und verknüpft. Die Ligation wird gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.7. Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation von *E. coli* wird frei in Lösung befindliche DNA aufgenommen. Expressionsplasmide werden in *E. coli* BL21 (DE3) [pAPlacI^Q] zur präparativen Proteinexpression transformiert und Plasmide und Ligationsprodukte in kompetente *E. coli* DH5 α .

Es werden 50 μ L der chemisch kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut und anschließend 1 μ g Plasmid-DNA oder 5 μ L eines Ligationsansatzes hinzugegeben. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 s (BL21 (DE3) [pAPlacI^Q]) bzw. für 20 s (DH5 α). Anschließend wird der Ansatz sofort auf Eis gestellt und nach 2 min 950 μ L vorgewärmtes *Cycle Grow* LB-Medium hinzugegeben. Dieser Ansatz wird für 1 h schüttelnd bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nachfolgend wird die Probe sedimentiert (5 min, RT, 3.220 \times g), der Zellüberstand bis auf 100 μ L abgenommen und das resuspendierte Sediment auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der LB-Agarplatte erfolgt über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Durch die Aufnahme der Plasmid-DNA besitzen die Bakterien eine (zusätzliche) Antibiotikumresistenz, welche es ihnen ermöglicht auf entsprechenden LB-Agarplatten zu wachsen.

2.2.2.8. Transformation von Stellar kompetenten Zellen

Bei einer Klonierung bei der das *In-Fusion HD Cloning Kit* gebraucht wird, werden *E. coli* Stellar kompetente Zellen (Takara Bio Europe) für die Transformation verwendet.

Es werden 50 μ L der chemisch kompetenten Stellar Zellen auf Eis aufgetaut und 5 μ L eines Ligationsansatzes hinzugegeben. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Es

erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 60 s. Anschließend wird der Ansatz sofort auf Eis gestellt und nach 2 min 450 µL vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben. Dieser Ansatz wird für 1 h schüttelnd bei 3.000 rpm und 37 °C im Heizblock inkubiert. Nachfolgend wird die Probe sedimentiert (5 min, RT, 3.220 × g), der Zellüberstand abgenommen, das Sediment in 100 µL frischem SOC-Medium resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der LB-Agarplatte erfolgt über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.2.2.9. Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien

Die Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien erfolgt mit dem *Genra Puregene Tissue Kit* (Qiagen) zur DNA-Isolierung aus Zellen und Geweben.

Hierfür werden 2×10^8 Zellen einer logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur entnommen, sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 × g) und zweimal mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Das Zellsediment wird in 1 mL PBS resuspendiert und die genomische DNA isoliert.

2.2.2.10. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Bei der Minipräparation von Plasmid-DNA werden geringe Mengen DNA durch alkalische Lyse isoliert, die der Analyse der hergestellten Plasmid-Konstrukte dient.

Hierfür werden 2 mL *Cycle Grow* LB-Medium mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin versetzt und mit einer transformierten Bakterienkolonie über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Suspension wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert (2 min, 4 °C, 16.000 × g) und in 100 µL Plasmid-Lösung 1 resuspendiert. Das Sediment wird vollständig gelöst und es werden 200 µL Plasmid-Lösung 2 zur Bakterienlyse hinzugefügt, wobei sich das enthaltene SDS an Zellproteine und -lipide anlagert. Anschließend werden 150 µL Plasmid-Lösung 3 hinzugegeben und mehrmals invertiert. Die Proteine werden bei einer 5-minütigen Inkubation im Eisbad durch die Neutralisierung des pH-Wertes gefällt. Die Zelltrümmer und gefällten Zellbestandteile werden sedimentiert (10 min, 4 °C, 16.000 × g), der nukleinsäurehaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL 96 % Ethanol für 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Fällen

der DNA (10 min, RT, 16.000 × g), wird das DNA-Sediment gewaschen indem es in 500 µL 70 % Ethanol aufgenommen und erneut sedimentiert wird (10 min, RT, 16.000 × g). Die sedimentierte DNA wird in 40 µL TE-RNaseA (10 µg ml⁻¹ RNaseA in TE-Puffer) für 30 min bei 37 °C gelöst, um RNA abzubauen. Die isolierte Plasmid-DNA wird anschließend für einen analytischen Restriktionsverdau (s. 2.2.2.4.) eingesetzt.

2.2.2.11. Isolierung hochreiner Plasmid-DNA

Isolierte, hochreine Plasmid-DNA wird für die Transfektion von Leishmanien benötigt. Diese wird durch eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

Hierfür werden 200 mL *Cycle Grow* LB-Medium mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin versetzt und mit einer verifizierten, transformierten Bakterienkolonie über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien werden sedimentiert (20 min, 4 °C, 5.000 × g) und in 5 mL Plasmid-Lösung 1 resuspendiert. Das Sediment wird vollständig gelöst und es werden 10 mL Plasmid-Lösung 2 zur Bakterienlyse hinzugefügt. Die Suspension wird durch Invertieren und eine 10-minütige Inkubation auf dem Rollenschüttler gemischt. Anschließend werden 7,5 mL Plasmid-Lösung 3 hinzugegeben und mehrmals invertiert. Die Proteine werden bei einer 10-minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Die Zelltrümmer und gefällten Zellbestandteile werden sedimentiert (20 min, 20 °C, 3.220 × g) und der nukleinsäurehaltige Überstand durch einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und die Lösung durch Invertieren homogenisiert. Nach dem Fällen der DNA (10 min, RT, 16.000 × g), wird das DNA-Sediment in 10 mL 70 % Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert (20 min, RT, 3.220 × g). Die sedimentierte DNA wird in 4 mL TE-Puffer vollständig resuspendiert. Es werden 4,9 g Cäsiumchlorid und Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,36 mg mL⁻¹ hinzugegeben und die Lösung auf dem Rollenschüttler gut gemischt. Mit einer Pasteurpipette wird die DNA-Lösung in ein *Quick-Seal*-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter) überführt. Die Röhrchen werden exakt austariert und luftblasenfrei verschweißt. Die anschließende Zentrifugation erfolgt für 8 h bei 390.000 × g und 25 °C, wobei sich der Cäsiumchloridgradient einstellt. Hierbei interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA, sodass sich gDNA, Plasmid-DNA und RNA im Gradienten gut voneinander unterscheiden lassen. Die superhelikale Plasmid-DNA wird entnommen und zur Entfernung des Ethidiumbromids wird zweimal mit 1 Vol NH₄-Acetat gesättigtem Isopropanol gewaschen.

Zu der wässrigen Phase (DNA) werden 2 Vol ddH₂O und 0,1 Vol 7,5 M NH₄-Acetat gegeben. Zusätzlich werden 2,5 Vol 100 % Ethanol hinzugegeben, 20 min bei RT inkubiert und die DNA gefällt (30 min, RT, 3.220 × g). Die DNA wird je nach Ausbeute in 200-500 µL TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wird anschließend photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.12.) und mit einem analytischen Restriktionsverdau (s. 2.2.2.4.) überprüft.

2.2.2.12. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich photometrisch bestimmen, indem bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption (OD, engl. *optical density*) des Lichts berechnet wird. Die Konzentration wird auf der Grundlage berechnet, dass eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg mL⁻¹ doppelsträngiger DNA entspricht. Proteinverunreinigungen können bei einer OD₂₈₀ gemessen werden. Zusätzlich kann durch das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ die Reinheit der Nukleinsäurepräparation angegeben werden. Eine reine DNA weist einen Wert von 1,8 auf, RNA einen Wert von 2,0.

2.2.2.13. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Untersuchung der isolierten, hochreinen Plasmid-DNA. Hierbei wird eine Sequenzanalyse durchgeführt, mit der eventuelle Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen aufgedeckt werden. Die Plasmid-DNA wird hierfür an LGC Genomics (Berlin) geschickt, die die Sequenzierung auf Basis der Dideoxymethode nach Sanger durchführt. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgt mit der Software MacVector 15.1.4. Für den Abgleich mit anderen Sequenzen wird die Datenbank TriTryp verwendet.

2.2.2.14. Isolierung von RNA aus Leishmanien

Die Isolierung der RNA aus Leishmanien lässt Rückschlüsse auf die Expression eines Gens zu. Zwar korrelieren die Transkription und Translation von Leishmanien nur selten, doch können mögliche Tendenzen gesehen werden.

Für die Isolierung der RNA wird das *InviTrap Spin Cell* RNA Mini Kit (Stratec) verwen-

det. Zunächst werden 5×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden *L. donovani* Promastigotenkultur sedimentiert (10 min, 4 °C, $1.250 \times g$) und zweimal in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Im zweiten Waschschrift wird das Zellsediment in 1 mL PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellsediment im restlichen PBS resuspendiert. Die Probe wird mit 350 μ L *Lysis Solution R*, versetzt mit 1/100 Vol 1 M DTT, vermischt. Anschließend wird die Probe auf einen *DNA-Binding Spin Filter* gegeben, für 1 min bei RT inkubiert und sedimentiert (2 min, RT, $13400 \times g$). Der *DNA-Binding Spin Filter* wird verworfen und der Durchlauf zusammen mit 250 μ L 96 % Ethanol auf einen *RNA-RTA Spin Filter* gegeben. Erneut wird für 1 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (30 s, RT, $9300 \times g$). Es wird 600 μ L *Wash Buffer R1* auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert (30 s, RT, $9300 \times g$) und der Durchfluss verworfen. Der zweite Waschschrift erfolgt mit 700 μ L *Wash Buffer R2* (30 s, RT, $9300 \times g$). Nach dem Trocknen der Säule (5 min, RT, $13400 \times g$) wird die RNA in 40 μ L *Elution Buffer R* durch eine zweiminütige Inkubation bei RT und einen Zentrifugationsschritt (1 min, RT, $9300 \times g$) in ein RNA-freies Reaktionsgefäß eluiert. Die isolierte RNA wird sofort auf Eis inkubiert. Die Konzentration der RNA wird anschließend photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.12.).

2.2.2.15. Semi-quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Die *SYBR Green* semi-quantitative *real-time* RT-PCR dient der relativen Bestimmung des mRNA-Expressionslevels eines Gens. Mit spezifischen Oligonukleotiden werden die Transkripte eines Gens und β -Aktin (interner Standard) amplifiziert.

Hierbei wird cDNA (*complementary* DNA) benötigt, die aus RNA, durch die Nutzung von *random* Oligonukleotiden und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), synthetisiert wird. Es wird das DyNAmo cDNA Synthese Kit (Thermo Fisher Scientific) für die Umschreibung von RNA in cDNA verwendet.

Für die *SYBR Green* qRT-PCR werden genspezifische Oligonukleotide, die nur einen Teil des Gens amplifizieren, und cDNA als *template* eingesetzt. Es wird das DyNAmo *Color Flash SYBR Green* qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die qRT-PCR erfolgt im *Corbett Rotor-Gene* 6000. Der im Kit enthaltene Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* bindet spezifisch an doppelsträngige DNA, wodurch sich der Gehalt des zu untersuchenden Gens quantifizieren lässt. Die Normalisierung der Proben erfolgt durch

die Quantifizierung des internen Standards (Aktin), wodurch sich Werte in unterschiedlichen Proben vergleichen lassen.

2.2.2.16. Semi-quantitative real-time TaqMan-PCR (qPCR)

Die Quantifizierung der relativen Parasitenlast von infizierten Makrophagen wird durch eine Sonden-basierte *TaqMan real-time* qPCR berechnet. An das 5'-Ende der Sonde bindet ein *Quencher* während an das 3'-Ende ein Reporterfarbstoff kovalent gebunden ist. Bei der semi-quantitativen *real-time TaqMan*-PCR lagert sich die Sonde an den neu synthetisierten DNA-Abschnitt an, der durch Oligonukleotide amplifiziert wird. Während der Synthese des neuen DNA-Abschnitts wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der *TaqMan* Polymerase abgebaut. Hierbei wird die Fluoreszenz des freigesetzten Fluorochroms nicht unterdrückt, sodass eine Emission gemessen werden kann. Dabei ist die Emission des Fluorochroms proportional zur Menge des amplifizierten DNA-Abschnitts. Der Vorteil der Sonden-basierten *TaqMan real-time* qPCR ist, dass mehrere Sonden gleichzeitig eingesetzt werden können, sodass die Synthese unterschiedlicher DNA-Abschnitte quantifiziert werden kann.

Bei der Quantifizierung der relativen Parasitenlast von infizierten Makrophagen wird die Menge des Aktin-Gens von sowohl Maus (Makrophage) als auch Leishmanien bestimmt. Es werden Oligonukleotide und Sonden eingesetzt, die spezifisch an die Gene binden.

Für die semi-quantitative *real-time TaqMan*-PCR wird die isolierte gDNA aus infizierten Makrophagen (s. 2.2.1.6.) als *template* eingesetzt und das *Kapa Probe Fast qPCR Master Mix* Kit (VWR) verwendet.

Die qPCR erfolgt im *Corbett Rotor-Gene 6000* und das Pipettierschema sowie PCR-Programm sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: qPCR-Ansatz und qPCR-Programm (Kapa Probe Fast qPCR Master Mix Kit)

(*) Es wird ein Temperatur *touchdown* durchgeführt, bei dem die Temperatur 16 Zyklen lang um 0,5 °C gesenkt wird, um die Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen zu vermeiden.

qPCR-Ansatz	qPCR-Programm
2 µL gDNA (<i>template</i>)	Enzymaktivierung 95 °C 7 min
10 µL 2 × Kapa Probe Fast qPCR Master Mix	
0,3 µL 900 nM <i>forward</i> Leishmanien-Primer	Denaturierung 95 °C 10 s
0,3 µL 900 nM <i>reverse</i> Leishmanien-Primer	Primerhybridisierung/Elongation/ Datenerfassung 66 → 58 °C (*) 25 s
0,3 µL 900 nM <i>forward</i> Maus-Primer	40 Zyklen
0,3 µL 900 nM <i>reverse</i> Maus-Primer	
0,5 µL 200 nM Leishmanien-Sonde	
0,5 µL 200 nM Maus-Sonde	
1,2 µL 25 mM MgCl ₂	
x µL ddH ₂ O	
20 µL Gesamtvolumen	

Zur Berechnung der relativen Parasitenlast von infizierten Makrophagen werden die CT-Werte (*cycle threshold*) aus der exponentiellen Elongationsphase verwendet. Dabei werden die CT-Werte des Leishmanien-Aktins gegen die Maus-Aktin CT-Werte normalisiert (Δ CT-Methode). Die normalisierten Werte werden benutzt, um die eingesetzten Proben zu quantifizieren, wobei *L. donovani* Wildtyp als Kontrolle genutzt wird ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT_{Probe} - Δ CT_{Kontrolle}).

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Denaturierender Zellaufschluss

Der denaturierende Zellaufschluss wird benötigt, um Leishmanien-Zelllysate herzustellen, welche man elektrophoretisch (s. 2.2.3.2.) und in einer Immunblot-Analyse (s. 2.2.3.6.) auf die Expression von Proteinen untersuchen kann.

Aus einer logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur werden 5×10^6 Zellen sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 × g) und zweimal in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Das Zellsediment wird je nach gewünschter Zelldichte in 1 Vol PBS und 1 Vol 2 × Laemmli

Puffer resuspendiert. Anschließend wird das Lysat 10 min bei 100 % Output und RT im Ultraschallbad sonifiziert. Das Lysat wird dann 10 min bei 95 °C schüttelnd inkubiert und sedimentiert (5 min, RT, 16.100 × g). Das Gesamtprotein kann anschließend elektrophoretisch analysiert werden.

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Analyse von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Zum einen überdeckt das enthaltene SDS die Eigenladung der Proteine und zum anderen führt die vorherige Denaturierung zur Linearisierung der Proteine. Dadurch können Proteine anhand ihrer Kettenlänge, die proportional zur Molekülmasse ist, aufgetrennt werden. Lange Proteine wandern langsamer als kurze Proteine, da sie im Polyacrylamid-Gel zurückgehalten werden. Es wird eine diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet, bei der die Proteine zunächst durch ein weitmaschiges Sammelgel (pH 6,8) wandern und anschließend in einem engmaschigen Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt werden. Durch den pH-Gradienten zwischen den Gelen kommt es zu einem Stapelungseffekt und die Proben werden am Ende des Sammelgels fokussiert und treten zum gleichen Zeitpunkt in das Trenngel ein.

Es wird das VWR-Kammersystem verwendet. Dafür werden die mit Ethanol-gereinigten Glasplatten, Abstandhalter und Kämmen im vertikalen Gel-Gießstand eingebaut. Es wird ein 10 % Trenngel zwischen die Glasplatten gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol entfernt, das 5 % Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wird die Apparatur in die Gelkammer eingesetzt und mit 1 × SDS-Laufpuffer befüllt. Auf das Gel aufgetragen wird Zelllysate aus 5×10^6 Leishmanien pro Bahn. Als Größenstandard für die Coomassie-Brillant-Blau Färbung dient der *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) und für einen Immunblot der *ProSieve QuadColor Protein Marker* (Biozym). Es wird eine Spannung von 15 V cm^{-1} angelegt und das Auftrennen der Proben erfolgt für 2 h. Für einen Nachweis der Proteine wird das Gel entweder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt oder die Proteine auf einer Membran immobilisiert (Western Blot) und mit Antikörpern nachgewiesen (Immunblot).

2.2.3.3. Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Die Coomassie-Brillant-Blau Färbung dient der Färbung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R-250 lagert sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt somit unspezifisch Proteine an.

Die Färbung eines Polyacrylamid-Gels erfolgt für mindestens 2 h bei RT in der Färbelösung (1 g L⁻¹ Coomassie-Brillant-Blau R-250, 40 % Ethanol [96 %], 10 % Essigsäure). Danach wird das Polyacrylamid-Gel so lange mit Entfärberlösung (40 % Ethanol [96 %], 10 % Essigsäure) behandelt bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Anschließend wird das Polyacrylamid-Gel in ddH₂O gespült, digitalisiert und luftblasenfrei zwischen zwei feuchten Zellophanpapieren konserviert.

2.2.3.4. Kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Die kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung ist wesentlich sensitiver als herkömmliche Coomassie-Brillant-Blau Färbungen. Hierbei wird Coomassie-Brillant-Blau G-250 verwendet, welches eine geringere Löslichkeit aufweist. Der Farbstoff wird zunächst in Phosphorsäure gelöst und anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat in seine kolloidale Form gedrängt. Die kolloidalen Partikel sind dabei so groß, dass sie nicht in die Gelporen des Polyacrylamid-Gels eindringen können, wohingegen der molekular-disperse Farbstoff in das Gel diffundieren und an die Proteine binden kann.

Die Färbung eines Polyacrylamid-Gels erfolgt über Nacht bei RT in der frisch angesetzten Färbelösung (0,25 % Coomassie-Brillant-Blau G-250, 20 % Methanol, 1,6 % ortho-Phosphorsäure [85 %], 8 % Ammoniumsulfat). Danach wird das Polyacrylamid-Gel in 25 % Methanol entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Anschließend wird das Polyacrylamid-Gel in ddH₂O gespült, digitalisiert und luftblasenfrei zwischen zwei feuchten Zellophanpapieren konserviert.

2.2.3.5. Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen durch die Übertragung auf eine Trägermembran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF), wo sie durch die Bindung von spezifischen Antikörpern identifiziert werden können. Es wird mit der *semi-dry*

blotting-Methode und einer horizontalen Blot-Apparatur gearbeitet. Proteine wandern hierbei aus dem Polyacrylamid-Gel in Richtung PVDF-Membran, an die sie durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. In diesem elektrischen Feld wandern die Proteine von der Kathode zur Anode.

Zur Vorbereitung wird die PVDF-Membran (FluoroTrans, Porengröße 0,2 µm) und zwei Lagen 3MM Whatman Filter auf die Größe des Polyacrylamid-Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wird in Methanol aktiviert, mit ddH₂O gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Die 3MM Whatman Filter werden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Auf die Kathode wird zuerst ein Whatman Filter gelegt, darüber das Polyacrylamid-Gel, dann die PVDF-Membran und erneut ein Whatman Filter geschichtet. Im Anschluss wird die Anode aufgesetzt, während die PVDF-Membranen möglichst luftblasenfrei aufliegen sollten. Die Übertragung der Proteine erfolgt für 1 h bei 1 mA/cm². Anschließend wird die PVDF-Membran entweder zwischen zwei Papiertüchern getrocknet oder direkt in Blockierungslösung zum Absättigen von freien Bindestellen gegeben.

2.2.3.6. Immunblot

Der Immunblot dient der qualitativen und quantitativen Analyse von immobilisierten Proteinen auf PVDF-Membranen durch spezifische Antikörperreaktionen.

Zunächst werden freie Bindestellen der auf die Membran übertragenen Proteine durch eine einstündige Inkubation in Blockierungslösung abgesättigt. Die Bindung des primären Protein-spezifischen Antikörpers (in Blockierungslösung verdünnt, Konzentrationen variieren) erfolgt für 1 h schüttelnd bei RT. Nicht-gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen (jeweils 5 min schüttelnd) mit Waschpuffer entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (in Blockierungslösung verdünnt, Konzentrationen variieren) für 1 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 5 min schüttelnd) mit Waschpuffer erfolgt der indirekte Proteinnachweis über eine Enzymreaktion. Bei schwer nachweisbaren Proteinen kann ein dritter Antikörper in einem Zwischenschritt hinzugegeben werden, der das Signal verstärkt. Der Proteinnachweis erfolgt kolorimetrisch mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP). Die Membran wird zunächst in AP-Puffer für 10 min äquilibriert. Anschließend werden die Enzymsubstrate 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) als chromogenes Substrat mit AP-Puffer gemischt und auf die PVDF-Mem-

bran gegeben. Hier werden die Substrate von der alkalischen Phosphatase zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt. Anschließend wird die Farbreaktion mit Leitungswasser gestoppt, die Membran zwischen zwei Papiertüchern getrocknet und digitalisiert.

2.2.3.7. Nachweis von Proteinen aus Saccharose-gereinigten Vesikeln

Der Nachweis von Proteinen aus Saccharose-gereinigten Vesikeln (s. 2.2.1.8. und 2.2.1.9.) wird mittels eines Trypsinverdaus durchgeführt. Proteine in Membran-umschlossenen Vesikeln werden dabei gegen Trypsin geschützt. Trypsin in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 hingegen baut freie Proteine ab.

Die isolierten Membran-umschlossenen Vesikel werden in einem Gesamtvolumen von 75 μL entweder in 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS und 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Trypsin, in 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Trypsin und 0,1 % Triton X-100 oder nur in 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS aufgenommen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wird durch die Zugabe von PMSF (in Methanol, Endkonzentration 22 mM) inaktiviert. Die Proben werden anschließend 10 s gründlich durchmischt und die Proteine präzipitiert. Hierfür werden 4 Vol eiskaltes Aceton zu den Proben gegeben und die Proteine über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällten Proteine werden sedimentiert (5 min, 4 °C, 10.000 \times g) und das Zellsediment luftgetrocknet. Anschließend wird das Sediment in 60 μL PBS und 1 \times Laemmli Puffer gelöst und bei 95 °C 10 min schüttelnd inkubiert. Die Proben können nachfolgend elektrophoretisch analysiert werden.

2.2.3.8. Aha1-Antigen-Aufreinigung aus Bakterien

Für die Herstellung eines Aha1-spezifischen Antikörpers wird eine Legehennen mit Aha1-Antigen immunisiert. Das Antigen wird durch die Expression von Aha1 in Bakterien und die anschließende Aufreinigung gewonnen. Das Aha1-Antigen ist N-terminal Polyhistidin-markiert (His₁₀), was zur Aufreinigung durch Affinitätschromatographie dient. Hierbei werden die His₁₀-markierten Proteine an den Nickel-Chelatkomplex der *Ni-NTA-beads* nicht-kovalent gebunden.

Zunächst werden *E. coli* BL21 (DE3) [pAPIacI^Q] (Schlüter et al., 2000) mit dem Expressionsplasmid pJC57-Aha1 transformiert (s. 2.2.2.7.). Anschließend werden 100 mL Cy-

cle Grow LB-Medium, versetzt mit $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin, $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin und $0,1 \%$ Glucose, mit einer transformierten Bakterienkolonie bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Luftzufuhr schüttelnd inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wird überwacht und bei Erreichen einer OD_{600} von $0,1$ wird der Bakteriensuspension $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid) hinzugefügt, wodurch die Expression von $(\text{His}_{10})::\text{Aha1}$ induziert wird. Nach 2 h wird die Bakteriensuspension sedimentiert (20 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $5.000 \times \text{g}$), das Sediment in 20 mL PBS (pH $7,4$) aufgenommen und erneut sedimentiert (20 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $3.220 \times \text{g}$). Das Sediment wird in 20 mL Puffer 1 resuspendiert und durch sechsmaliges sonifizieren (20 s , 45% Output) werden die Bakterien aufgeschlossen. Anschließend wird erneut sedimentiert (30 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $5.000 \times \text{g}$) und das Sediment in 10 mL Puffer 2 aufgenommen. Der Überstand enthält die löslichen Zellbestandteile und wird bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Das in Puffer 2 aufgenommene Sediment wird 60 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ rollend inkubiert und erneut sedimentiert (30 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $5.000 \times \text{g}$). Der Überstand enthält die extrahierten Proteine, die durch Affinitätschromatographie durch Spülen unter aufsteigender Imidazol-Konzentration aufgereinigt werden.

Zur Äquilibrierung des Säulenmaterials werden 10 mL *His Bind Resin* (Novagen) auf eine Säule gegeben und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durch Rollen gemischt. Nachdem der Aufbewahrungspuffer abgelassen wurde, werden 10 mL Nickelsulfat-Lösung hinzugefügt und für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Nickelsulfat wird abgelassen und es werden 10 mL B5 Puffer auf die Säule gegeben (Durchflussrate $0,5 \text{ mL min}^{-1}$). Währenddessen werden 200 mL B5 in einem Becherglas bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Magnetprüher vorgelegt und der Überstand mit den extrahierten Proteinen tropfenweise unter Rühren hinzugegeben, wodurch diese zurückgefaltet werden. Anschließend wird das Reservoir der Säule mit 25 mL verdünnter Proteinlösung befüllt (Durchflussrate 1 mL min^{-1}). Ein Teil der Probe wird als Kontrolle aufgefangen (‚Durchfluss‘). Im Anschluss wird der Rest mit 10 mL B5 gewaschen, wobei erneut ein Teil als Kontrolle dieses Waschschrittes aufgefangen wird (‚W1‘). Danach wird mit 5 mL B100 gewaschen und erneut ein Teil aufgefangen (‚W2‘), um diesen Waschschritt zu kontrollieren. Zuletzt wird mit 10 mL B1000 eluiert und $10 \times 1 \text{ mL}$ aufgefangen (Euate). Die Proben werden bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und können elektrophoretisch untersucht werden.

2.2.3.9. Dialyse von Proteinlösungen

Aufgereinigte Aha1-Antigene müssen vor der Immunisierung von Legehennen dialysiert werden. Hierbei werden *E. coli*- und andere störende Komponenten durch einen konzentrationsgetriebenen Membranprozess aus der Proteinlösung entfernt.

Zunächst wird ein Dialyseschlauch (MWCO 6-8 kD) in ddH₂O aufgekocht und anschließend mit dem rekombinanten Protein befüllt. Der Schlauch wird mit zwei Klammern verschlossen, wobei eine Klammer als Magnetrührstab dient. Es werden 500 mL PBS (pH 7,4) bei 4°C vorgelegt und der Schlauch darin 1 h rührend inkubiert. Nach Wechseln des PBS wird erneut 1 h rührend bei 4 °C inkubiert. Die dialysierten rekombinanten Proteine werden zu 1 mL aufgeteilt und bei -70 °C eingefroren.

2.2.3.10. Immunisierung von Legehennen und IgY-Extraktion aus einem Dotter

Legehennen werden für die Produktion von Antikörpern verwendet. Hierbei werden den Legehennen dialysierte Antigene injiziert, sodass Antikörper gegen diese produziert werden. Die Antikörper werden aus dem Dotter der gelegten Eier aufgereinigt.

Vor der eigentlichen Immunisierung muss der Präimmunstatus der Legehenne festgestellt werden, um kreuzreagierende Antikörper auszuschließen. Dafür werden zunächst Zelllysate und rekombinantes Protein elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem Western Blot folgt der immunologische Nachweis mit aus Hühnereiern gewonnenem Präimmun IgY (s. unten). Wenn sich keine Kreuzreaktion zwischen Zelllysate und Präimmun IgY ergibt, kann die Legehenne für die Antikörpergewinnung genutzt werden. Hierfür wird die Legehenne mit 500 µg rekombinant exprimiertem, dialysiertem Protein, welches 1:1 mit *TiterMax Gold* Adjuvans (Sigma-Aldrich) gemischt wird, immunisiert. Zehn bis 14 Tage nach der ersten Immunisierung erfolgt eine zweite Immunisierung und nach weiteren 14 Tagen können die Eier zur Antikörpergewinnung genutzt werden.

Zunächst wird das Eigelb vom Eiweiß getrennt und mit ddH₂O gespült. Die Dotterhaut wird vorsichtig entfernt, das Eigelb in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Kalium-Phosphatpuffer vermischt. Nach erneuter Zugabe von 1 Vol Kalium-Phosphat-

puffer, versetzt mit 7 % PEG 6000, erfolgt eine Inkubation von 30 min rollend bei 4 °C zur Fällung der Lipide. Das Präzipitat wird sedimentiert (10 min, 4 °C, 16.000 × g) und der Überstand durch Mull und Faltenfilter in ein neues Reaktionsgefäß filtriert. Anschließend werden 10 % w/v PEG 6000 (Endkonzentration 12 %) zum Filtrat gegeben und erneut rollend zur Fällung der Antikörper inkubiert. Eine erneute Sedimentation erfolgt (10 min, 4 °C, 16.000 × g), das Sediment wird in 10 mL Kalium-Phosphatpuffer gelöst und es wird 1 Vol Kalium-Phosphatpuffer mit 24 % PEG 6000 hinzugegeben. Die Antikörper werden erneut gefällt und sedimentiert (10 min, 4 °C, 16.000 × g) und das Sediment in 5 mL Kalium-Phosphatpuffer resuspendiert. Ungelöste Substanzen werden durch Sedimentation (30 min, 4 °C, 16.000 × g) vom Überstand getrennt. Der klare Überstand wird anschließend als Antikörperlösung verwendet. Zur Konservierung werden 0,02 % Natriumazid hinzugegeben und die Antikörperlösungen bei -70 °C gelagert. Die Qualitätsprüfung erfolgt durch eine Immunblot-Analyse mit Zelllysaten und rekombinantem Protein.

2.2.3.11. Zellfraktionierung

Bei der Zellfraktionierung werden die Bestandteile einer Zelle durch eine zwei-Schritt Digitonin-Lyse in die zytosolische, die intermediäre und die mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Hiermit lassen sich Proteine lokalisieren. Digitonin ist ein Steroidsaponin und dient der Permeabilisierung von Zellmembranen sowie der Solubilisierung von Membranproteinen.

Hierfür werden 1×10^8 Zellen einer stationär wachsenden *L. donovani* Promastigotenkultur sedimentiert (10 min, 4 °C, 1.250 × g) und dreimal in 15 mL kaltem MES-Puffer gewaschen. Das Zellsediment wird in 0,1 mL kaltem MES-Puffer resuspendiert und mit 1 Vol MES-Puffer mit 2 mg mL⁻¹ Digitonin, 1 µM PMSF und 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin vermischt. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 5 min bei RT. Die Probe wird sedimentiert (5 min, 4 °C, 10.000 × g) und der Zellüberstand als zytosolische Fraktion abgenommen. Das Zellsediment wird in 0,1 mL MES-Puffer mit 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0), 3 mM EDTA sowie 2 mg mL⁻¹ Digitonin resuspendiert und anschließend für 3 s bei 50 W sonifiziert. Die Probe wird erneut sedimentiert (5 min, 4 °C, 10.000 × g) und der Zellüberstand als intermediäre Fraktion abgenommen. Das Zellsediment wird in 0,1 mL MES-Puffer mit 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) resus-

pendiert und als mitochondriale Fraktion gesammelt. Für die Proteinanalyse werden 4 Vol eiskaltes Aceton zu den Proben gegeben und die Proteine über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die gefällten Proteine werden sedimentiert (5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10.000 \times g$) und das Zellsediment luftgetrocknet. Anschließend wird das Sediment in $20\text{ }\mu\text{L}$ PBS (pH 7,4) und $1 \times$ Laemmli Puffer gelöst und bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min schüttelnd inkubiert. Die Proben können nachfolgend elektrophoretisch analysiert werden.

2.2.3.12. Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation dient als Nachweis HA-markierter Proteine sowie von deren Interaktionspartnern. Es werden *Pierce anti-HA magnetic beads* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip der Methode ist, dass anti-HA Antikörper an die Magnetpartikel gekoppelt sind, die HA-markierte Proteine erkennen und binden.

Hierfür werden 1×10^8 Zellen einer spät-logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur sedimentiert (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1.250 \times g$) und zweimal in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Für die Kreuzvernetzung von Proteinkomplexen werden die Zellen mit $0,5\text{ mM}$ Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) behandelt und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird anschließend durch die Zugabe von 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) und einer Inkubation von 15 min bei RT gestoppt. Die kreuzvernetzten Proben werden sedimentiert (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1.250 \times g$), das Sediment in $300\text{ }\mu\text{L}$ Lysepuffer aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert, wobei die Zellsuspension während der Inkubation mehrmals gemischt wird. Die Zellsuspension wird erneut sedimentiert (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $16.100 \times g$) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Waschpuffer auf ein Endvolumen von $450\text{ }\mu\text{L}$ aufgefüllt. Hierbei werden $50\text{ }\mu\text{L}$ des Zelllysats entnommen (*input*-Fraktion). Die entnommene *input*-Fraktion wird mit 1 Vol $2 \times$ Laemmli Puffer versetzt und bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min schüttelnd inkubiert. Das kreuzvernetzte Proteingemisch wird mit $50\text{ }\mu\text{L}$ äquilibrierten anti-HA Magnetpartikeln für 2 h bei RT gemischt. Das Äquilibrieren und Waschen der Magnetpartikel sowie die Elution der kreuzvernetzten Immunkomplexe (*bound*-Fraktion) erfolgt gemäß Herstellerangaben. Die dissoziierten Immunkomplexe werden anschließend mit $1/10$ DTT versetzt und 10 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Die Proben können nachfolgend elektrophoretisch analysiert werden, wobei jeweils $20\text{ }\mu\text{L}$ der *input*- und *bound*-Fraktion eingesetzt werden.

2.2.4. Mikroskopische Methoden

2.2.4.1. Lichtmikroskopie

Die Morphologie sowie das Wachstum der Parasiten wird regelmäßig lichtmikroskopisch verfolgt. Dazu werden die Parasiten am Lichtmikroskop EVOS XL *Cell Imaging System* betrachtet.

2.2.4.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie dient der Untersuchung angefärbter Moleküle und DNA-haltigen Organellen, wie dem Nukleus oder dem Kinetoplasten. Hierfür wird der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) genutzt.

Promastigote Parasiten werden wie in 2.2.1.10. beschrieben auf einem Objektträger fixiert. Durch dreimaliges Waschen (jeweils 3 min) in Waschlösung werden nicht-adhärente Zellen entfernt. Anschließend werden die Objektträger in eine Feuchtkammer überführt und durch eine 20-minütige Inkubation in Permeabilisierungslösung werden die Zellmembranen permeabilisiert. Zur Blockierung aller freien Bindestellen werden die Zellen 1 h in Blockierungslösung inkubiert. Danach werden die Zellen mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper für 1 h behandelt. Es folgt ein dreimaliges Waschen in Waschlösung (jeweils 3 min) und die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in Blockierungslösung) und DAPI (1:50 in Blockierungslösung). Anschließend folgt erneut ein dreimaliges Waschen in Waschlösung und zum Eindeckeln wird der Objektträger mit einem Tropfen Mowiol Eindeckmedium und einem Deckglas versehen. Die Objektträger werden über Nacht bei 4 °C und im Dunkeln zum Trocknen gelagert. Das Mikroskopieren erfolgt mit dem EVOS FL Auto *Cell Imaging System*.

2.2.5. Datenverarbeitung

2.2.5.1. Bildbearbeitung

DNA und Proteinanalysen werden mit der Software MacVector 15.1.4 durchgeführt. Agarosegele werden unter UV-Licht ausgeleuchtet und digitalisiert. Die Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Polyacrylamid-Gele sowie Immunblots werden mit einem Flachbettscanner (Epson *Perfection V700 Photo*) digitalisiert. Die Messung der Zellkörper- und Flagella-Längen werden mit Hilfe der Messfunktion der Software des EVOS FL Auto vorgenommen. Alle Graphen werden mit der Software Prism 5.0a erstellt. Aufnahmen werden mit der Software Adobe Photoshop CS3 *Extended* 10.0.1 bearbeitet. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgt mit der Software Intaglio 3.9.4.

2.2.5.2. Statistische Auswertung

Für die Berechnung der Signifikanzen wird entweder der gepaarte Student's *t*-Test durchgeführt (Student, 1908) oder der Mann-Whitney *U*-Test (Mann und Whitney, 1947). Die Quantifizierung von Proteinbanden erfolgt mit der Software Image J 1.49v. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in der Legende der jeweiligen Abbildung angegeben (n).

3. Ergebnisse

3.1. Erzeugung eines Aha1-spezifischen Antikörpers

Die detaillierte funktionelle Analyse des putativen *L. donovani* Co-Chaperons Aha1 war Gegenstand dieser Arbeit. Durch einen Abgleich mit der *Leishmania* Genom-Datenbank (TriTrypDB) ergab sich ein Aha1-Ortholog in *L. donovani* (Ld.18.0210), das untersucht wurde. Um diese Analyse durchzuführen, war es zunächst nötig einen spezifischen Antikörper herzustellen. Anti-Aha1 Antikörper wurden aus dem Dotter immunisierter Hühner gewonnen (Polson et al., 1985).

3.1.1. Herstellung des rekombinanten Aha1

Um rekombinantes Aha1-Antigen für die Immunisierung von Hühnern herzustellen, mussten zunächst die Aha1-codierenden Sequenzen in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt werden. Hierfür wurde der bakterielle Expressionsvektor pJC57 gewählt, der über einen T7-Promotor unter Lac (Lactose)-Kontrolle verfügt, wodurch Proteine in großen Mengen durch Induktion mit dem Lactose-Analogon IPTG in *E. coli* exprimiert werden können (Schlüter et al., 2000; Studier et al., 1990). Außerdem codiert der Vektor für eine (His)₁₀-Sequenz zur späteren Aufreinigung durch Nickelaffinitätschromatographie. Diese Arbeiten wurden von A. Hombach-Barrigah (BNITM, Hamburg) durchgeführt.

Hierzu wurden *E. coli* BL21 (DE3) [pAPlacI^Q] (Schlüter et al., 2000) mit dem Expressionsplasmid pJC57-Aha1 transformiert. Die Expression des Antigens wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Bakterien wurden durch Ultraschall und durch die Zugabe von Harnstoff aufgeschlossen. Dabei zeigte sich, dass das Aha1-Antigen überwiegend Einschlusskörperchen in der Zelle bildete und nicht im löslichen Überstand vorlag. Anschließend wurde das rekombinante Protein rückgefaltet und durch Nickelaffinitätschromatographie unter aufsteigender Imidazol-Konzentration aufgereinigt. Die rückgefalteten und aufgereinigten Antigene wurden danach gegen PBS dialysiert (Daten nicht gezeigt).

3.1.2. Antikörpergewinnung und Western Blot-Analyse

Für die Gewinnung von spezifischen Aha1-Antikörpern wurden zunächst Legehennen mit gereinigtem Antigen immunisiert. Nach ca. zwei Wochen wurden Aha1-Antikörper aus dem Dotter der gelegten Eier aufgereingt. Diese wurden anschließend in einer Western Blot-Analyse auf ihre Spezifität in Trypanosomatida-Lysaten untersucht.

In Abb. 3 ist zu erkennen, dass der Antikörper spezifisch an das Aha1-Antigen in *L. major* 5ASKH und *L. donovani* 1SR Lysaten gebunden hat und Aha1 ein Laufverhalten wie Markerproteine mit einer Größe von ca. 42 kD zeigt. Der anti-Aha1 Nachweis in *Trypanosoma (T.) cruzi* Y und *T. cruzi* Tulahuen Lysaten ergab ein unspezifisches Bandenmuster. Durch den Vergleich mit dem Proteinmarker ließ sich für das (His)₁₀::Aha1 ein markiertes Protein mit einer Größe von ca. 45 kD bestimmen. Die Größe des markierten Proteins kommt durch die N-terminale Polyhistidin-Markierung von Aha1 zustande. Das bedeutet, dass anti-Aha1 Antikörper Aha1 spezifisch in *Leishmania*-Lysaten erkennen und das Protein eine Größe von ca. 42 kD aufweist.

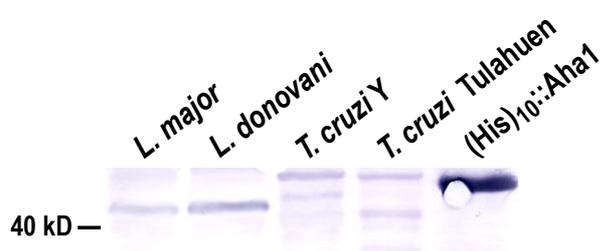


Abb. 3: Anti-Aha1 Antikörpertestung in Trypanosomatida-Lysaten

Lysate (2×10^7 Zellen) von *L. major* 5ASKH, *L. donovani* 1SR, *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Tulahuen sowie rekombinantes (His)₁₀::Aha1 aus *E. coli* wurden einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse unterzogen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit isoliertem anti-Aha1 IgY (1:200).

Der Antikörper erkannte das Aha1-Ortholog in *Trypanosoma*-Lysaten nicht. Dies ist auf die niedrige Konservierung des Proteins zurückzuführen. Ein Sequenzvergleich von *L. donovani* und *L. major* ergab eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 95 %. Die Aminosäuresequenzen von *L. donovani* und *T. cruzi* hingegen stimmten nur zu 55 % überein (Abb. 4).

tifiziert. Abb. 5C zeigt die relative Proteinkonzentration von Aha1 über einen Verlauf von zehn Tagen. Es waren Schwankungen von $\pm 0,5$ in der relativen Aha1-Proteinkonzentration zu erkennen. Allerdings wurde Aha1 relativ zum totalen Proteingehalt gesehen, gleichmäßig über den *in vitro* Lebenszyklus exprimiert. Es zeigte sich, dass der Differenzierungsprozess von *L. donovani* keinen Einfluss auf die Expression von Aha1 hat.

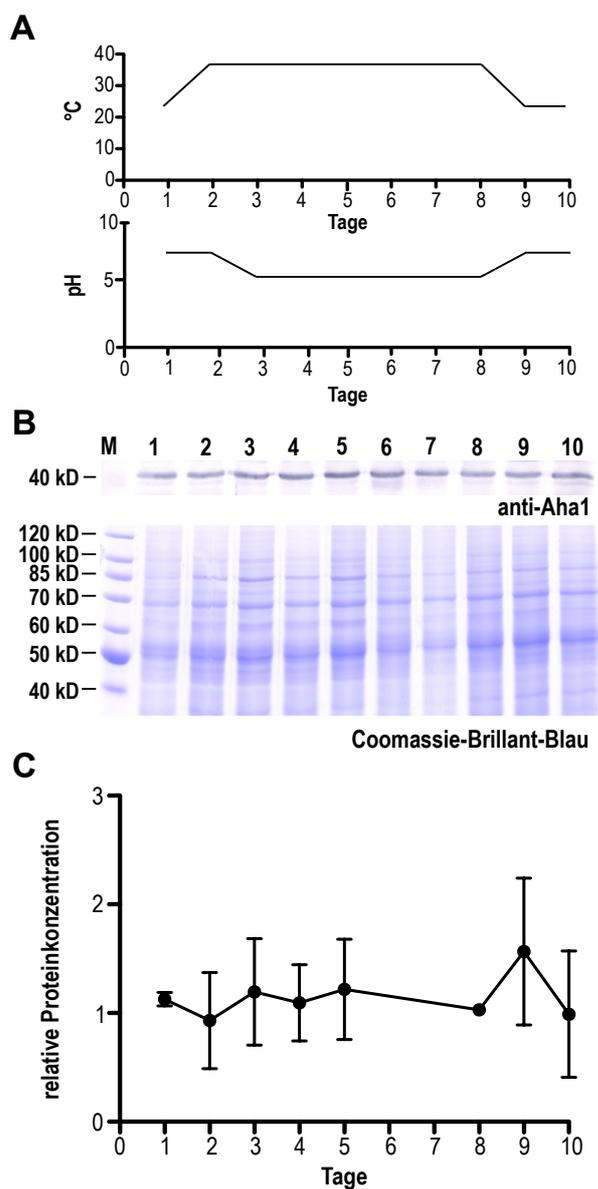


Abb. 5: Expressionskinetik während der Stadiendifferenzierung

Promastigote *L. donovani* wurden durch Änderung der Temperatur und des pH-Wertes (**A**, Temperatur- und pH-Profil) über einen Verlauf von zehn Tagen zu axenischen Amastigoten und zurück in Promastigote umgewandelt. Täglich wurden 5×10^6 Zellen der Kultur entnommen, lysiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte der immunologische Nachweis mit anti-Aha1 (**B**, oben). Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Brillant-Blau-Gel angefertigt (**B**, unten). Die Proteinbanden wurden mit ImageJ quantifiziert (**C**). $n = 3$, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.3. Interaktionsnachweis mittels Ko-Immünpräzipitation

Um die Funktion von Aha1 als Co-Chaperon zu analysieren, wurde die Wechselwirkung von Aha1 und Hsp90 in *L. donovani* untersucht. Der Interaktionsnachweis der beiden Proteine erfolgte mittels Ko-Immünpräzipitation bei der Proteine und Interaktionspartner aus Lysaten präzipitiert werden.

Hierfür wurde zunächst der Aha1-ORF (*open reading frame*) aus dem zuvor hergestellten pCL2S-Aha1 ausgeschnitten und in das geöffnete pCLN3HA-Plasmid integriert. Aha1 wurde dabei N-terminal an ein dreifaches HA-Epitop gekoppelt. Diese drei HA-Epitope des humanen Influenza-Virus werden vom monoklonalen Antikörper 12CA5 erkannt.

L. donovani wurden mit pCLN3HA::Aha1 transfiziert und mit G418 selektiert. Zur Überprüfung der 3HA::Aha1 Expression wurden Zellysate (5×10^6 Zellen) hergestellt, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunblot-Analyse unterzogen wurden. Als Negativkontrolle diente Zellysate von *L. donovani* Wildtyp, in dem anti-Aha1 nur das endogen-codierte Aha1 mit einer Größe von ca. 42 kD im Immunblot markiert (Abb. 6A). Das 3HA-markierte Aha1 hingegen wies eine Größe von ca. 44 kD auf und ließ sich somit vom endogen-codierten Aha1 im Zellysate der Fusionsprotein-exprimierenden Leishmanien unterscheiden. Zusätzlich war eine deutliche Überexpression von Aha1 in diesem Lysat zu erkennen. Die drei HA-Epitope wurden mittels anti-HA Antikörper in dem Ld3HA::Aha1-Zellysate nachgewiesen (Abb. 6B). Zur Ladekontrolle wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt (Abb. 6C).

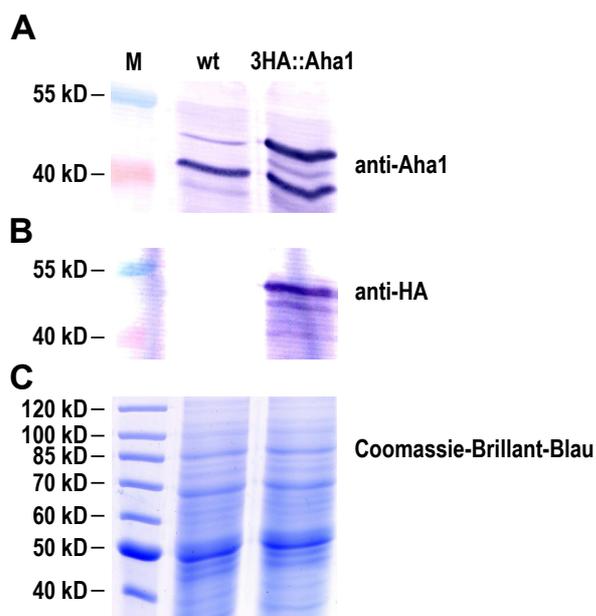


Abb. 6: Verifizierung von 3HA::Aha1 mittels Immunblot-Analyse

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt, Negativkontrolle) und Ld3HA::Aha1 (3HA::Aha1) (5×10^6 Zellen) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot und der immunologische Nachweis mit anti-Aha1 (**A**) und anti-HA Antikörpern (**B**). Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Brillant-Blau-Gel angefertigt (**C**).

Um auszuschließen, dass die N-terminale 3HA-Markierung von Aha1 Auswirkungen auf das Zellwachstum hat, wurde die Wachstumskinetik der transfizierten Parasiten überprüft. Verglichen wurde das Wachstum der transfizierten Ld3HA::Aha1 mit der Wachstumsrate von Wildtyp-Zellen. Hierfür wurden Promastigote mit einer Anfangskonzentration von 1×10^5 Zellen mL^{-1} eingesät und die Zellzahl täglich an vier aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Beide Kulturen zeigten eine vergleichbare Wachstumskinetik (Abb. 7); d. h. es war keine Beeinträchtigung des Wachstums durch die 3HA-Markierung von Aha1 zu erkennen.

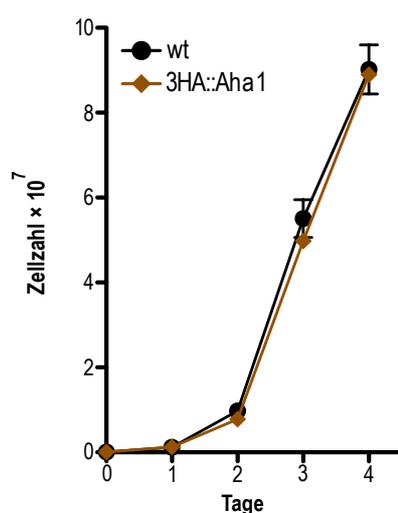


Abb. 7: Wachstumskinetik von LdWildtyp und Ld3HA::Aha1

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt) und Ld3HA::Aha1 (3HA::Aha1) wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL^{-1} eingesät und bei 25°C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Nach Verifizierung der transfizierten Parasiten wurden die Lysate in einer Immunpräzipitation mit Magnetpartikel-gekoppeltem anti-HA Antikörper eingesetzt. Für das Experi-

ment wurde als Gegenprobe *L. donovani* 3HA::Hsp90wt verwendet, der bereits verifiziert wurde (Hombach et al., 2013).

In einem ersten Versuch wurden 1×10^8 promastigote *L. donovani* Wildtyp, Ld3HA::Hsp90 und Ld3HA::Aha1 lysiert und ko-immunpräzipitiert. Es konnte keine gegenseitige Ko-Präzipitation von Aha1 und Hsp90 beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden die Parasiten vor der Lyse mit 0,5 mM DSP zur Kreuzvernetzung von Proteinkomplexen behandelt. Zelllysate wurden hergestellt und die Proteine von Zelltrümmern getrennt (*input*-Fraktion). Diese *input*-Fraktionen wurden mit anti-HA Magnetpartikeln gemischt und im Magnetfeld sedimentiert (*bound*-Fraktion). Die *input*- und *bound*-Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunblot-Analyse unterzogen. Der immunologische Nachweis der Ko-Immunitätspräzipitation erfolgte mit anti-Aha1 oder anti-Hsp90 Antikörpern.

Der anti-Aha1 Antikörper erkannte in allen *input*-Fraktionen das endogen-codierte Aha1, in der Ld3HA::Aha1-Probe zusätzlich das 3HA-markierte Aha1 (Abb. 8A). Zudem war eine Überexpression von 3HA::Aha1 zu erkennen. Der Nachweis mit anti-Hsp90 zeigte ein ähnliches Bild für Hsp90: Das endogen-codierte Hsp90 mit einer Größe von 90 kD wurde in allen Proben nachgewiesen; das 3HA-markierte Hsp90 mit einer Größe von ca. 100 kD dagegen nur in der Ld3HA::Hsp90-Probe (Abb. 8B).

In der *bound*-Fraktion der Negativkontrolle (Wildtyp-Zelllysate) ließ sich weder Aha1 noch Hsp90 nachweisen. Die *bound*-Fraktion der Ld3HA::Aha1-Probe wies hingegen eine durch den anti-Aha1 Antikörper markierte Bande für 3HA::Aha1 auf, nicht jedoch eine Bande für Aha1, was die Spezifität der Immunpräzipitation belegte (Abb. 8A). Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass Aha1 keine Homodimere ausbildet. Außerdem konnte in der *bound*-Fraktion der Ld3HA::Aha1-Probe Hsp90 nachgewiesen werden (Abb. 8B, schwarzer Pfeil). Dieses Ergebnis deutet auf eine Kreuzvernetzung und damit auf einen engen Kontakt zwischen Aha1 und Hsp90 hin.

Umgekehrt führte die Präzipitation von HA-markiertem Protein in der Ld3HA::Hsp90-Probe (Abb. 8A) nicht zur Ko-Präzipitation von Aha1. Das bedeutet, dass es keine Interaktion zwischen Aha1 und 3HA::Hsp90 gibt. Dagegen waren in der *bound*-Fraktion der Ld3HA::Hsp90-Probe sowohl 3HA::Hsp90 als auch Hsp90 zu erkennen (Abb. 8B), wie bereits beschrieben (Hombach et al., 2013).

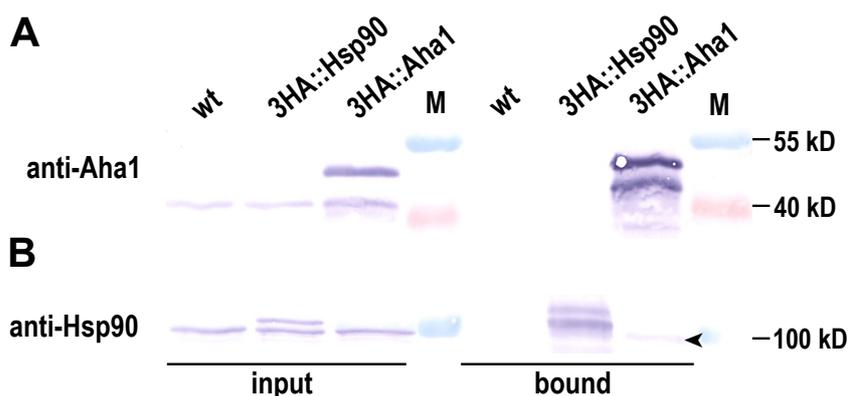


Abb. 8: Ko-Immünpräzipitation von Aha1 und Hsp90

1×10^8 promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt), Ld3HA::Hsp90 (3HA::Hsp90) und Ld3HA::Aha1 (3HA::Aha1) wurden mit DSP zur Kreuzvernetzung von Proteinkomplexen behandelt und anschließend lysiert. Zelltrümmer wurden entnommen und die Proteine (*input*-Fraktion) mit anti-HA Magnetpartikeln gemischt und im Magnetfeld sedimentiert (*bound*-Fraktion). *Input*- und *bound*-Fraktion wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte der immunologische Nachweis mit anti-Aha1 (**A**) oder anti-Hsp90 (**B**) Antikörpern. Der schwarze Pfeil zeigt die 3HA::Aha1-anti-Hsp90 spezifische Bande.

3.4. Subzelluläre Lokalisation von Aha1

Die subzelluläre Lokalisation von Aha1 sollte zunächst durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung der anti-Aha1 Antikörper erfolgen. Es konnte jedoch keine ausreichend spezifische Bindung des Antikörpers in *L. donovani* beobachtet werden (Daten nicht dargestellt), sodass der Aha1-Antikörper nicht für die Lokalisation durch Immunfluoreszenz verwendet werden konnte.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Aha1 in Promastigoten wurde daher eine Zellfraktionierung durchgeführt. Hierbei wird die Zelle in drei Fraktionen aufgeteilt: in die zytosolische, die intermediäre und die Organell-enhaltende (mitochondriale) Fraktion. Die Proteine, die in diesen Fraktionen enthalten sind, können anschließend mit Hilfe einer Western Blot-Analyse identifiziert werden. Für die Lokalisation durch Zellfraktionierung wurden 1×10^8 promastigote *L. donovani* einer zwei-Schritt Digitonin-Lyse unterzogen, wodurch Zellmembranen permeabilisiert und Membranproteine gelöst wurden. Diese Extrakte wurden anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Zusätzlich wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau zur Ladekontrolle angefärbt (Abb. 9D). Abb. 9A zeigt, dass Aha1 hauptsächlich in der zytosolischen (zyt) Fraktion der Zelle zu finden war. Das-

selbe Ergebnis zeigte sich auch für Hsp90 (Abb. 9B). Cpn60.2, als Marker für die mitochondriale (mit) Fraktion (Schlüter et al., 2000), bestätigte die Fraktionierung (Abb. 9C). Daraus ergibt sich, dass *L. donovani* Aha1 im Zytosol der Promastigoten zu finden ist.

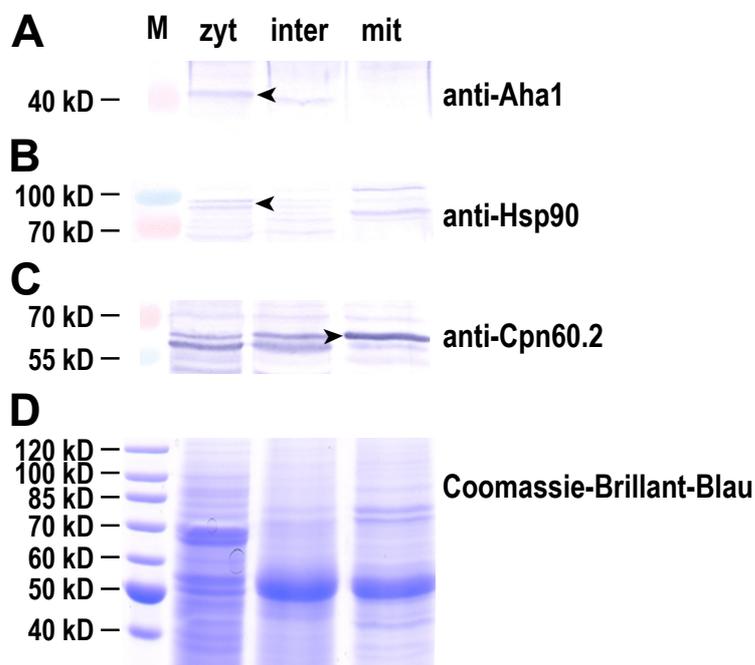


Abb. 9: Subzelluläre Lokalisation von Aha1 in Promastigoten

Promastigote *L. donovani* (1×10^8) wurden durch eine zwei-Schritt Digtinin-Lyse in die zytosolische (zyt), intermediäre (inter) und mitochondriale (mit) Fraktion aufgeteilt. Die Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse mit anti-Aha1 (A), anti-Hsp90 (B) oder anti-Cpn60.2 (C) unterzogen. Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Brillant-Blau-Gel angefertigt (D). Die schwarzen Pfeile zeigen die anti-Aha1, anti-Hsp90 und anti-Cpn60.2 spezifischen Banden.

3.5. Aha1-Nullmutanten, Herstellung und Verifizierung

Eine Strategie Aha1 in *L. donovani* Parasiten zu analysieren, ist die Charakterisierung von Nullmutanten ($^{-/-}$). Durch das gezielte Ausschalten eines Gens können Veränderungen im Parasiten darauf zurückgeführt und so die Rolle und Funktion des Gens ermittelt werden. Die Gen-Austauschmutanten wurden durch homologe Rekombination erzeugt. Die Mutanten wurden anschließend auf den korrekten Austausch von Aha1 auf DNA-, mRNA- und Protein-Ebene verifiziert.

3.5.1. Herstellung der Aha1-Nullmutanten

Durch zwei aufeinanderfolgende homologe Rekombinationsschritte (Cruz und Beverley, 1990; Cruz et al., 1991; Ommen et al., 2009) erfolgte die Erzeugung von Aha1-Nullmutanten ($Aha1^{-/-}$). Dabei wurden die Aha1-Allele durch zwei Selektionsmarker ersetzt. Dies waren das *bleomycin resistance protein* (BleoR), das Resistenz gegenüber Bleomycin verleiht sowie die Puromycinacetyltransferase (PuroAC), die Resistenz

gegenüber Puromycin vermittelt. Die Selektionsmarkergene wurden zwischen nicht-codierenden (NC) Bereichen des Aha1-Gens platziert und in das pUC19-Plasmid ligiert. Dieses Konstrukt wurde linearisiert und durch Elektroporation in *L. donovani* Wildtyp transfiziert.

Aha1 (Ld.18.0210) liegt in nur einer Kopie pro haploidem Chromosomensatz vor. Es wurden ca. 1.000 bp der 5'NC und 3'NC Aha1-DNA mittels PCR von genomischer *L. donovani* DNA amplifiziert. Die Oligonukleotide, die für diese Amplifikation genutzt wurden, fügten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *BamHI* zwischen 5'NC und 3'NC Bereich ein. Zusätzlich wurde das Konstrukt von zwei *SwaI*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Die 5'NC und 3'NC Amplifikate wurden mit Ligasen verknüpft und das Ligationsprodukt in den Klonierungsvektor pUC19 integriert. Daraus resultierte pUC-Aha1-5'-3'NC, der mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BamHI* geöffnet wurde. Die Selektionsmarkergene, Bleomycin und Puromycin, wurden jeweils zwischen die Aha1-flankierenden Sequenzen ligiert. Die entstandenen Plasmide sind in Abb. 10A (pUC-Aha1-5'-bleo3' und pUC-Aha1-5'-puro3') dargestellt. Anschließend wurden die DNA-Konstrukte mit *SwaI* linearisiert und für die Transfektion genutzt.

L. donovani Wildtyp wurde mit einem Selektionsmarkergen transfiziert. Wie in Abb. 10B dargestellt, wurde ein Aha1-Allel durch Bleomycin ersetzt und es entstanden Einzelallel-Genaustauschmutanten (Aha1^{-/+}), die mit Bleocin selektiert wurden. Durch *limiting dilution* wurden Einzelklone aus der Mischpopulation erhalten. Diese Klone wurden durch PCR-Analyse auf die Integration des Bleomycingens getestet. Dabei wurde die 5'- und 3'-BleoR-Integrations-PCR so durchgeführt, dass nicht nur das für Bleomycin-codierende Gen nachgewiesen wurde, sondern auch der Übergang zum 5'NC und 3'NC Aha1 amplifiziert wurde. Zehn Einzelallel-Genaustauschmutanten konnten überprüft werden (Daten nicht dargestellt).

Ein Aha1^{-/+} Einzelklon wurde mit dem zweiten Selektionsmarkergen, Puromycin, transfiziert (Abb. 10B). Die Population wurde mit Bleocin und Puromycin selektiert und durch *limiting dilution* wurden Doppelallel-Genaustauschmutanten (Aha1^{-/-}) erhalten. Die Verifizierung dieser wird in 3.7.2. - 3.7.4. beschrieben.

Zudem wurden Genaustauschmutanten mit *gene add back* Hintergrund hergestellt. Diese komplementieren die Nullmutante durch die episomale Expression des Gens und der Phänotyp sollte sich wieder dem des Wildtyps angleichen. Daher wurde ein Aha1^{-/+}-

Klon mit dem Expressionsplasmid pCL2N-Aha1 (von A. Hombach-Barrigah, BNITM, Hamburg, hergestellt) transfiziert. Die Aha1^{-/+}-Population wurde in einem zweiten Schritt mit Puromycin transfiziert. Die entstandene Mischpopulation wurde mit Bleocin, Puromycin und G418 selektiert und durch *limiting dilution* vereinzelt. Genaustauschmutanten mit *gene add back* Hintergrund (Aha1^{-/+}) wurden gewonnen und überprüft (s. 3.7.2. - 3.7.4.).

Es wurden zusätzlich Mutanten hergestellt, die eine Überexpression von Aha1 aufweisen. Hierfür wurde *L. donovani* mit pCL2N-Aha1 transfiziert und mit G418 selektiert. Diese Aha1-überexprimierenden Parasiten (Aha1^{+/+}) wurden ebenfalls verifiziert (s. 3.7.2. - 3.7.4.).

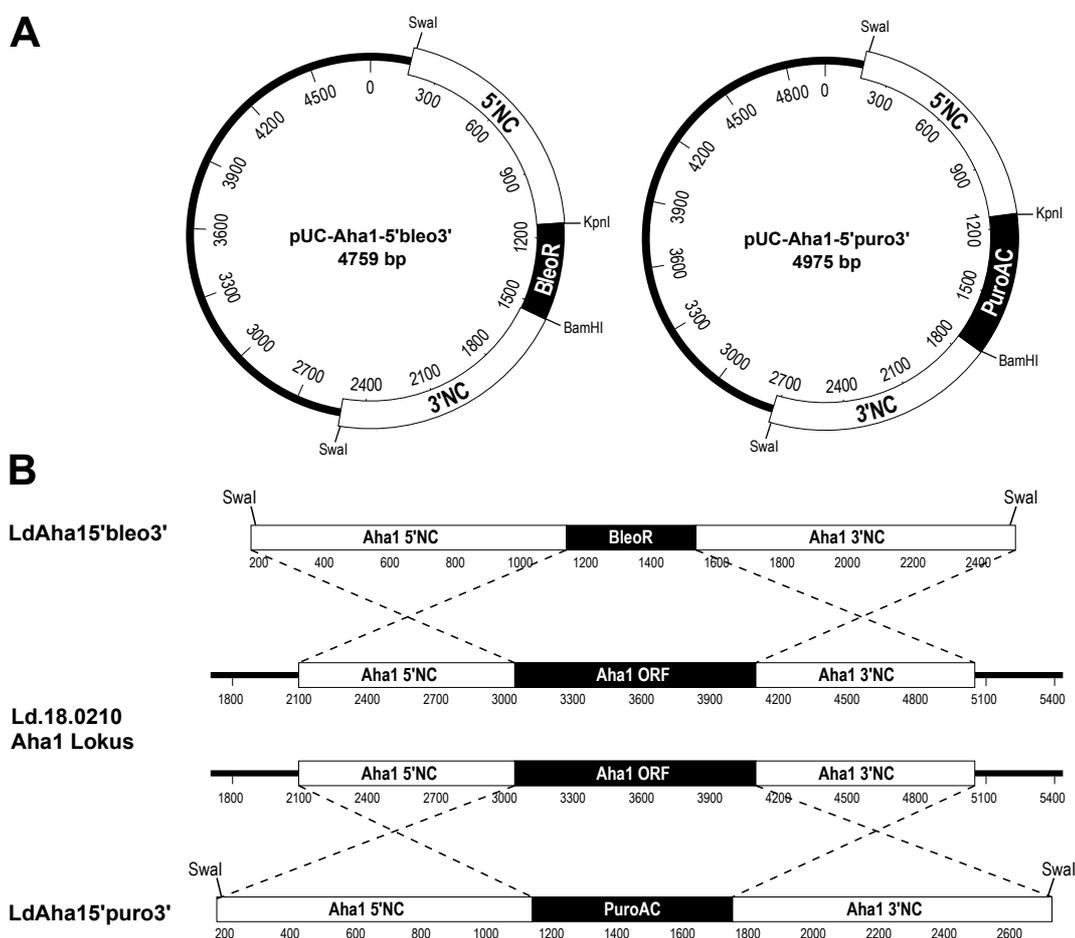


Abb. 10: Schematische Darstellung der Klonierungskonstrukte

Dargestellt sind die Plasmidkonstrukte für die Aha1 Gen-Austauschmutanten (**A**) sowie eine schematische Darstellung der SwaI-linearisierten Austauschkonstrukte (LdAha15'bleo3' und LdAha15'puro3') und der Aha1-Allele (Ld.18.0210 Aha1 Lokus) (**B**).

3.5.2. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf DNA-Ebene

Die lebensfähigen Doppelallel-Genaustauschmutanten ($Aha1^{-/-}$) und Genaustauschmutanten mit *gene add back* Hintergrund ($Aha1^{-/+}$) wurden zunächst auf DNA-Ebene mittels PCR auf die Deletion des Aha1-ORF und die korrekte Integration der Selektionsmarkergene überprüft.

Genomische DNA von Einzelklonen der Doppelallel-Genaustauschmutanten und der Genaustauschmutanten mit *gene add back* Hintergrund sowie Wildtyp-gDNA ($Aha1^{+/+}$) wurde isoliert. Mittels PCR wurden diese Klone überprüft. Abb. 11 stellt schematisch dar an welchen Positionen die Oligonukleotide zur Verifizierung der Mutanten an die DNA-Konstrukte anlagern. Tab. 10 zeigt das Ergebnis der PCR-Analysen mit *L. donovani* $Aha1^{+/+}$, $Aha1^{-/-}$ Klon 2 sowie $Aha1^{-/+}$ Klon 5 gDNA und die Größen der entstandenen PCR-Produkte.

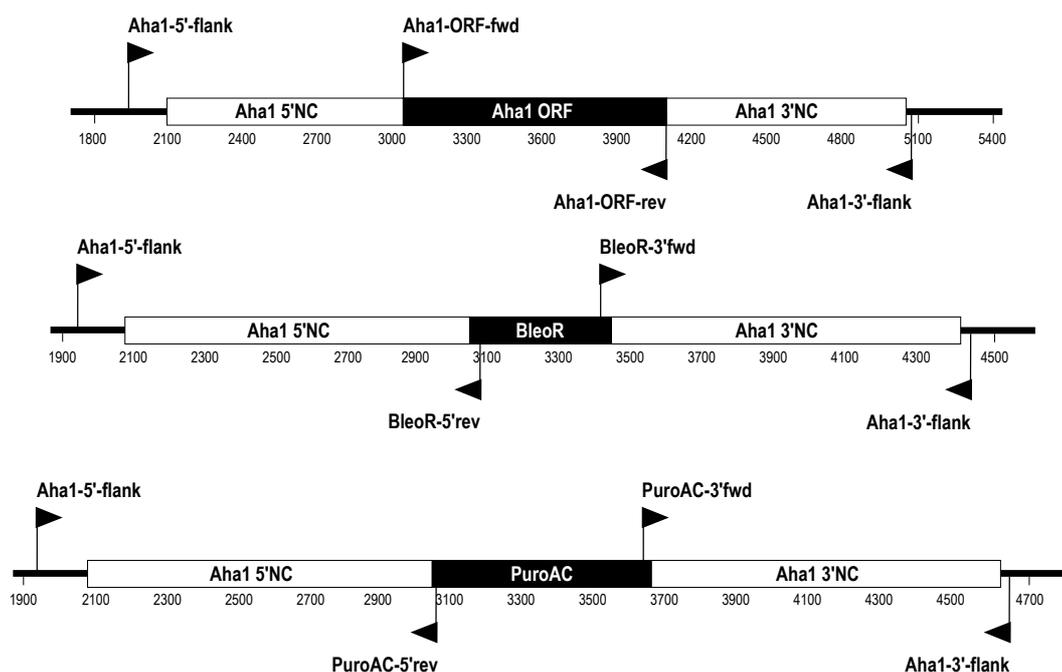


Abb. 11: Schematische Darstellung der Klonierungskonstrukte und Oligonukleotide zur Verifizierung der Nullmutanten

Schematisch dargestellt sind Bindungspositionen der Oligonukleotide zur Verifizierung der Doppelallel-Genaustauschmutanten und der Genaustauschmutanten mit *gene add back* Hintergrund.

Zunächst wurde die Qualität der isolierten gDNA getestet, indem eine PCR mit Hsp23-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt wurde. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel aufgetrennt und mittels

UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 12, unten). Die PCR war positiv für alle isolierten gDNA-Proben und ergab ein Produkt mit der erwarteten Größe von 630 bp.

Eine Aha1-spezifische PCR mit Oligonukleotiden, die innerhalb des Aha1-ORFs gebunden haben, ergab ein Produkt mit einer Größe von 1056 bp für Aha1^{+/+} und Aha1^{-/-}. Es gab kein Produkt für Aha1^{-/-} (Abb. 12, oben); d. h. das Aha1-Gen war nicht mehr nachweisbar.

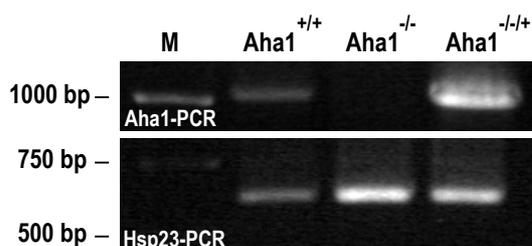


Abb. 12: Verifizierung der Aha1-Mutanten durch PCR-Analyse

Genomische DNA aus *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-+} Klon 5 wurde isoliert und als *template* in einer Aha1-ORF spezifischen (oben) sowie Hsp23-ORF spezifischen PCR (unten) eingesetzt. Die Hsp23-PCR galt dabei als Qualitätskontrolle der isolierten gDNA. Dargestellt sind Ausschnitte zweier Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegele, in denen die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Anschließend wurde die korrekte Integration der Selektionsmarkergene überprüft. Die 5'- und 3'-BleoR-Integrations-PCRs (s. 3.5.1.) waren für beide Mutanten positiv und für Wildtyp-gDNA negativ (Daten nicht gezeigt); d. h. dass das Bleomycingen an Stelle des Aha1-ORF integriert wurde. Anschließend erfolgten die 5'- und 3'-PuroAC-Integrations-PCRs. Diese waren ebenfalls positiv für Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-+}, jedoch nicht für Aha1^{+/+} (Daten nicht dargestellt). Folglich wurde auch das Puromycingen korrekt integriert. Um zwischen endogener oder episomaler Aha1-DNA des Aha1^{-/-+} zu unterscheiden, wurden Oligonukleotide verwendet, die im Vektor *back bone* gebunden haben (pIR-p-fwd und pIR-p-rev). Es ergab sich eine Amplifikation des Vektor *back bone*; d. h. Aha1 wurde ausschließlich episomal codiert.

Tab. 10: Ergebnis der PCR-Analysen zur Verifizierung der Aha1-Mutanten

Angegeben sind in der linken Spalte die jeweiligen *forward* und *reverse* Oligonukleotide, die in der PCR verwendet wurden. Als *template* wurde gDNA von Aha1^{+/+} (Wildtyp), Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-+} Klon 5 eingesetzt. Zusätzlich sind die Größen der entstandenen PCR-Produkte [bp] in der rechten Spalte angegeben.

	Aha1 ^{+/+}	Aha1 ^{-/-}	Aha1 ^{-/-+}	PCR-Produkt [bp]
Aha1-ORF-fwd - Aha1-ORF-rev	✓	-	✓	1056
Aha1-5'-flank - BleoR-5'rev	-	✓	✓	1121
BleoR-3'fwd - Aha1-3'-flank	-	✓	✓	1104
Aha1-5'-flank - PuroAC-5'rev	-	✓	✓	1115
PuroAC-3'fwd - Aha1-3'-flank	-	✓	✓	1086
pIR-p-fwd - pIR-p-rev	-	-	✓	1354
Hsp23-fwd - Hsp23-rev	✓	✓	✓	630

Die PCR-Analysen ergaben, dass der Aha1-ORF bei Klon 2 der Doppelallel-Gen austauschmutante deletiert und durch BleoR und PuroAC ersetzt wurde. Das gleiche Ergebnis galt auch für Klon 5 der Gen austauschmutante mit *gene add back* Hintergrund; bei diesem wurde Aha1 episomal codiert.

3.5.3. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf mRNA-Ebene

Die auf DNA-Ebene verifizierten Gen austauschmutanten wurden ebenfalls auf mRNA-Ebene überprüft. Hierzu wurden semi-quantitative *real-time* RT-PCRs durchgeführt.

Zunächst wurde RNA aus den Leishmanien-Kulturen *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-+} Klon 5 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA der Mutanten wurde anschließend als *template* in einer qRT-PCR eingesetzt. In einer ersten PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die spezifisch im Aha1-ORF gebunden haben, sodass die Expression von Aha1-mRNA nachgewiesen werden konnte. Die qRT-PCR mit Aha1^{-/-} ergab keine Amplifikation; d. h. die Deletion von Aha1 konnte auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 13A). Für Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-+} ergab sich eine relative mRNA-Konzentration von ca. 45, woraus man auf eine ca. 45-fache Überexpression von Aha1-mRNA im Vergleich zur Wildtyp-mRNA schließen konnte.

In einer zweiten qRT-PCR wurden Oligonukleotide eingesetzt, die spezifisch den Über-

gang von Aha1-ORF zu 3'NC amplifizieren. Mit dieser PCR konnte zwischen einer endogenen und episomalen Aha1-Expression unterschieden werden. Die qRT-PCR ergab die gleiche Aha1-Expression für Aha1^{+/+} und Aha1^{+/+/+} und keine Amplifikation für Aha1^{-/-} (Abb. 13B). Daraus ließ sich schließen, dass Aha1 hier ausschließlich episomal exprimiert wurde und Aha1^{-/-} eine Nullmutante mit *gene add back* Hintergrund war. Somit konnten alle Mutanten auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

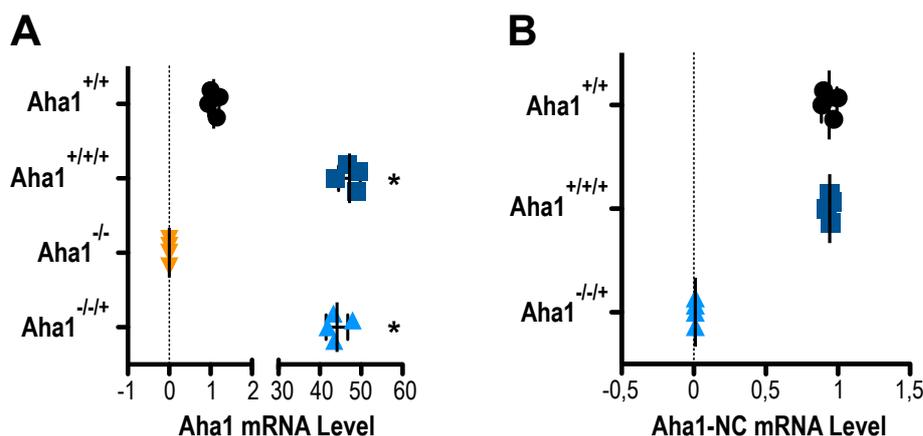


Abb. 13: Verifizierung der Aha1-Mutanten durch qRT-PCR-Analyse

RNA aus *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-/+} Klon 5 wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine Aha1-ORF spezifische qRT-PCR eingesetzt (A). Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+} Klon 5 cDNA wurde für eine qRT-PCR mit Oligonukleotiden, die den Bereich zwischen Aha1-ORF und 3'NC amplifizieren, eingesetzt (B). n = 4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * p ≤ 0,05 (U-Test).

3.5.4. Verifizierung der Aha1-Nullmutanten auf Protein-Ebene

Nach erfolgreicher Verifizierung der Genaustauschmutanten auf DNA- und mRNA-Ebene, wurden diese auf Protein-Ebene mit den Aha1-Antikörpern getestet.

Zunächst wurden Zellysate (5×10^6 Zellen) von *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-/+} Klon 5 hergestellt. Diese wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und entweder als Ladekontrolle mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt (Abb. 14A, unten) oder nach Western Blot mit anti-Aha1 quantifiziert. Wie in Abb. 14A (oben) zu erkennen ist, konnte in den Lysaten von Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+} das Protein nachgewiesen werden. Zudem spiegelte sich auch hier das Ergebnis aus der qRT-PCR wider und die Lysate von Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+} wiesen eine Aha1-Überexpression auf. Für Aha1^{-/-} ergab sich keine Bande im Immunblot; die Deletion von Aha1 konnte somit auf Protein-

Ebene bestätigt werden.

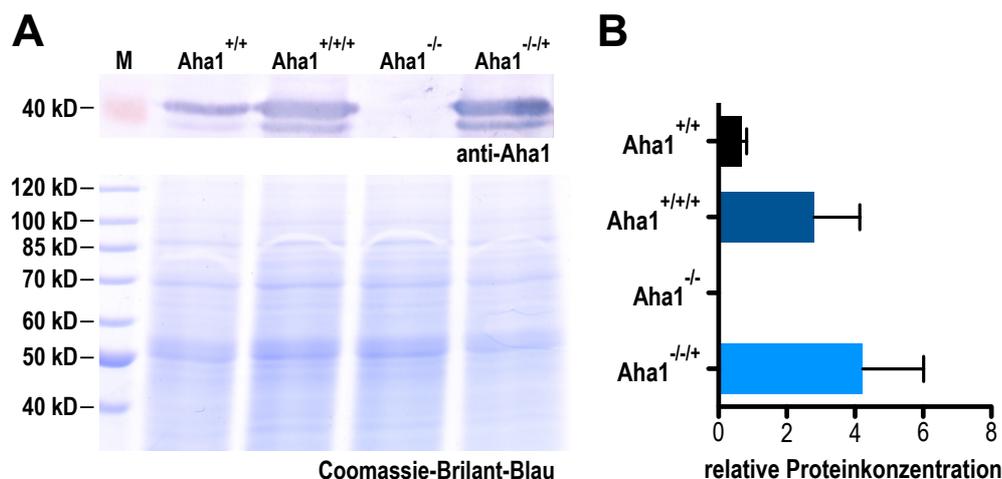


Abb. 14: Verifizierung der Aha1-Mutanten durch Western Blot-Analyse

Lysate (5×10^6 Zellen) von promastigoten *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-/+} Klon 5 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit anti-Aha1 (A, oben). Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Brillant-Blau-Gel angefertigt (A, unten). Die Proteinbanden wurden anschließend mit ImageJ quantifiziert (B). $n = 3$, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Für eine detailliertere Charakterisierung der Aha1-Mutanten auf Protein-Ebene wurde eine Quantifizierung der Aha1-Immunblots durchgeführt. Dafür wurden die digitalisierten Immunblots und Coomassie-Brillant-Blau-Gele mittels ImageJ quantifiziert und die Proteinbanden gegen das Kontrollgel normalisiert. Die Quantifizierung ergab eine relative Proteinkonzentration von ca. 3 für Aha1^{+/+/+} (Abb. 14B). Aha1 wurde in der Mutante Aha1^{-/-/+} mit einer relativen Proteinkonzentration von ca. 4 vergleichbar überexprimiert. Somit konnten alle hergestellten Mutanten verifiziert werden und es wurde in allen weiteren Experimenten mit *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} Klon 2 und Aha1^{-/-/+} Klon 5 gearbeitet.

3.6. Charakterisierung der Aha1-Mutanten

Um die Rolle und Funktion von Aha1 in *Leishmania*-Parasiten zu untersuchen, wurden die verifizierten Mutanten phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurden morphologische Analysen und Wachstumsversuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Außerdem wurden die Auswirkungen auf die *in vitro* Infektiosität getestet.

3.6.1. Morphologische Analyse der Aha1-Mutanten

Eine Stadiendifferenzierung der Aha1-Mutanten erfolgte, sodass jedes Entwicklungsstadium der Parasiten morphologisch untersucht werden konnte. Daraus ließen sich Rückschlüsse auf die Rolle von Aha1 in der Differenzierung der Parasiten ziehen.

Promastigoten der Stämme *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} wurden einer *in vitro* Stadiendifferenzierung unterzogen. Von allen Kulturen wurde an Tag 1 (25 °C, pH 7,4), Tag 2 (37 °C, pH 7,4) und Tag 5 (37 °C, pH 5,5) Ausstriche angefertigt, die angefärbt (anti- α -Tubulin, DAPI) und für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie genutzt wurden. Während mit anti- α -Tubulin das Zytoskelett angefärbt wird, färbt DAPI Nuklei und Kinetoplasten der Leishmanien an.

Wie in Abb. 15 (linke Spalte) zu sehen ist, unterschieden sich die Mutanten an Tag 1 (25 °C, pH 7,4) nicht vom Wildtyp. Alle Parasiten wiesen die Merkmale promastigoter Stadien auf: schmaler, länglicher Zellkörper und ausgeprägte Geißel.

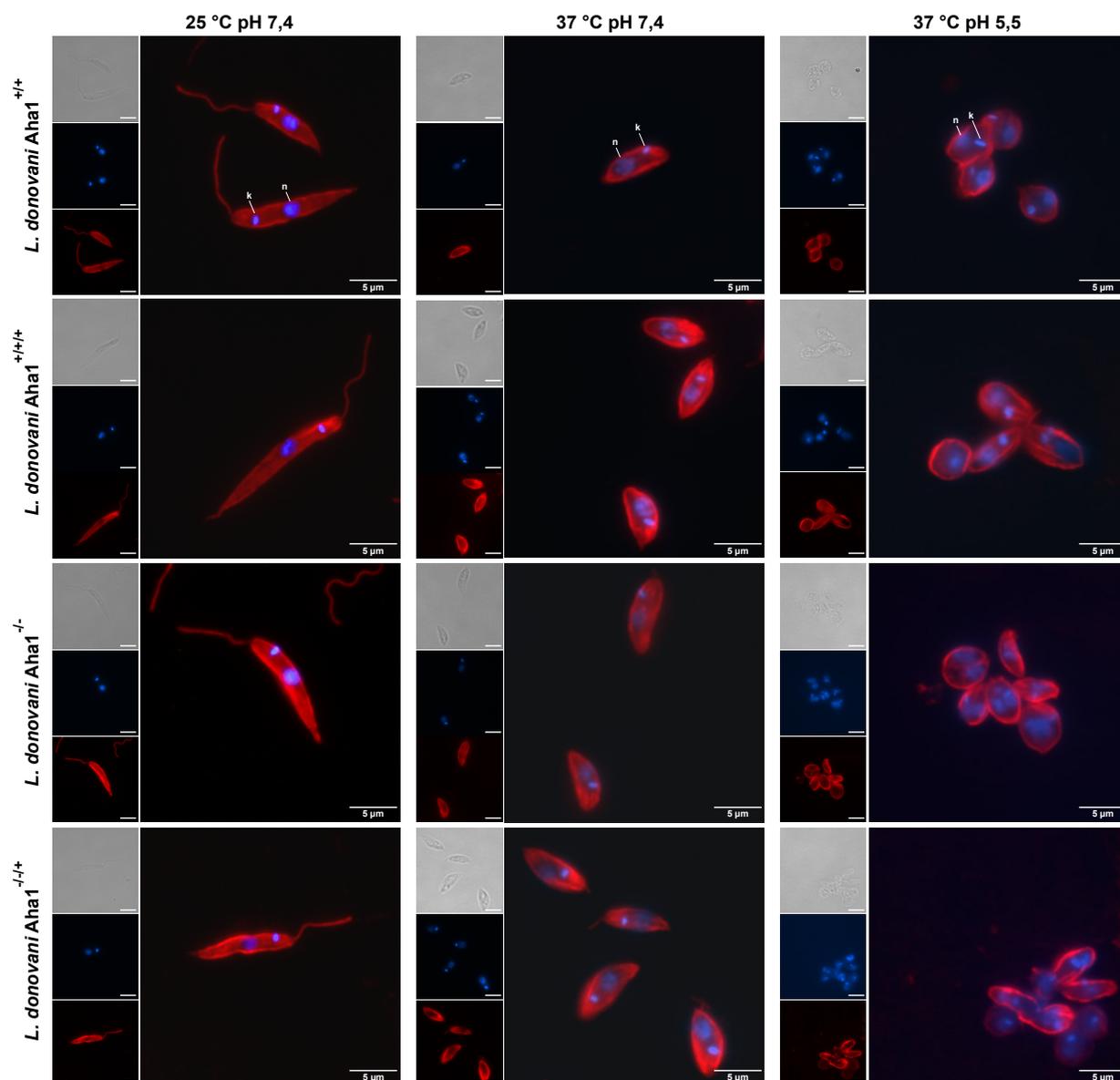


Abb. 15: Immunfluoreszenz-Studien der Stadiendifferenzierung der Aha1-Mutanten

Promastigote (25 °C, pH 7,4) *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-+} wurden durch Änderung der Temperatur und des pH-Wertes in Hitze-geschockte Parasiten (37 °C, pH 7,4) und anschließend in axenische Amastigote (37 °C, pH 5,5) umgewandelt. Die Leishmanien wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti- α -Tubulin inkubiert. Als zweiter Antikörper diente anti-Maus IgG Alexa Fluor 594 sowie DAPI. Die Aufnahmen wurden am Epifluoreszenzmikroskop (EVOS) angefertigt: DIC (oben links), DAPI (Mitte links), anti- α -Tubulin (unten links) und Überlagerung von DAPI und anti- α -Tubulin (rechts). Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ m. n = Nucleus, k = Kinetoplast.

Zur detaillierteren Analyse der Promastigoten wurden die Zellkörper und Flagella von 50 Parasiten im Fluoreszenzmikroskop ausgemessen. Die Messung ergab keine signifikanten Unterschiede in den Zellkörperlängen der Parasiten, welche im Durchschnitt bei 8,5 μ m lagen (Abb. 16A). Die Flagella-Längen hingegen unterschieden sich (Abb. 16B). Die Flagella der Aha1-Nullmutanten (ca. 4,5 μ m) waren im Vergleich zum

Wildtyp (6 μm) verkürzt. Die Flagella der Aha1-überexprimierenden Parasiten hingegen waren länger (ca. 7 μm) als Wildtyp-Flagella. Das Ergebnis deutet auf ein leichtes Defizit der Aha1-Nullmutanten hin, was durch Überexpression komplementiert wurde.

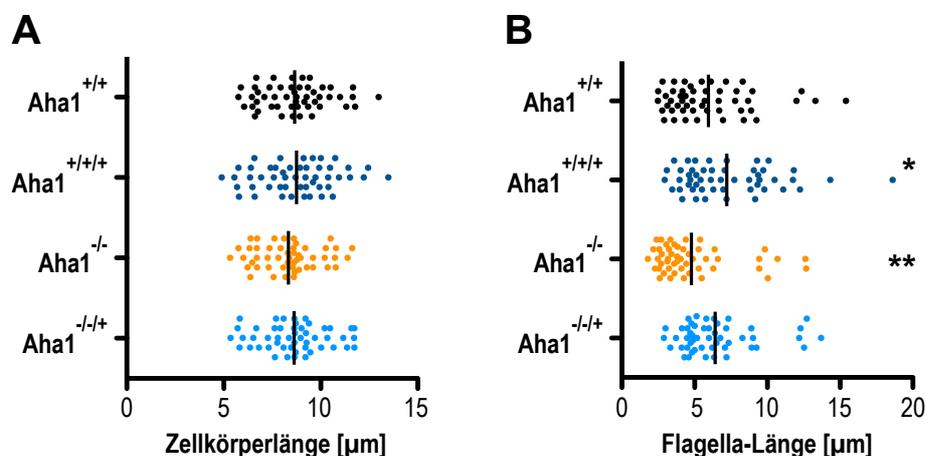


Abb. 16: Bestimmung der Zellkörper- und Flagella-Längen der Aha1-Mutanten (25 °C, pH 7,4)

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/-}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-+} wurden fixiert, immunologisch mit anti- α -Tubulin und DAPI angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellkörperlängen (A) und Flagella-Längen (B) der Parasiten wurden mit der Messfunktion der Software des Mikroskops bestimmt. n = 2, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 (U-Test).

An Tag 2 (37 °C, pH 7,4) der Stadiendifferenzierung zeigten alle Parasiten gleichermaßen Temperatur-induzierte Veränderungen (Abb. 15, mittlere Spalte). Auch in diesem Stadium waren keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und den Mutanten zu erkennen. Die Parasiten teilten sich auf in Zellen mit langer, begeißelter Form sowie Zellen mit verkürzten Zellkörpern und verkürzten Flagella. An Tag 5 (37 °C, pH 5,5) des *in vitro* Lebenszyklus hatten sich alle Aha1-Mutanten vollständig in axenische Amastigote umgewandelt (Abb. 15, rechte Spalte). Hier waren ovale Zellkörper und stark verkürzte Flagella zu erkennen. Wildtyp und Mutanten zeigten bei 25 °C und pH 7,4 vergleichbare Differenzierung zurück in das Promastigotenstadium (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion bzw. Überexpression von Aha1 kaum Auswirkungen auf die Morphologie der Promastigoten und axenischen Amastigoten hatte und dass eine Stadiendifferenzierung für alle Mutanten gleichermaßen möglich war. Daraus ließ sich schließen, dass Aha1 keine entscheidende Rolle in der Stadiendifferenzierung der Parasiten spielt.

3.6.2. Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten

Um Wachstumsdefizite der Aha1-Mutanten zu bestimmen, wurden Wachstumsversuche unter unterschiedlichen Kulturbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden je 1×10^5 Promastigote mL^{-1} der Stämme *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} eingesät und über vier Tage inkubiert. Täglich wurden Proben für die Zellzahlbestimmung entnommen.

Der erste dieser Wachstumsversuche erfolgte unter Standardbedingungen für Promastigote: neutraler pH (pH 7,4) und eine Umgebungstemperatur von 25 °C. Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, wiesen die Mutanten ein ähnliches Wachstum auf. Die Aha1-Nullmutante zeigte jedoch am Tag vier der Messung eine signifikant geringere Zelldichte als der Wildtyp und damit ein minimales Wachstumsdefizit (ca. 11 %) unter Standardbedingungen.

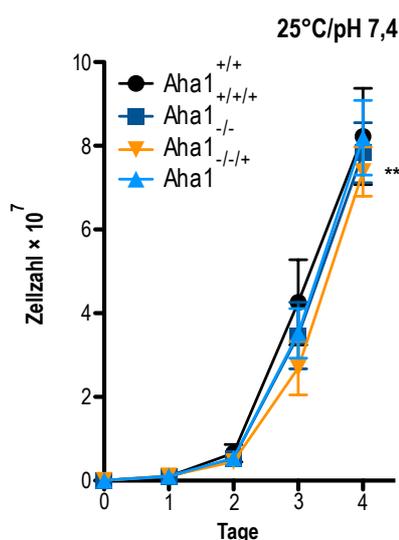


Abb. 17: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten bei 25 °C

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL^{-1} eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. $n = 14$, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, ** $p \leq 0,01$ (Student's *t*-Test).

Als nächstes wurde ein Wachstumsversuch bei 37 °C durchgeführt, da dies der Temperatur im Säugetierwirt entspricht. Abb. 18 zeigt, dass die Parasiten im Vergleich zum Wachstum unter Standardbedingungen schneller anwuchsen, jedoch früher ein Wachstumsplateau erreichten. Auch hier waren nur geringe Unterschiede zwischen den Mutanten zu erkennen; wieder zeigten die Aha1^{-/-}-Parasiten am Tag vier eine minimal, aber signifikant geringere Zelldichte als die Wildtyp-Zellen (ca. 12 %).

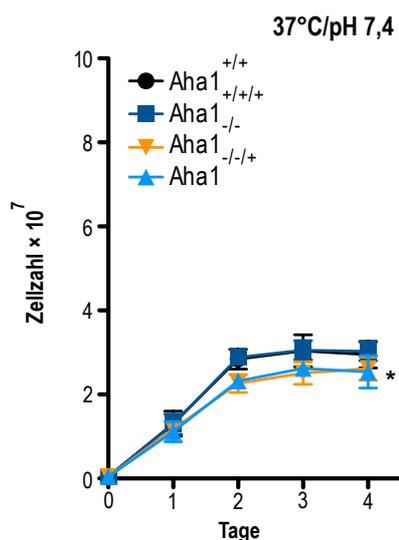


Abb. 18: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten bei 37 °C

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ eingesät und bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. n = 8, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * p ≤ 0,05 (Student's *t*-Test).

Leishmania spp. sind in Makrophagen einem sauren Milieu ausgesetzt. Deshalb wurde eine Wachstumskinetik in saurem Medium (pH 5,5) durchgeführt. Die Kinetik war dem Wachstumsverlauf unter Standardbedingungen ähnlich, jedoch wurden hier keine hohen Zellzahlen erreicht (Abb. 19). Die Aha1-Nullmutanten zeigten auch hier ein minimales, aber signifikantes Wachstumsdefizit (ca. 25 %). Die Aha1-überexprimierenden Parasiten mit Wildtyp oder Nullmutanten Hintergrund wuchsen ähnlich wie Wildtyp-Zellen und komplementierten den Phänotyp der Genaustauschmutanten.

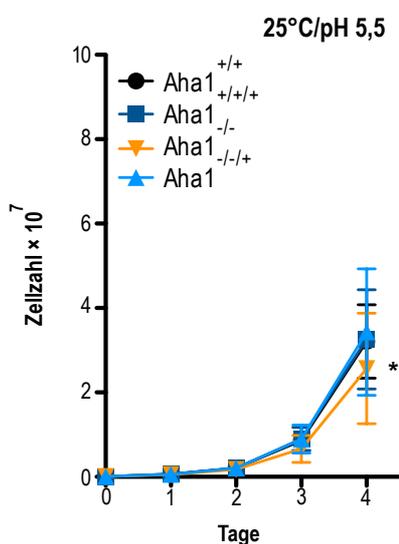


Abb. 19: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten bei 25 °C und pH 5,5

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ in saures Medium (pH 5,5) eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. n = 8, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * p ≤ 0,05 (Student's *t*-Test).

In einem vierten Experiment wurde das Wachstum der Mutanten unter Ethanol-Stress (IC₅₀ = 2 %) bestimmt. Unter diesen Bedingungen wuchsen Aha1^{-/-}-Parasiten signifikant langsamer als Wildtyp-Parasiten (Abb. 20). Dieser Phänotyp konnte durch die Überex-

pression von Aha1 (Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+}) komplementiert werden; diese Parasiten zeigten ein schnelleres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

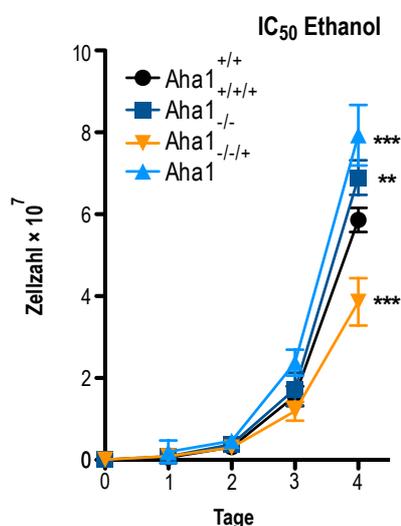


Abb. 20: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten unter Ethanol-Stress

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ in Medium mit 2 % Ethanol (IC₅₀) eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. n = 8, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 (Student's *t*-Test).

Aufgrund dieses Phänotyps wurde eine morphologische Analyse der Ethanol-behandelten Parasiten durchgeführt. Zunächst wurden Proben entnommen, die Leishmanien fixiert und mit anti- α -Tubulin und DAPI angefärbt. Bei der mikroskopischen Analyse wurden ebenfalls Zellkörper- und Flagella-Längen bestimmt, sodass die Auswirkungen des Ethanols auf die Morphologie analysiert werden konnte. Zunächst wurde beobachtet, dass Wildtyp und Mutanten Merkmale promastigoter Parasiten aufwiesen. Die Nuklei und Kinetoplasten waren ebenfalls intakt. Dennoch fiel auf, dass die Zellkörper der Aha1-Nullmutanten (Abb. 21C) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21A) und den Aha1-überexprimierenden Parasiten (Abb. 21B und D) verkürzt waren.

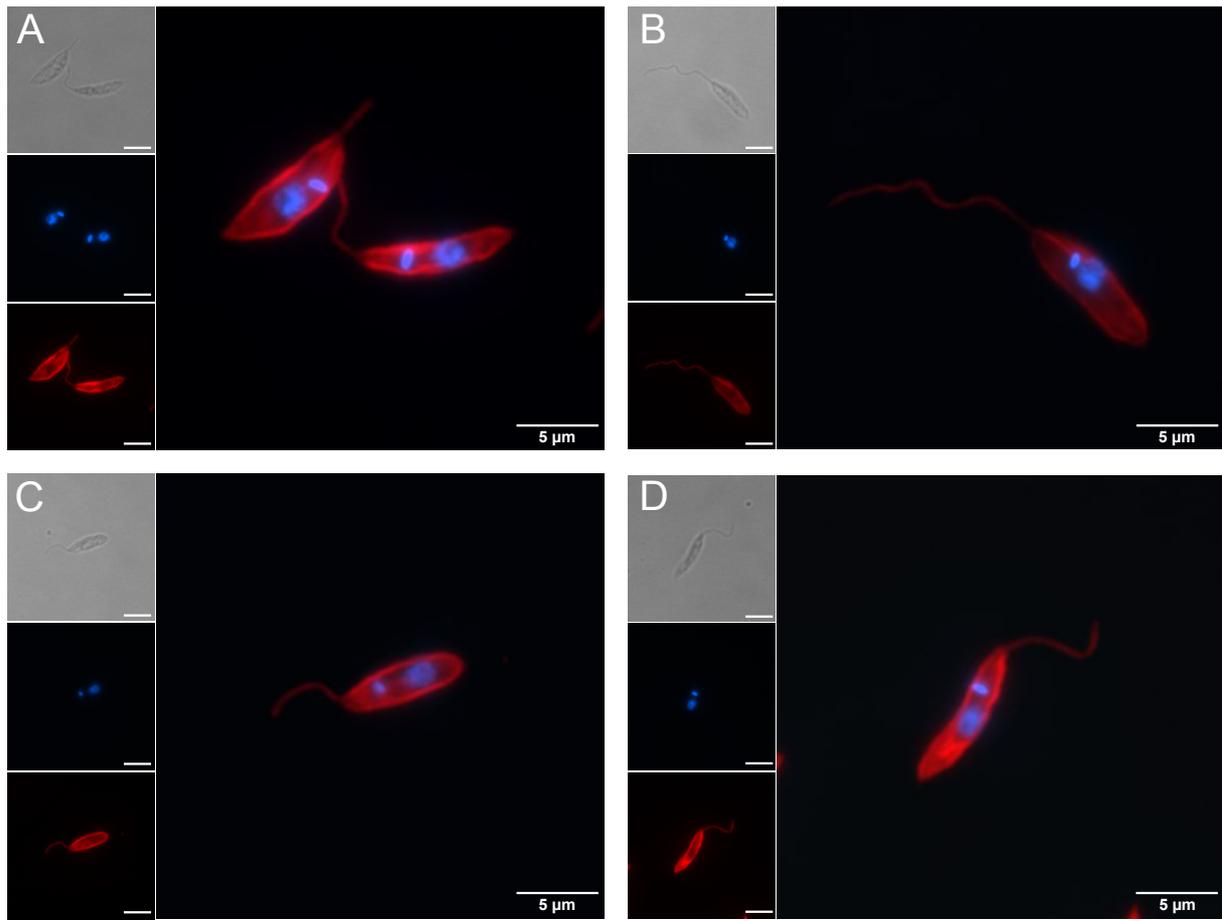


Abb. 21: Immunfluoreszenzstudien der Ethanol-behandelten Aha1-Mutanten

Ethanol-behandelte (2 %), fixierte promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+} (A), Aha1^{+/+/+} (B), Aha1^{-/-} (C) und Aha1^{-/-/+} (D) wurden permeabilisiert und mit anti- α -Tubulin inkubiert. Als zweiter Antikörper diente anti-Maus IgG Alexa Fluor 594 sowie DAPI. Die Aufnahmen wurden am Epifluoreszenzmikroskop (EVOS) angefertigt: DIC (oben links), DAPI (Mitte links), anti- α -Tubulin (unten links) und Überlagerung von DAPI und anti- α -Tubulin (rechts). Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ m.

Dies ließ sich durch die Zellkörperlängen-Bestimmung von 39 Parasiten bestätigen. Aha1^{-/-}-Parasiten (7 μ m) wiesen einen signifikant verkürzten Zellkörper im Vergleich zum Wildtyp auf (ca. 8,4 μ m; Abb. 22A). Die Zellkörper von Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+} (ca. 8,7 μ m) waren minimal länger als Wildtyp-Zellkörper. Die Flagella-Längen der Ethanol-behandelten Mutanten hingegen unterschieden sich kaum (Abb. 22B).

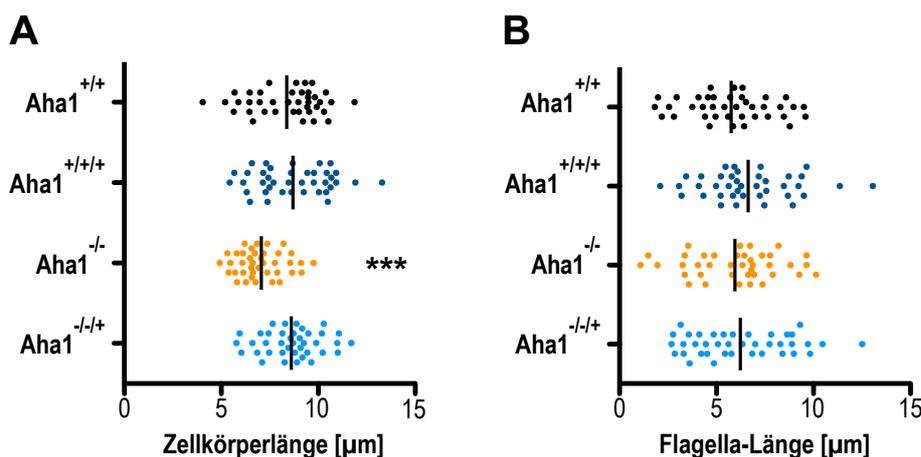


Abb. 22: Bestimmung der Zellkörper- und Flagella-Längen der Aha1-Mutanten unter Ethanol-Behandlung

Promastigote *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/-}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+}, die unter Zusatz von 2 % Ethanol (IC₅₀) im Medium wuchsen, wurden nach 72 h Wachstum fixiert, immunologisch mit anti- α -Tubulin und DAPI anfärbt und im Fluoreszenzmikroskop (EVOS) untersucht. Die Zellkörperlängen (**A**) und Flagella-Längen (**B**) der Parasiten wurden mit der Messfunktion der Software des Mikroskops bestimmt. n = 3, *** p \leq 0,001 (U-Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von Aha1 wenig Auswirkungen auf das *in vitro* Wachstum promastigoter Parasiten hatte. Aha1-Nullmutanten wuchsen unter allen getesteten Bedingungen langsamer, jedoch mit geringer Signifikanz. Aha1 ist daher nicht essentiell für das Promastigotenstadium der Parasiten. Dennoch kommt dem Co-Chaperon ein schützender Effekt unter Ethanol-Behandlung zu, der sich bei Überexpression verstärkt.

3.6.3. Analyse der Wachstumskinetik unter RAD- und GA-Selektion

Es wurden Wachstumsversuche mit den Hsp90-Inhibitoren Radicol und Geldanamycin durchgeführt, um die Interaktion von Aha1 mit Hsp90 zu ergründen. Das Co-Chaperon P23 gilt als putativer Antagonist von Aha1 und zeigte schützende Effekte unter Behandlung mit Hsp90-Inhibitoren (Hombach et al., 2015). Daher wurden zum Vergleich auch P23-Mutanten herangezogen.

Es wurden zunächst P23-überexprimierende Parasiten generiert. Hierzu wurde das Expressionsplasmid pCL2N-P23 hergestellt. Der zuvor hergestellte pCL2S-P23 (Hombach et al., 2015) ergab nur eine geringe P23 Überexpression (Daten nicht gezeigt), sodass der P23-ORF in das Plasmid pCL2N integriert wurde, das höhere Expressionsraten er-

laubt. Anschließend wurde *L. donovani* mit diesem Plasmid transfiziert (P23^{+/+/+}). Zudem sollten Parasiten beide Co-Chaperonen überexprimieren, um zu untersuchen, ob deren Überexpression einen synergistischen oder additiven Effekt hat. Dafür musste Aha1 zunächst in den Expressionsvektor pCL2S eingefügt werden, indem der Aha1-ORF aus pCL2N-Aha1 ausgeschnitten und in pCL2S integriert wurde. *L. donovani* wurde nur mit pCL2S-Aha1 (Aha1^{+/+/+}) oder mit pCL2S-Aha1 und pCL2N-P23 (Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+}) transfiziert und mit Nourseothricin oder mit Nourseothricin plus G418 selektiert.

Zur Überprüfung der Überexpression wurde eine Immunblot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Zelllysate von *L. donovani* Wildtyp, Aha1^{+/+/+}, P23^{+/+/+} und Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} hergestellt. Die Lysate wurden durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Der Nachweis erfolgte mit anti-Aha1 oder anti-P23 Antikörpern. Die Analyse ergab, dass alle getesteten Leishmanien Aha1 exprimierten (Abb. 23A). Zudem war sowohl für Aha1^{+/+/+} als auch für Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} eine deutliche Aha1-Überexpression zu erkennen. P23 wurde in allen Proben nachgewiesen und zeigte ein Laufverhalten wie Markerproteine mit einer Größe von ca. 25 kD (Abb. 23B). Für P23^{+/+/+} und Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} war eine P23-Überexpression zu erkennen. Zur Ladekontrolle wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt (Abb. 23C). Diese Ergebnisse belegten, dass die rekombinanten Parasiten die erwarteten Überexpressionsmuster zeigten.

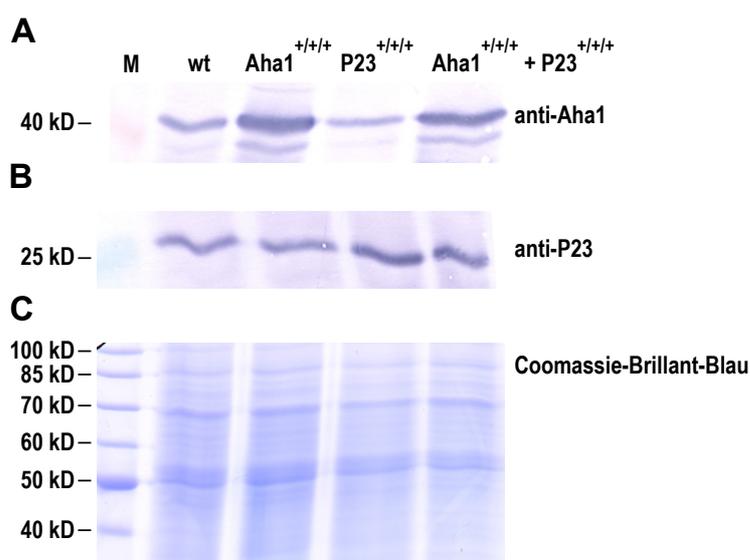


Abb. 23: Verifizierung von Aha1- und P23-Mutanten mittels Immunblot-Analyse

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt), Aha1^{+/+/+}, P23^{+/+/+} und Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} (5×10^6 Zellen) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot und der immunologische Nachweis mit anti-Aha1 (**A**) oder anti-P23 Antikörpern (**B**). Als Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Brillant-Blau-Gel angefertigt (**C**).

Im nächsten Schritt wurde das Wachstum der rekombinanten Parasiten unter Standardbedingungen gemessen, um Wachstumsdefizite unter normalen Bedingungen

auszuschließen. In Abb. 24 ist zu sehen, dass alle getesteten Stämme ein vergleichbares Wachstum zeigten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass keine Beeinträchtigung der Parasiten durch die Überexpression von Aha1 oder P23 vorlag.

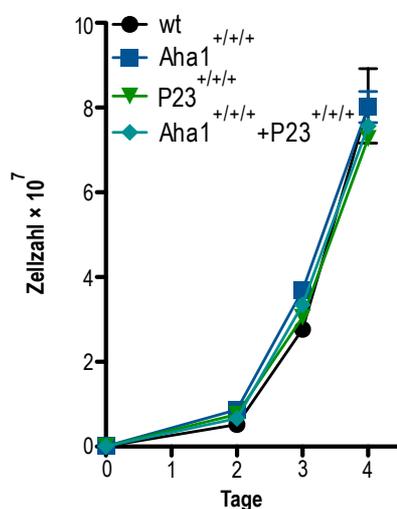


Abb. 24: Wachstumskinetik von Aha1- und P23-Mutanten

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt), Aha1^{+/+}, P23^{+/+} und Aha1^{+/+} + P23^{+/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Nachfolgend wurde das Wachstum der Parasiten unter Hsp90-Inhibitoren gemessen. Dafür wurden je 1×10^5 Zellen mL⁻¹ promastigote *L. donovani* Wildtyp, pTL.v6-Hsp90rr, Aha1^{+/+}, Aha1^{-/-}, Aha1^{-/+}, P23^{+/+}, P23^{-/-} und Aha1^{+/+} + P23^{+/+} eingesät und über vier Tage bei täglicher Zelldichtemessung inkubiert. Leishmanien, die mit pTL.v6-Hsp90rr transfiziert waren, wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Hsp90rr ist eine dominante Variante von Hsp90, die Leishmanien resistent gegenüber RAD macht. Unter GA ist es die Überexpression von Hsp90rr, die die Parasiten weniger sensitiv gegenüber diesem Inhibitor macht (Hombach et al., 2013). Dies bestätigte sich in diesen Versuchen (Abb. 25 und 26).

Um die Auswirkungen der Hsp90-Inhibitoren auf die Proliferation von Aha1- und P23-Mutanten zu testen, wurde zunächst RAD (IC₅₀) dem Kulturmedium zugesetzt. Das Wachstum an Tag 4 ist der Abb. 25 zu entnehmen. Die Überexpression von Aha1 führte im Vergleich zum Wildtyp zu einem signifikant schlechterem Wachstum unter RAD. Ein ähnliches Ergebnis war für Aha1-Nullmutanten mit *gene add back* zu erkennen. Hier führte die RAD-Behandlung zu einer Reduktion des Wachstums um 80 %. Aha1-Nullmutanten hingegen zeigten ein Wildtyp-ähnliches Wachstum. Die RAD-Behandlung von P23-Mutanten zeigte das bereits beschriebene (Hombach et al., 2015), gegenteilige Bild. Parasiten, die P23 überexprimierten, wuchsen ähnlich wie Wildtyp-Zellen, während P23^{-/-}-Parasiten unter RAD nicht wuchsen. Die gleichzeitige Überexpression der Co-

Chaperonen Aha1 und P23 führte zu einem intermediären Wachstum. Diese Parasiten wuchsen 50 % langsamer als Wildtyp-Zellen. Somit hatte die RAD-Behandlung gegen- teilige Effekte auf die Aha1- und P23-abhängige Proliferation.

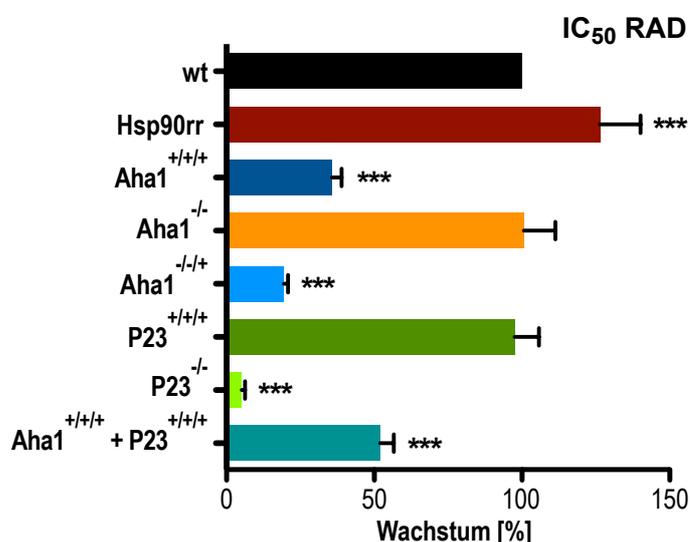


Abb. 25: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten unter Radicicol

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt), pTL.v6-Hsp90rr (Hsp90rr), Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-}, Aha1^{-/-/+}, P23^{+/+/+}, P23^{-/-} und Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ in Medium mit RAD (IC₅₀) eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. Dargestellt ist das Wachstum an Tag vier, wobei Wildtyp-Wachstum auf 100 % gesetzt wurde. n = 8, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, *** p ≤ 0,001 (Student's *t*-Test).

In einem zweiten Versuch wurde dem Kulturmedium GA (IC₅₀) hinzugefügt. Hier zeigte sich ein anderes Bild (Abb. 26). Parasiten, die Aha1 überexprimierten (Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+}) wuchsen unter GA-Behandlung nur geringfügig schlechter als Wildtyp-Zellen. Dagegen war das Wachstum der Aha1^{-/-}-Parasiten um 65 % reduziert. Unter GA zeigte sich für P23 ein ähnliches Bild. P23-überexprimierende Leishmanien wuchsen etwas langsamer als Wildtyp-Zellen, während das Wachstum von P23^{-/-}-Parasiten durch die GA-Behandlung um ca. 85 % reduziert war. Unter GA hatte die Überexpression beider Co-Chaperonen einen additiven, positiven Effekt. Die Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+} Parasiten wuchsen um ca. 50 % besser als Wildtyp-Zellen.

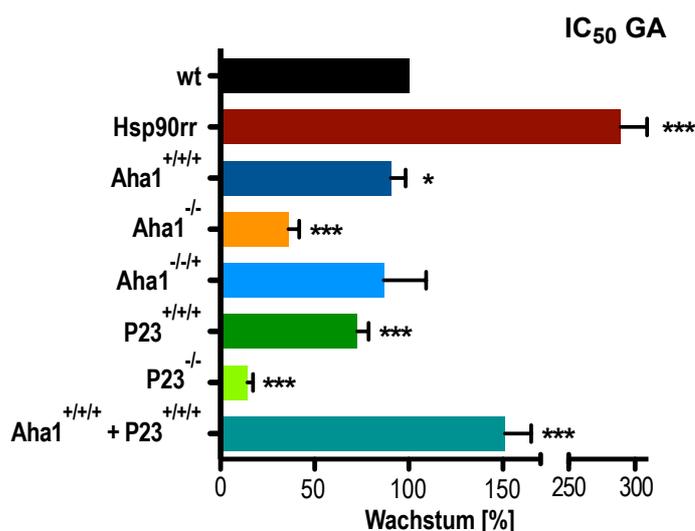


Abb. 26: Wachstumskinetik der Aha1-Mutanten unter Gel-danamycin

Promastigote *L. donovani* Wildtyp (wt), pTL.v6-Hsp90rr (Hsp90rr), Aha1^{+/+}, Aha1^{-/-}, Aha1^{-/-/+}, P23^{+/+}, P23^{-/-} und Aha1^{+/+} + P23^{+/+} wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL⁻¹ in Medium mit GA (IC₅₀) eingesät und bei 25 °C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich über vier Tage gemessen. Dargestellt ist das Wachstum an Tag vier, wobei Wildtyp-Wachstum auf 100 % gesetzt wurde. n = 8, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001 (Student's *t*-Test).

Während RAD und GA somit ähnliche Effekte auf die P23-abhängige Proliferation hatten, hatten die beiden Hsp90-Inhibitoren einen gegenteiligen Effekt auf die Aha1-abhängige Proliferation. Obwohl Aha1-überexprimierende Parasiten hypersensitiv gegenüber RAD waren, zeigten sie Wildtyp-ähnliches Wachstum unter GA-Behandlung. Im Gegensatz dazu zeigten Leishmanien, bei denen Aha1 ausgetauscht wurde, GA-sensitives Wachstum, während sie unter Behandlung mit RAD Wildtyp-ähnlich wuchsen. Es deuteten sich also unterschiedliche Wirkmechanismen der Hsp90-Inhibitoren an.

3.6.4. *In vitro* Infektiosität von Aha1-Nullmutanten

Um die *in vitro* Infektiosität der Aha1-Mutanten zu testen, wurden primäre Knochenmarksmakrophagen infiziert. Da Leishmanien einen biphasischen Lebenszyklus durchlaufen, war es wichtig, die Rolle von Aha1 auch in intrazellulären Amastigoten zu analysieren.

Dafür wurden pluripotente Stammzellen aus Mäusen gewonnen und zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Infektion erfolgte mit *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+}, bei einem Makrophagen/Leishmanien-Infektionsverhältnis von 1:10. Genomische DNA der infizierten Makrophagen wurde 4,5 h und 48 h nach Infektion isoliert um die relative Parasitenlast durch qPCR zu bestimmen. Dabei wurde das Gemisch aus Wirts- und Parasiten-gDNA als *template* in eine Duplex-qPCR eingesetzt, in der die

Leishmania- und Maus-Aktin-DNA quantifiziert wurde (Bifeld et al., 2016). Die relative Parasitenlast wurde als Verhältnis von Parasiten-Aktin-DNA zu Maus-Aktin-DNA definiert, wobei die Parasitenlast von *L. donovani* Aha1^{+/+} (Wildtyp) als Standard fungierte und auf 100 % gesetzt wurde.

Wie in Abb. 27A zu sehen ist, unterschieden sich die initialen Parasitenlasten infizierter Makrophagen. Aha1-überexprimierende Parasiten (Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+}) infizierten in den ersten 4,5 h nach Infektion signifikant besser als Wildtyp-Zellen. Die Leishmanien wurden somit besser von Makrophagen aufgenommen. Aha1-Nullmutanten wiesen zu diesem Zeitpunkt Wildtyp-ähnliche Infektionsraten auf. Nach weiteren 44 h Inkubation, konnte dagegen eine ca. 20-prozentige Reduktion der Parasitenlast für die Nullmutanten gemessen werden (Abb. 27B). Das Fehlen von Aha1 hatte somit einen negativen Effekt auf das Überleben und/oder die Proliferation der Parasiten in den Makrophagen. Die Überexpression von Aha1 reflektierte die initiale Parasitenlast; war aber im Vergleich zum Wildtyp nur noch minimal erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass Aha1 auch eine Rolle in intrazellulären Parasiten spielt.

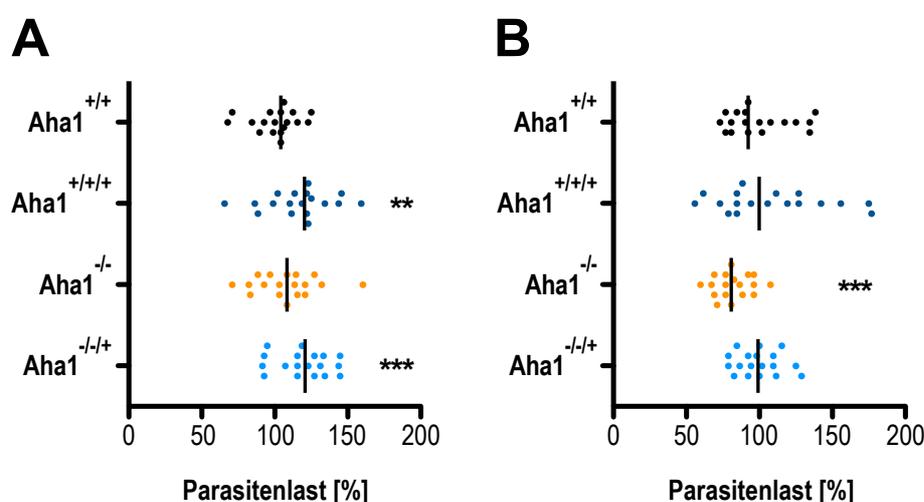


Abb. 27: Makrophageninfektion der Aha1-Mutanten

Makrophagen wurden bei einem Makrophagen/Leishmanien-Verhältnis von 1:10 mit promastigoten *L. donovani* Aha1^{+/+}, Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-} und Aha1^{-/-/+} infiziert. Vier Stunden nach der Infektion wurden freie Parasiten entfernt und die infizierten Makrophagen weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Genomische DNA wurde 4,5 h (A) und 48 h (B) nach Infektion isoliert. Die Quantifizierung der Parasitenlast erfolgte durch qPCR. Die relative Parasitenlast der Mutanten wurde ausgehend von 100 % der Wildtyp-Parasitenlast berechnet. n = 6, *** p ≤ 0,001 (Student's *t*-Test).

3.7. Aha1 und das Sekretom

Eine Vielzahl von Virulenz-beeinflussenden Parasiten-Proteinen werden in die Wirtszelle exportiert (Bifeld und Clos, 2015). Das Ergebnis in Abb. 27B, legt nahe, dass Aha1 Einfluss auf das intrazelluläre Überleben in Knochenmarksmakrophagen hatte. Daher stellte sich die Frage, ob Aha1 wie andere Virulenz-Proteine über Exosomen sekretiert wird. Leishmanien nutzen Exosomen, um Virulenzfaktoren und andere Proteine in die Wirtszelle zu schleusen und die Immunantwort des Wirts zu modulieren (Bifeld et al., 2015; Silverman et al., 2010a; Silverman et al., 2010b). Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass Hsp90 ebenfalls ein exosomales Protein ist (Silverman et al., 2010a).

Zunächst wurde das *Leishmania*-Sekretom analysiert, um zu ermitteln, ob Aha1 sekretiert wird. Dazu wurden Proteine aus dem Medium-Überstand der Parasiten durch Ultrafiltration konzentriert und nachfolgend mit Trypsin allein oder in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 behandelt. Freie Proteine werden in beiden Fällen abgebaut, während Proteine in Membran-umhüllten Vesikeln gegen Trypsin allein geschützt sind. Promastigote *L. donovani* wurden 2 h mit 5 % Saccharose in PBS inkubiert. Nach einer Sedimentation wurde der Zellüberstand ultrafiltriert und aufkonzentriert. Anschließend wurden die Proben aufgeteilt und der Trypsinverdau wie folgt durchgeführt: Probe 1 (+/-) wurde nur mit Trypsin versetzt, Probe 2 (+/+) mit Trypsin und Triton X-100, während Probe 3 (-/-) unbehandelt blieb. Nach Fällung der Proteine mit Aceton erfolgte das Auftrennen durch SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse mit anti-Hsp90, anti-HsIU1 oder anti-Aha1.

Die Immunblot-Analyse mit anti-Hsp90 galt hier als Positivkontrolle, da bekannt ist, dass Leishmanien Hsp90 sekretieren (Silverman et al., 2008). Dies spiegelte sich auch in der Sekretomanalyse wider. Probe 1, die nur mit Trypsin behandelt wurde (+/-), enthielt Hsp90 (Abb. 28, oben). In diesem Fall baute Trypsin sekretierte Proteine ab, die nicht von einer Membran umschlossen waren. In Probe 2 hingegen (Trypsin plus Triton X-100, +/+) konnte Hsp90 nicht mehr nachgewiesen werden. Der Grund dafür war, dass Triton X-100 die schützenden Vesikelmembranen permeabilisierte. Die unbehandelte Probe 3 (-/-) enthielt alle sekretierten Proteine und somit auch Hsp90. Das Protein HsIU1 diente in diesem Experiment als Negativkontrolle, da bekannt ist, dass HsIU1

von Leishmanien nicht sekretiert wird (Chrobak et al., 2012; Silverman et al., 2010a). Wie in Abb. 28 (Mitte) zu sehen ist, konnte dies in diesem Experiment bestätigt werden; HsIU1 war in keiner der drei Proben enthalten und war somit nicht Teil des *Leishmania*-Sekretoms. Aha1 hingegen wurde in Probe 1 (+/-) aber nicht in Probe 2 (+/+) nachgewiesen (Abb. 28, unten) und wurde somit in Membran-umschlossenen Vesikeln sekretiert. In der Kontrollprobe 3 (-/-) war das Protein ebenfalls enthalten. Somit konnte gezeigt werden, dass Aha1, wie Hsp90, Teil des *Leishmania*-Sekretoms ist und sich in Membran-umschlossenen Vesikeln befindet.

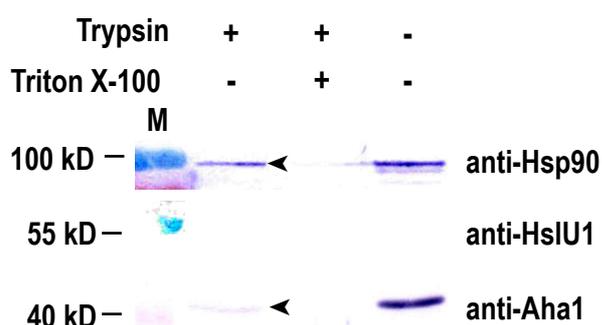


Abb. 28: Sekretionsassay mit Trypsinverdau

Promastigote *L. donovani* wurden 2 h in PBS mit 5 % Saccharose inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation und der Konzentration des Zellüberstands. Anschließend wurde ein Trypsinverdau durchgeführt, um die Sensitivität der Proben gegenüber Trypsin allein oder in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 zu testen. Die Proteine wurden gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und der immunologische Nachweis erfolgte mit anti-Hsp90 (Positivkontrolle), anti-HsIU1 (Negativkontrolle) oder anti-Aha1 Antikörpern. Die schwarzen Pfeile zeigen die anti-Hsp90 und anti-Aha1 spezifischen Banden.

Um zu überprüfen, ob die Membran-umschlossenen Vesikel in denen Aha1 nachgewiesen wurde, tatsächlich Exosomen waren, wurde eine Exosomenisolierung durchgeführt. Auch hierauf folgte ein Trypsinverdau. Dafür wurden, ähnlich wie bei einem Sekretionsassay, Promastigote *L. donovani* für 2 h in 5 % Saccharose mit PBS bei 37 °C für eine vermehrte Exosomenfreisetzung inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Zellüberstand filtriert und aufkonzentriert. Die konzentrierten Exosomen wurden dann durch Sedimentation durch einen Saccharose-Gradienten weiter gereinigt und durch abschließende Ultrazentrifugation konzentriert. Danach wurde wie oben beschrieben ein Trypsinverdau durchgeführt.

Der Immunblot der Exosomen-Isolierung ergab das gleiche Ergebnis wie der Sekretionsassay. Hsp90 befand sich nur in Probe 1 und 3, die nur mit Trypsin oder gar nicht behandelt wurde (Abb. 29, oben). HsIU1 hingegen wurde nicht sekretiert (Probe 3, -/-; Abb. 29, Mitte). Aha1 befand sich ebenfalls in der Trypsin-behandelten Probe 1 (+/-) und wurde somit in Exosomen sekretiert (Abb. 29, unten). Der Immunblot ergab nur

schwach markierte Proteine für Probe 1 (+/-), da die Menge der isolierten Exosomen an der Nachweisgrenze lag. Dennoch ließ sich nachweisen, dass Aha1 auch Teil der Exosomenbeladung ist.

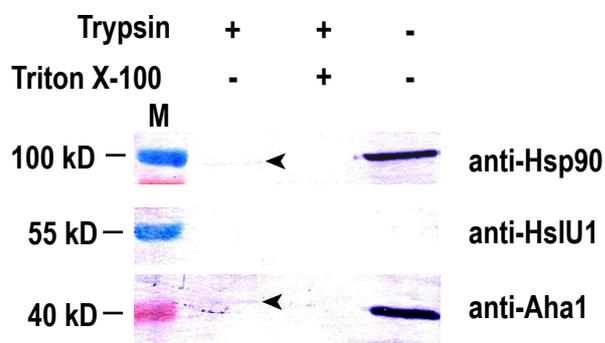


Abb. 29: Exosomen-Isolierung mit Trypsinverdau

Promastigote *L. donovani* wurden 2 h in PBS mit 5 % Saccharose bei 37 °C inkubiert. Nach Sedimentation und Konzentration des Zellüberstands, wurden die konzentrierten Exosomen durch Sedimentation durch einen Saccharose-Gradienten weiter gereinigt und durch abschließende Zentrifugation konzentriert. Es wurde ein Trypsinverdau durchgeführt, um die Sensitivität der Proben gegenüber Trypsin allein oder in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 zu testen. Die gefällten Proteine wurden aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse mit anti-Hsp90 (Positivkontrolle), anti-HsIU1 (Negativkontrolle) oder anti-Aha1 Antikörpern unterzogen. Die schwarzen Pfeile zeigen die anti-Hsp90 und anti-Aha1 spezifischen Banden.

4. Diskussion

Das molekulare Chaperon Hsp90 ist ein ubiquitäres und hoch konserviertes Protein, das wichtige Aufgaben in der Zelle übernimmt. Der Multi-Chaperonen-Komplex, der aus einem Hsp90-Dimer, anderen Chaperonen und Co-Chaperonen besteht (Li et al., 2011; Li et al., 2012), ist für die Faltung, Reifung und Aktivierung zahlreicher Klientenproteine verantwortlich (Buchner, 1999; Rutherford und Zuker, 1994). Hsp90 wird dabei nicht nur auf posttranslationaler Ebene reguliert (Soroka et al., 2012), sondern auch durch diverse Co-Chaperonen. Diese vermitteln die Chaperon-Chaperon sowie Chaperon-Klientenprotein-Interaktion (Johnson und Brown, 2009). Hsp90 ist essentiell für die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Organismen und an der Regulation vieler intrazellulärer Prozesse beteiligt.

In *Leishmania* spp. ist Hsp90 sowohl für das Promastigotenstadium des Parasiten als auch für das Überleben und die Proliferation von Amastigoten wichtig. Bislang ist wenig über Leishmanien-spezifische Klientenproteine bekannt, doch wurden die meisten Hsp90 Co-Chaperonen untersucht. Diese sind teilweise essentiell für die Lebensfähigkeit, die Kontrolle des Lebenszyklus, die Stresstoleranz sowie Infektiosität der Parasiten (Clos und Hombach, 2015; Hombach et al., 2013; Morales et al., 2010; Ommen et al., 2010; Vergnes et al., 2007; Wiesgigl und Clos, 2001a). Viele Untersuchungen gehen daher bereits in die Richtung Hsp90 als *drug target* in protozoischen Erkrankungen zu verwenden (Angel et al., 2013; Debnath et al., 2014; Pallavi et al., 2010; Petersen et al., 2012; Roy et al., 2012; Shahinas et al., 2013; Varela et al., 2014; Wang et al., 2014). Somit ist auch die Untersuchung des *Leishmania* spp. Hsp90 und dessen Co-Chaperonen wichtig für die Entwicklung neuer Anti-*Leishmania*-Wirkstoffe.

Eine weitere Funktion der Hsp90 Co-Chaperonen ist die Regulation der essentiellen Hsp90-ATPase-Aktivität. Ein Co-Chaperon, das diese Aufgabe übernimmt, ist Aha1, der stärkste bekannte Aktivator der Hsp90-ATPase-Aktivität. Bislang wurden nur wenige Studien zu Aha1 in protozoischen Parasiten durchgeführt, jedoch codiert auch das Genom von *L. donovani*, des Verursachers der viszeralen Leishmaniose, dieses Co-Chaperon.

4.1. Aha1-Nachweis und Expression während der Stadiendifferenzierung

Das Co-Chaperon Aha1 kommt in vielen eukaryotischen Organismen vor (Johnson und Brown, 2009), ist aber nicht sehr konserviert und weist Organismen-spezifische strukturelle Variationen auf. Das *Leishmania* spp. Aha1 ist dem Aha1 höherer eukaryotischer Organismen strukturell ähnlich (Rehn und Buchner, 2015), jedoch existieren auch hier diverse Sequenzunterschiede (Seraphim et al., 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Spezifische Aha1-Antikörper erkennen das Protein nur in den *Leishmania*-Spezies *L. donovani* und *L. major* und nicht das Aha1-Ortholog in den nah verwandten *T. cruzi*-Stämmen Y und Tulahuen (Abb. 3). Dennoch wird davon ausgegangen, dass die Aha1-Orthologe trotz der strukturellen Unterschiede ähnliche Eigenschaften in allen eukaryotischen Organismen besitzen.

Der *L. donovani* Lebenszyklus kann analysiert werden, indem Promastigote *in vitro* durch erhöhte Temperatur und saures Milieu in axenische Amastigote umgewandelt werden (Barak et al., 2005; Rosenzweig et al., 2008; Saar et al., 1998). Die Parasiten zeigen dabei nicht nur morphologische Veränderungen, sondern weisen veränderte Proteinexpressionsmuster während der Stadiendifferenzierung auf. Diese spiegeln Stadien-spezifische Funktionen wider (Bente et al., 2003). Aha1 ist in *L. donovani* kein Hitze-induzierbares Protein und wird konstant über den *in vitro* Lebenszyklus exprimiert, was durch Immunblot mit spezifischen Aha1-Antikörpern gezeigt wurde (Abb. 5B und C).

In Übereinstimmung hierzu haben auch Seraphim und Mitarbeiter (2013) gezeigt, dass Aha1 in *L. Viannia* spp. und *L. infantum* konstitutiv während des Lebenszyklus exprimiert wird. Eine Proteomanalyse während der axenischen Umwandlung von *L. donovani* Promastigoten in Amastigote ergab ebenfalls stabile Aha1-Konzentrationen in beiden Stadien (Rosenzweig et al., 2008). Diese Ergebnisse sind in Einklang damit, dass *L. donovani* Hsp90 aufgrund seiner hohen Abundanz ebenfalls gleichmäßig während der Stadiendifferenzierung exprimiert wird (Brandau et al., 1995). Auch die Hsp90 Co-Chaperonen Sgt (Ommen et al., 2010), Cyp40 (Yau et al., 2014) und P23 (Hombach et al., 2015) werden konstitutiv während des *Leishmania*-Lebenszyklus exprimiert, während Stip1 ein Hitze-induzierbares Protein ist (Ommen, 2009; Webb et al., 1997).

Im Gegensatz hierzu ergaben Untersuchungen des humanen Aha1, dass Aha1 unter Hitzestress verstärkt synthetisiert wird (Panaretou et al., 2002). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine Temperaturerhöhung auf 37 °C für *L. donovani* grundsätzlich nicht als Stress anzusehen ist, da der obligat intrazelluläre Parasit den größten Teil seines Lebenszyklus bei dieser Temperatur und in saurem Milieu zubringt. Hsp90 ist in Leishmanien hoch abundant (Brandau et al., 1995) und kritisch für beide Stadien des Parasiten (Hombach et al., 2013; Wiesgigl und Clos, 2001a, b), was den Schluss zulässt, dass das putative Co-Chaperon Aha1 ebenfalls in beiden Stadien benötigt wird und somit keiner Regulation unterliegt.

4.2. Aha1 interagiert mit Hsp90

Aha1 gilt als putatives Co-Chaperon von Hsp90, was in der vorliegenden Arbeit auch für *L. donovani* überprüft wurde. Aus dem Ergebnis der Kreuzvernetzung von HA-markiertem Aha1 und Hsp90 (Abb. 8B) lässt sich auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine schließen. Die Ko-Präzipitation der beiden Proteine erfolgte jedoch nur unter Zugabe des *cross-linker* DSP. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Aha1 und Hsp90 transient ist. Zudem stört die N-terminale Markierung von Aha1 die Bindung von Hsp90 nicht. Die Ko-Präzipitation von N-terminal markiertem Hsp90 und Aha1 hingegen ergab keine Interaktion (Abb. 8A). Ein Grund dafür könnte sein, dass die N-terminale Markierung von Hsp90 die Bindung von Aha1 stört. Eine weitere Erklärung ist, dass Hsp90 hoch abundant im Promastigotenstadium der Zelle vorliegt (Brandau et al., 1995) und nur ein Teil hiervon mit Aha1 interagiert.

Im Einklang damit wurde auch in *L. braziliensis* eine Interaktion zwischen rekombinantem Aha1 und Hsp90 durch isotherme Titrationskalorimetrie nachgewiesen (Seraphim et al., 2013). Auch in höheren eukaryotischen Organismen, wie dem Menschen (Tripathi et al., 2014) oder der Hefe (Panaretou et al., 2002), und weiteren protozoischen Parasiten, wie *P. falciparum* (Chua et al., 2012) oder *Entamoeba histolytica* (Singh et al., 2014) interagieren Aha1 und Hsp90. Dennoch liegt die Mehrheit des humanen Aha1 frei in der Zelle vor (Tripathi et al., 2014).

Die nachgewiesene Interaktion von Aha1 und Hsp90 deutet auf die gleiche und damit zytosolische Lokalisation (Brandau et al., 1995; Shapira und Pinelli, 1989) der beiden Proteine in *L. donovani* hin. Durch Zellfraktionierung konnte diese Hypothese bestätigt

werden (Abb. 9A und B). Die Lokalisation von Aha1 durch Immunfluoreszenz war nicht möglich, da die Aha1-Antikörper unspezifisch an *L. donovani*-Zellen binden (Daten nicht dargestellt). Aha1 lokalisiert, wie Hsp90, auch in anderen eukaryotischen Organismen im Zytosol der Zelle (Rehn und Buchner, 2015).

4.3. Analyse von Aha1 durch Gen-Austauschmutanten

Die Aktivierung zahlreicher Hsp90-Klientenproteine wird durch ATP-induzierte Konformationsänderungen, Co-Chaperonen und posttranslationale Modifikationen reguliert (Li et al., 2012; Mollapour und Neckers, 2012). Die Tatsache, dass dies Organismen-spezifisch geschieht (Johnson und Brown, 2009), deutet an, dass auch das *Leishmania* Hsp90 spezifisch reguliert wird. Demgemäß weist der *Leishmania* Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex viele der bekannten Co-Chaperonen auf. *Leishmania* spp. codieren u. a. für Stip1, Sgt, Hip, Cyp40, P23 und Aha1. Das Co-Chaperon Cdc37 hingegen, das kritisch für die Aktivierung und Stabilisierung vieler Proteinkinasen ist, fehlt in Leishmanien (Johnson und Brown, 2009). Zudem wurde in einer *L. donovani* Phosphoproteomanalyse gezeigt, dass Hsp90, Hsp70 und Stip1 stadienabhängig und zum Teil an *Leishmania*-spezifischen Stellen phosphoryliert werden (Morales et al., 2010). Daraus lässt sich folgern, dass auch posttranslationale Modifikationen Leishmanien-spezifisch erfolgen und dass Hsp90 und Aha1 zum Teil Leishmanien-spezifisch reguliert werden können.

Bislang gibt es keine Berichte zu Aha1-Nullmutanten in protozoischen Parasiten. Da Aha1 in *L. donovani* in nur einer Kopie pro haploidem Chromosomensatz vorliegt, war es möglich, beide Aha1-Allele durch homologe Rekombination gegen Antibiotikaresistenzgene auszutauschen (Cruz et al., 1991; Ommen et al., 2009) (Abb. 10 und 12-14). Trotz des Fehlens von Aha1 waren *L. donovani* Aha1-Nullmutanten lebensfähig (Abb. 17). Auch morphologisch waren wenige Unterschiede zwischen den Aha1-Mutanten und dem Wildtyp zu erkennen (Abb. 15, linke Spalte). Somit ergibt sich der Schluss, dass Aha1 nicht essentiell für das Promastigotenstadium der Parasiten ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Hsp90 selbst unter physiologischen Bedingungen eine eigene, geringe ATPase-Aktivität aufweist (Silva et al., 2013). Somit sind Aha1-Nullmutanten nicht auf die Aktivierung der ATPase-Aktivität durch Aha1 angewiesen. Eine weitere Erklärung dafür, dass Aha1 nicht essentiell in Promastigoten ist, ist, dass

Leishmanien Gene oder Bereiche von Chromosomen spontan amplifizieren können, die dann extrachromosomal in der Zelle vorliegen (Rogers et al., 2011; Ubeda et al., 2014). Somit könnten nach homologer Rekombination selektierte Parasiten bereits genetische Komplementationen aufweisen, die das Überleben trotz Verlust von Aha1 ermöglichen.

Auch der putative Antagonist von Aha1, das Co-Chaperon P23, ist nicht essentiell für das Promastigotenstadium von *L. donovani*, obwohl P23 die ATPase-Aktivität von Hsp90 hemmt (Batista et al., 2015; Hombach et al., 2015).

Sowohl in der Hefe (Lotz et al., 2003; Panaretou et al., 2002) als auch in dem Schimmelpilz *Neurospora (N.) crassa* (Gu et al., 2016) sind Aha1-Nullmutanten unter physiologischen Bedingungen lebensfähig. In humanen Krebszellen konnte ein Gen-*knock-down* von Aha1 erzielt werden, der keinen Effekt auf die Expression von Hsp90 und der anderen Co-Chaperonen hat (Holmes et al., 2008).

Die Tatsache, dass Aha1 nicht essentiell für das Promastigotenstadium von *L. donovani* ist, wirft die Frage auf, ob Aha1 für das pathogene Stadium der Parasiten, den Amastigoten, benötigt wird. Hierzu wurde eine *in vitro* Stadiendifferenzierung mit *L. donovani* Wildtyp, Aha1-überexprimierenden Zellen, Aha1-Nullmutanten sowie Nullmutanten mit *gene add back* Hintergrund durchgeführt. Die mikroskopische Analyse ergab, dass sich alle Mutanten wie Wildtyp-Zellen umwandeln und es keine sichtbaren Verzögerungen in der Stadiendifferenzierung gab (Abb. 15). Zudem zeigten die getesteten Aha1-Mutanten Wildtyp-ähnliches Wachstum bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C (Abb. 18) sowie bei angesäuertem Medium (pH 5,5, Abb. 19). Daraus lässt sich folgern, dass Aha1 auch für das axenische Amastigotenstadium des Parasiten nicht essentiell ist.

Dennoch ergab sich ein morphologisches und Wachstumsdefizit für Aha1-Nullmutanten. Aha1^{-/-}-Parasiten wiesen verkürzte Flagella unter physiologischen Bedingungen (Abb. 16B) und schlechteres Wachstum im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unter allen getesteten Bedingungen auf (Abb. 17-19). Die Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass das Defizit der Aha1-Nullmutanten auf die doppelte Transfektion der Parasiten zurückzuführen ist.

Im Widerspruch zu den erzielten Ergebnissen von Aha1^{-/-} in *L. donovani* stehen Untersuchungen zu Aha1-Deletionen in anderen Organismen. Aha1-Nullmutanten weisen sowohl in der Hefe (Lotz et al., 2003; Panaretou et al., 2002) als auch in *N. crassa* (Gu

et al., 2016) sensitives Wachstum unter erhöhter Temperatur auf. Somit ist Aha1 in diesen Organismen ebenfalls nicht essentiell unter Standard-Wachstumsbedingungen, doch und im Gegensatz zu Leishmanien, relevant bei erhöhten Temperaturen. Dies liegt möglicherweise an der zuvor beschriebenen Tatsache, dass erhöhte Temperaturen zu einem natürlichen Leishmanien-Lebenszyklus gehören und nicht als Stress anzusehen sind. Im Gegensatz dazu wird Aha1 in anderen Organismen im Sinne der Hitzeschock-Antwort benötigt.

4.4. Schützender Effekt von Aha1 unter Ethanol-Stress

Trotz der Beobachtung, dass Aha1 weder essentiell für das Promastigotenstadium noch in der axenischen Amastigote ist, zeigte sich ein Effekt der Mutanten unter Ethanol-Stress. Die Wachstumsversuche ergaben, dass Aha1-Nullmutanten sensitiv gegen Behandlung mit Ethanol waren (Abb. 20). Dieser Phänotyp konnte durch die Überexpression von Aha1 komplementiert werden. Die Überexpression von Aha1 im Wildtyp- sowie Nullmutanten-Hintergrund schützt die Parasiten unter Behandlung mit Ethanol. In einer morphologischen Analyse der behandelten Parasiten konnte der Phänotyp bestätigt werden. Aha1-Nullmutanten weisen unter Ethanol-Stress verkürzte Zellkörper auf, während die Überexpression von Aha1 auch in diesem Fall den Phänotyp komplementiert (Abb. 22A).

Ethanol kann Hitze als Differenzierungssignal bei der Umwandlung der Parasiten in Amastigote ersetzen (Barak et al., 2005). Dieser Effekt wurde zuvor in der Hefe beschrieben. Hier ist Ethanol ein Stress-induzierender Wirkstoff. Zudem kommt es zu einer veränderten Plasmamembran-Zusammensetzung (Piper, 1995), was wiederum Auswirkungen auf den Protonentransport darüber hat (Cartwright et al., 1986). Weiterhin wurde beschrieben, dass Ethanol ähnliche Effekte wie Hitze auf Zellen hat und es zu einer verstärkten Denaturierung von Proteinen durch die Ethanol-Behandlung kommt. Ethanol stört somit die Proteinfaltung, was zur Induktion von Hitzeschockproteinen führt. Die Hitzeschock-Antwort entsteht also durch die verstärkte zelluläre Proteinfaltung (Piper, 1995; Trotter et al., 2002).

Die Daten lassen den Schluss zu, dass die Behandlung mit Ethanol zur Denaturierung von Proteinen führt und somit Hitze- bzw. Proteinfaltungstress imitiert (Barak et al., 2005). Möglicherweise geschieht dies durch die Störung des Hsp90-Co-Chaperonen-

Gleichgewichts. Damit spielt *L. donovani* Aha1 eine Rolle im Schutz der Membranen vor Ethanol durch die Aktivierung der Hsp90-Funktion sowie vor dem durch Ethanol-induzierten Proteinfaltungstress.

Auch für andere Organismen wurde beschrieben, dass Aha1 eine direkte Rolle in der Proteinfaltung spielt. So führt die Deletion von Aha1 in der Hefe zu einer verminderten Aktivität des Hsp90-Klientenproteins v-Src (Panaretou et al., 2002). Zudem ergaben Untersuchungen der Aha1-Nullmutanten sowie Überexpression von Aha1 in der Hefe und humanen Zellen, dass Aha1 in die Aktivierung eines weiteren Hsp90-Klientenproteins, dem Glucocorticoid-Rezeptor, involviert ist (Harst et al., 2005). Eine Studie von Tripathi und Mitarbeitern (2014) zeigte weiterhin, dass das humane Aha1 die Aggregation von Stress-denaturierten Proteinen verhindert. Dieser Effekt ist auf eine Sequenz von 22 Aminosäuren am N-Terminus von Aha1 zurückzuführen. Das Hefe-Aha1 besitzt diese N-terminale Sequenz nicht und weist somit auch keine Chaperonen-Aktivität auf. Dennoch hat diese Aminosäuresequenz keinen Einfluss auf die Aktivierung der Hsp90-ATPase-Aktivität durch Aha1. Somit wirkt das humane Aha1 als eigenständiges Chaperon, das unabhängig von Hsp90 die Aggregation von Klientenproteinen verhindert.

Interessanterweise weist das *L. donovani* Aha1 eine 77 % Übereinstimmung mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des humanen Aha1 auf. Somit stellt sich die Frage, ob Aha1 in *L. donovani* durch die Aktivität von Hsp90 Einfluss auf die Faltung von Klientenproteinen hat oder ebenfalls als eigenständiges Chaperon agiert, wie es für das humane Aha1 beschrieben wurde (Tripathi et al., 2014).

4.5. Unterschiedliche Auswirkungen der RAD- und GA-Behandlung auf die Aha1-abhängige Proliferation

Die ATP-Strukturanaloga Radicicol und Geldanamycin konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindungstasche von Hsp90. Durch Bindung hemmen sie die Aktivität von Hsp90 und verhindern die Aktivierung der Klientenproteine. Trotz gleicher Wirkung unterscheidet sich die Orientierung der beiden Hsp90-Inhibitoren in der ATP-Bindungstasche (Roe et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Hsp90-Inhibitoren auf die Proliferation von Aha1 und dem putativen Antagonisten P23 in *L. donovani* untersucht. Während

Aha1 die Hsp90-ATPase-Aktivität aktiviert, hemmt P23 diese. Die Effekte von RAD und GA wurden für P23 bereits analysiert (Hombach et al., 2015).

Interessanterweise führte die RAD-Behandlung der Parasiten zu sensitivem Wachstum der Aha1-überexprimierenden Leishmanien (Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/-/+}; Abb. 25). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Aha1-Überexpression zu einer Überstimulierung der Hsp90-ATPase-Aktivität führt. Möglicherweise ist die ATP-Bindungstasche von Hsp90 dadurch zugänglicher für RAD und es kommt zu einer stärkeren Bindung des Inhibitors. Dafür spricht das Ergebnis, dass P23-Nullmutanten hypersensitives Wachstum unter RAD-Behandlung aufweisen. Dementsprechend wird die Hsp90-ATPase-Aktivität durch das Fehlen von P23 verstärkt und es kommt zu der zuvor beschriebenen besseren Zugänglichkeit von RAD und dem damit verbundenen RAD-sensitiven Phänotyp. Dagegen weisen Aha1-Nullmutanten Wildtyp-ähnliches Wachstum unter RAD-Behandlung auf. Das gleiche Ergebnis wurde für die Überexpression von P23 beobachtet. Möglicherweise ist die ATPase-Aktivität bei diesen Mutanten reduziert und es kommt zu einem verminderten Zugang für RAD. Zusätzlich wurden Mutanten getestet, die beide Co-Chaperonen überexprimieren. Aufschlussreich ist, dass die Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+}-Parasiten einen intermediären Phänotyp unter RAD-Behandlung aufwiesen. Der Befund legt den Schluss nahe, dass es hierbei zu einem antagonistischen Effekt von Aha1 und P23 kommt.

Bislang wurden keine Studien zu RAD-behandelten Aha1-Nullmutanten in anderen Organismen publiziert. Die Befunde für P23 hingegen bestätigen bereits veröffentlichte Analysen in *L. donovani* (Hombach et al., 2015) und der Hefe (Forafonov et al., 2008). Generell wird postuliert, dass Aha1 und P23 im Hsp90-Zyklus antagonistisch agieren (Rehn und Buchner, 2015), was durch die erzielten Befunde mit RAD ebenfalls bestätigt würde. Bekannt ist, dass Aha1 und P23 in der Hefe (Harst et al., 2005; Li et al., 2013) und in *P. falciparum* (Chua et al., 2012) direkt um die Bindung an Hsp90 konkurrieren.

Aus weiteren Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass der Hsp90-Inhibitor GA einen gegenteiligen Effekt im Vergleich zu RAD auf die Proliferation von Aha1-Nullmutanten oder -überexprimierenden Zellen hat. Unter GA-Behandlung wiesen sowohl Aha1-Nullmutanten als auch P23-Nullmutanten sensitives Wachstum auf (Abb. 26). Die Überexpression von Aha1 oder P23 in *L. donovani* hingegen führte zu Wildtyp-ähnlichem Wachstum. Somit waren unter Behandlung der Parasiten mit GA ähnliche Effek-

te für Aha1- und P23-Mutanten zu erkennen. Auch die gleichzeitige Überexpression beider Co-Chaperonen stützt die Befunde. Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+}-Parasiten wuchsen signifikant besser als Wildtyp-Zellen. Beide Co-Chaperonen schützen Hsp90 somit vor GA-induziertem Stress. Dies deutet auf einen additiven Effekt von Aha1 und P23 unter GA-Behandlung hin. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindung von GA an die Hsp90 ATP-Bindungstasche durch die Aha1- und P23-Überexpression gestört ist.

Diese Effekte wurden ebenfalls für andere Organismen beschrieben. Der *knock-down* des humanen Aha1 erhöht die Sensitivität gegenüber 17-AAG (GA-Analagon) und vermindert die Klientenprotein-Aktivierung. Die Überexpression des humanen Aha1 hingegen hat keinen Effekt auf die Sensitivität gegenüber dem GA-Analagon (Holmes et al., 2008). Die Sensitivität der GA-behandelten P23-Nullmutanten wurde sowohl für *L. donovani* (Hombach et al., 2015) als auch für die Hefe (Forafonov et al., 2008) beschrieben. Im Gegensatz dazu stehen die beschriebenen Effekte der GA-Behandlung von *N. crassa*. Aha1- und P23-Nullmutanten weisen in dem Pilz Wildtyp-ähnliches Wachstum unter GA-Behandlung auf (Gu et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RAD und GA gegenteilige Effekte auf die Aha1-abhängige Proliferation haben. Dies spiegelt möglicherweise die unterschiedlichen Bindungsmechanismen von RAD und GA innerhalb der ATP-Bindungsdomäne von Hsp90 wider. Eine Erklärung ist, dass die Veränderung der Hsp90-ATPase-Aktivität den Zugang für Hsp90-Inhibitoren erhöht. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Überexpression der Co-Chaperonen Aha1 und P23 vor Bindung der Inhibitoren schützt.

Die Unterschiede zwischen RAD und GA liegen, abgesehen von der Struktur, im Bindungsverhalten an Hsp90. So wurde beschrieben, dass eine Hsp90-Mutation in der Hefe die Bindung von GA teilweise hemmt, während RAD gut binden kann (Schulte et al., 1999). Zudem zeigt eine RAD-resistente Hsp90-Variante keine spezifische Resistenz gegenüber GA (Hombach et al., 2013; Prodromou et al., 2009). Umgekehrt kann Hsp90-Überexpression gegen GA, aber nicht gegen RAD schützen (Hombach et al., 2013; Wiesgigl und Clos, 2001a). Außerdem binden beide Inhibitoren ähnlich an die Hsp90 ATP-Bindungstasche, unterscheiden sich dennoch dadurch, dass GA drei Bindungsstellen mehr als RAD aufweist (Grenert et al., 1997; Roe et al., 1999; Taldone et al., 2009).

4.6. Fehlen von Aha1 führt zu reduzierten Parasitenlasten in infizierten Makrophagen

Leishmanien weisen einen biphasischen Lebenszyklus auf und verbringen den Großteil ihres Lebens als pathogene, intrazelluläre Amastigote im Säugetierwirt. Somit ist es von großer Bedeutung die Proliferation von Aha1-defizienten Zellen im intrazellulären Stadium zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion von Aha1 die initiale Aufnahme der Leishmanien nicht stört; die Parasitenlast gleicht der der Wildtyp-Zellen (Abb. 27A). Achtundvierzig Stunden nach Infektion ist ein verändertes Bild zu erkennen. Mit Aha1-Nullmutanten infizierte Makrophagen weisen eine 20-prozentige Reduktion der Parasitenlast im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 27B). Dies deutet somit an, dass Aha1 Einfluss auf das intrazelluläre Überleben der Parasiten hat und eine Rolle im Säugetierstadium des Parasiten spielt. Die Überexpression von Aha1 (Aha1^{+/+/+} und Aha1^{-/+}) hingegen führt zu einer erhöhten Parasitenlast von Makrophagen 4,5 h und 48 h nach Infektion. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Überexpression den Parasiten einen Vorteil verleiht und dafür sorgt, dass diese besser von Makrophagen aufgenommen werden.

Im Gegensatz dazu hat das Fehlen des putativen Antagonisten P23 keinen Einfluss auf die Parasitenlast infizierter Makrophagen (Hombach et al., 2015). Weitere Studien von Aha1-Nullmutanten in anderen protozoischen Parasiten fehlen. Befunde ergaben jedoch, dass Leishmanien in Exosomen Proteine sekretieren, die immun-modulierende Funktionen im Säugetierwirt haben (Silverman et al., 2010a; Silverman et al., 2010b). Neben Hsp100 (Silverman et al., 2010b) gehören das *L. major* P46 (Bifeld et al., 2015), Cyp40 (Yau et al., 2016) sowie der *antimony resistance marker* 56 (Tejera Nevado et al., 2016) zu den Virulenzfaktoren, die Leishmanien mittels Exosomen sekretieren. Daraus ergibt sich die Frage, ob Aha1 in *Leishmania* spp. ebenfalls durch Exosomen sekretiert wird.

4.7. Aha1 ist Teil der Exosomenbeladung

Auf Basis der Befunde, dass Aha1 eine Rolle bei der *in vitro* Infektion von Makrophagen spielt, wurde eine Sekretomanalyse von *L. donovani* durchgeführt. Diese ergab, dass Aha1 sekretiert wird (Abb. 28, unten) und Teil der Exosomenbeladung ist (Abb. 29, un-

ten). Hsp90 wurde ebenfalls in *L. donovani* Exosomen nachgewiesen (Silverman et al., 2010a). Dies legt den Schluss nahe, dass Aha1 sekretiert wird, um im Hsp90 Multi-Chaperonen-Komplex mitzuwirken. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Aha1 eine andere, eigenständige Funktion erfüllt.

Die meisten exosomalen Proteine sind zytosolisch lokalisiert (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010a), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Abb. 9A). In vorherigen Studien konnte Aha1 jedoch nicht nachgewiesen werden (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010a). Möglicherweise ist der Grund dafür, dass Aha1 in einer geringen Konzentration in Exosomen vorliegt und unter der Nachweisgrenze der Massenspektrometrie lag. Dennoch wurde auch das humane Aha1 in sekretorischen Vesikeln nachgewiesen. Dort kolokalisiert es zudem mit Hsp90 α (Ghosh et al., 2015). Dasselbe Ergebnis wurde für hypoxische Tumorzellen gefunden: Aha1 ist dort ebenfalls Teil der Exosomen und Hsp90/Aha1-Komplexe wurden darin nachgewiesen (Park et al., 2010).

Zusammenfassend schlieÙe ich, dass Aha1 in *L. donovani* durch Exosomen in die Wirtszelle sekretiert wird. Dort hat es einen pro-parasitischen Einfluss. Somit lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss zu, dass Aha1 immun-modulierende Funktionen im Wirt hat und den Parasiten dadurch einen Vorteil verschafft.

4.8. Ausblick

Aufgrund der Beobachtung, dass das humane Aha1 mehrheitlich unabhängig von Hsp90 in der Zelle vorliegt (Tripathi et al., 2014), stellt sich die Frage, ob dies auch für *L. donovani* zutrifft. Durch weitere Ko-Präzipitationen könnten zusätzliche Aha1-Interaktionspartner identifiziert werden. Eine Erklärung dafür, dass das humane Aha1 frei in der Zelle vorliegt, ist, dass es eine eigene Chaperonen-Aktivität aufweist (Tripathi et al., 2014). Die Aha1-Sequenz, die dafür nötig ist, ist in Leishmanien konserviert. Zudem sind Aha1-Nullmutanten sensitiv gegenüber Ethanol-Stress. Daher könnte die Chaperonen-Aktivität des *L. donovani* Aha1 durch die Etablierung eines Luciferase-Tests überprüft werden (Batista et al., 2015; Schumacher et al., 1994).

Für eine detailliertere Analyse der rekombinanten *L. donovani* Stämme (Aha1^{+/+/+}, Aha1^{-/-}, Aha1^{-/-/+}, P23^{+/+/+}, P23^{-/-} und Aha1^{+/+/+} + P23^{+/+/+}) könnte ein ATPase-Test etabliert werden. Die Untersuchung der Hsp90-ATPase-Aktivitäten könnte hilfreich sein, um die gegenteiligen Auswirkungen der RAD- und GA-Behandlung zu verstehen.

Bislang konnten keine Hsp90-Klientenproteine in Leishmanien identifiziert werden. Da diese Organismen-spezifisch reguliert werden, ist es essentiell für das Verständnis des *Leishmania*-Foldosoms, Hsp90-Klientenproteine zu identifizieren. Damit könnte überprüft werden, ob Aha1 an deren Aktivierung und Regulation beteiligt ist, wie es in der Hefe und für das humane Aha1 beobachtet wurde (Harst et al., 2005; Holmes et al., 2008; Panaretou et al., 2002; Tripathi et al., 2014; Wang et al., 2006).

Die posttranslationale Regulation von Hsp90 spielt eine große Rolle bei der Aktivität des Multi-Chaperonen-Komplexes. Untersuchungen in der Hefe ergaben, dass die Casein Kinase 2 Hsp90 an Position 22 (Hsp90_T22) phosphoryliert. Die phosphomimetische Mutation an dieser Position (Hsp90_T22E) hatte sowohl eine reduzierte Hsp90-ATPase-Aktivität und veränderte Chaperonen-Funktion zur Folge als auch einen Einfluss auf die Interaktion mit Aha1 und Cdc37. Die Überexpression von Aha1 in dieser Mutante stimulierte die ATPase-Aktivität, kompensierte für die funktionalen Defekte der Mutante und stellte die Co-Chaperonen-Interaktion wieder her. Die Phosphorylierung von Hsp90_T22 hat somit einen Effekt auf die Chaperonen-Aktivität; möglicherweise durch die modulierende Interaktion mit Aha1 und Cdc37 (Mollapour et al., 2011). Untersuchungen dieser Mutante in *L. donovani* basierten auf einem etablierten System, das

die Analyse eines konditionalen Phänotyps erlaubt (Hombach et al., 2013). Hierbei hatten phosphomimetische und dephosphorylierende Mutationen (Hsp90rr_T21I/D) einen Wachstumsdefekt unter RAD-Behandlung zur Folge (Hombach-Barrigah et al., unveröffentlichte Daten). Nun wäre der Frage nachzugehen, inwieweit Hsp90-Mutationen die Interaktion mit Co-Chaperonen wie Aha1 beeinflussen. Es wäre also interessant, Hsp90rr_T21I/D in Mutanten zu exprimieren, die eine Aha1-Deletion aufweisen oder Aha1 überexprimieren. Das Wachstum müsste unter RAD getestet werden, um zu klären, ob Aha1 für die Defekte (Hombach-Barrigah et al., unveröffentlichte Daten) kompensieren kann. Mithilfe von Ko-Präzipitationen könnte überprüft werden, ob der beschriebene Phänotyp durch die Interaktion mit Aha1 entstand. Eine weitere Mutation von Hsp90 (T101I) zeigte ähnliche Effekte in der Hefe (Siligardi et al., 2004) und in *L. donovani* (Hombach-Barrigah et al., unveröffentlichte Daten), sodass auch diese Mutante für Interaktionsnachweise herangezogen werden könnte.

5. Literaturverzeichnis

Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. und Team, W. H. O. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.

Angel, S. O., Matrajt, M. und Echeverria, P. C. (2013). A review of recent patents on the protozoan parasite HSP90 as a drug target. *Recent Pat Biotechnol* 7, 2-8.

Angel, S. O., Requena, J. M., Soto, M., Criado, D. und Alonso, C. (1996). During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* 62, 45-56.

Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N. und Zilberstein, D. (2005). Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol* 141, 99-108.

Batista, F. A., Almeida, G. S., Seraphim, T. V., Silva, K. P., Murta, S. M., Barbosa, L. R. und Borges, J. C. (2015). Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. *FEBS J* 282, 388-406.

Batista, F. A., Seraphim, T. V., Santos, C. A., Gonzaga, M. R., Barbosa, L. R., Ramos, C. H. und Borges, J. C. (2016). Low sequence identity but high structural and functional conservation: The case of Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop/Sti1) of *Leishmania braziliensis*. *Arch Biochem Biophys* 600, 12-22.

Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., Clos, J. und Bruchhaus, I. (2003). Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3, 1811-1829.

Bifeld, E., Chrobak, M., Zander, D., Schleicher, U., Schönian, G. und Clos, J. (2015). Geographical sequence variation in the *Leishmania* major virulence factor P46. *Infect Genet Evol* 30, 195-205.

Bifeld, E. und Clos, J. (2015). The genetics of *Leishmania* virulence. *Med Microbiol Immunol* 204, 619-634.

- Bifeld, E., Tejera Nevado, P., Bartsch, J., Eick, J. und Clos, J. (2016). A versatile qPCR assay to quantify trypanosomatidic infections of host cells and tissues. *Med Microbiol Immunol* 205, 449-458.
- Brandau, S., Dresel, A. und 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.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24, 136-141.
- Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bukau, B., Weissman, J. und Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.
- Cartwright, C. P., Juroszek, J.-R., Beavan, M. J., Ruby, F. M. S., De Morais, S. M. F. und Rose, A. H. (1986). Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 132, 369-377.
- Chrobak, M., Förster, S., Meisel, S., Pfefferkorn, R., Förster, F. und Clos, J. (2012). *Leishmania donovani* HsIV does not interact stably with HsIU proteins. *Int J Parasitol* 42, 329-339.
- Chua, C. S., Low, H., Lehming, N. und Sim, T. S. (2012). Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 233-245.
- Clos, J. und 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.
- Clos, J., Brandau, S. und Hoyer, C. (1998). Chemical stress does not induce heat shock protein synthesis in *Leishmania donovani*. *Protist* 149, 167-172.
- Clos, J. und Choudhury, K. (2006). Functional cloning as a means to identify *Leishmania* genes involved in drug resistance. *Mini Rev Med Chem* 6, 123-129.

- Clos, J. und Hombach, A. (2015). Heat Shock Proteins of Leishmania: Chaperones in the Driver's Seat. *Leishmania: Current Biology and Control*, 17-36.
- Clos, J. und Krobitsch, S. (1999). Heat Shock as a Regular Feature of the Life Cycle of Leishmania Parasites. *American Zoologist* 39, 848-856.
- Cruz, A. und Beverley, S. M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* 348, 171-173.
- Cruz, A., Coburn, C. M. und Beverley, S. M. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7170-7174.
- Debnath, A., Shahinas, D., Bryant, C., Hirata, K., Miyamoto, Y., Hwang, G., Gut, J., Renslo, A. R., Pillai, D. R., Eckmann, L., Reed, S. L. und McKerrow, J. H. (2014). Hsp90 inhibitors as new leads to target parasitic diarrheal diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4138-4144.
- Descoteaux, A., Avila, H. A., Zhang, K., Turco, S. J. und Beverley, S. M. (2002). Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J* 21, 4458-4469.
- Dostalova, A. und Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 5, 276.
- Englund, P. T., Hajduk, S. L. und Marini, J. C. (1982). The molecular biology of trypanosomes. *Annu Rev Biochem* 51, 695-726.
- Feder, M. E. und Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-282.
- Folgueira, C. und Requena, J. M. (2007). A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* 31, 359-377.
- Forafonov, F., Toogun, O. A., Grad, I., Suslova, E., Freeman, B. C. und Picard, D. (2008). p23/Sba1p protects against Hsp90 inhibitors independently of its intrinsic chaperone activity. *Mol Cell Biol* 28, 3446-3456.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J. C. und Requena,

- J. M. (2013). Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect Genet Evol* 18, 229-237.
- Fulton, J. D. und Joyner, L. P. (1949). Studies on protozoa; the metabolism of *Leishman-Donovan* bodies and flagellates of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 43, 273-286, pl.
- Gething, M. J. (1997). *Guidebook to molecular chaperones and protein folding factors* (Oxford: Oxford University Press).
- Ghosh, S., Shinogle, H. E., Garg, G., Vielhauer, G. A., Holzbeierlein, J. M., Dobrowsky, R. T. und Blagg, B. S. (2015). Hsp90 C-terminal inhibitors exhibit antimigratory activity by disrupting the Hsp90 α /Aha1 complex in PC3-MM2 cells. *ACS Chem Biol* 10, 577-590.
- Grenert, J. P., Sullivan, W. P., Fadden, P., Haystead, T. A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H. J., Schulte, T. W., Sausville, E., Neckers, L. M. und Toft, D. O. (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 272, 23843-23850.
- Gu, X., Xue, W., Yin, Y., Liu, H., Li, S. und Sun, X. (2016). The Hsp90 Co-chaperones Sti1, Aha1, and P23 Regulate Adaptive Responses to Antifungal Azoles. *Front Microbiol* 7, 1571.
- Harst, A., Lin, H. und Obermann, W. M. (2005). Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem J* 387, 789-796.
- Hessling, M., Richter, K. und Buchner, J. (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16, 287-293.
- Holmes, J. L., Sharp, S. Y., Hobbs, S. und Workman, P. (2008). Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 68, 1188-1197.
- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M. und Clos, J. (2013). The Hsp90-Sti1 interaction

is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell Microbiol* 15, 585-600.

Hombach, A., Ommen, G., MacDonald, A. und Clos, J. (2014). A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. *J Cell Sci* 127, 4762-4773.

Hombach, A., Ommen, G., Sattler, V. und Clos, J. (2015). *Leishmania donovani* P23 protects parasites against HSP90 inhibitor-mediated growth arrest. *Cell Stress Chaperones* 20, 673-685.

Hübel, A., Brandau, S., Dresel, A. und Clos, J. (1995). A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 70, 107-118.

Hübel, A. und Clos, J. (1996). The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp Parasitol* 82, 225-228.

Hübel, A., Krobitch, S., Hörauf, A. und Clos, J. (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17, 5987-5995.

Hunter, K. W., Cook, C. L. und Hayunga, E. G. (1984). Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 125, 755-760.

Jackson, S. E. (2013). Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem* 328, 155-240.

Johnson, J. L. und Brown, C. (2009). Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones* 14, 83-94.

Joshi, M., Dwyer, D. M. und 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.

Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22, 439-445.

Kaye, P. und Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9, 604-615.

Krobitch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hübel, A. und Clos, J. (1998).

- Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* 273, 6488-6494.
- Krobitch, S. und Clos, J. (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4, 191-198.
- Larreta, R., Soto, M., Alonso, C. und Requena, J. M. (2000). *Leishmania infantum*: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Exp Parasitol* 96, 108-115.
- Lawrence, F. und Robert-Gero, M. (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4414-4417.
- Li, J., Richter, K. und Buchner, J. (2011). Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol* 18, 61-66.
- Li, J., Richter, K., Reinstein, J. und Buchner, J. (2013). Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol* 20, 326-331.
- Li, J., Soroka, J. und Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1823, 624-635.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S. (1992). Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev* 2, 748-755.
- Lotz, G. P., Lin, H., Harst, A. und Obermann, W. M. (2003). Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J Biol Chem* 278, 17228-17235.
- MacFarlane, J., Blaxter, M. L., Bishop, R. P., Miles, M. A. und Kelly, J. M. (1990). Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 190, 377-384.
- Mann, H. B. und Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether One of 2 Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other. *Ann Math Stat* 18, 50-60.
- Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Vlasic, I., Panaretou, B., Piper, P. W. und Pearl, L. H. (2004). Structural basis for recruitment of

- the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J* 23, 1402-1410.
- Mollapour, M. und Neckers, L. (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta* 1823, 648-655.
- Mollapour, M., Tsutsumi, S., Truman, A. W., Xu, W., Vaughan, C. K., Beebe, K., Konstantinova, A., Vourganti, S., Panaretou, B., Piper, P. W., Trepel, J. B., Prodromou, C., Pearl, L. H. und Neckers, L. (2011). Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Mol Cell* 41, 672-681.
- Morales, M. A., Watanabe, R., Dacher, M., Chafey, P., Osorio y Fortea, J., Scott, D. A., Beverley, S. M., Ommen, G., Clos, J., Hem, S., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namané, A. und Spath, G. F. (2010). Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8381-8386.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. und Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Myler, P. J. und Fasel, N. (2008). *Leishmania : after the genome* (Wyomondham: Caister Academic).
- Nathan, D. F., Vos, M. H. und Lindquist, S. (1999). Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1409-1414.
- Nühs, A., Schäfer, C., Zander, D., Trübe, L., Tejera Nevado, P., Schmidt, S., Arevalo, J., Adai, V., Maes, L., Dujardin, J. C. und Clos, J. (2014). A novel marker, ARM58, confers antimony resistance to *Leishmania* spp. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4, 37-47.
- Ommen, G. (2009). Charakterisierung putativer Co-Chaperonen des Parasiten *Leishmania donovani* (Ross, 1903). 121.
- Ommen, G., Chrobak, M. und Clos, J. (2010). The co-chaperone SGT of *Leishmania donovani* is essential for the parasite's viability. *Cell Stress Chaperones* 15, 443-455.
- Ommen, G., Lorenz, S. und Clos, J. (2009). One-step generation of double-allele gene replacement mutants in *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 39, 541-546.

- Pallavi, R., Roy, N., Nageshan, R. K., Talukdar, P., Pavithra, S. R., Reddy, R., Venketesh, S., Kumar, R., Gupta, A. K., Singh, R. K., Yadav, S. C. und Tatu, U. (2010). Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J Biol Chem* 285, 37964-37975.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Millson, S. H., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P. W., Pearl, L. H. und Prodromou, C. (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* 10, 1307-1318.
- Park, J. E., Tan, H. S., Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S. K. und Sze, S. K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 9, 1085-1099.
- Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-496.
- Pearl, L. H. und Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75, 271-294.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. und Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.
- Petersen, A. L., Guedes, C. E., Versoza, C. L., Lima, J. G., de Freitas, L. A., Borges, V. M. und Veras, P. S. (2012). 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS One* 7, e49496.
- Piper, P. W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134, 121-127.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. und van der Merwe, K. J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest* 14, 323-327.

- Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J* 473, 2439-2452.
- Prodromou, C., Nuttall, J. M., Millson, S. H., Roe, S. M., Sim, T. S., Tan, D., Workman, P., Pearl, L. H. und Piper, P. W. (2009). Structural basis of the radicicol resistance displayed by a fungal hsp90. *ACS Chem Biol* 4, 289-297.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Roe, S. M., Piper, P. W. und Pearl, L. H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J* 19, 4383-4392.
- Rehn, A. B. und Buchner, J. (2015). p23 and Aha1. *Subcell Biochem* 78, 113-131.
- Retzlaff, M., Hagn, F., Mitschke, L., Hessling, M., Gugel, F., Kessler, H., Richter, K. und Buchner, J. (2010). Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Mol Cell* 37, 344-354.
- Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. und Pearl, L. H. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 42, 260-266.
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C. und Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* 21, 2129-2142.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R. W. und Zilberstein, D. (2008). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22, 590-602.
- Ross, R. (1903). Further Notes on Leishman's Bodies. *Br Med J* 2, 1401.
- Roy, N., Nageshan, R. K., Ranade, S. und Tatu, U. (2012). Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim Biophys Acta* 1823, 707-711.
- Rutherford, S. L. und Zuker, C. S. (1994). Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* 79, 1129-1132.

- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S. J. und 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. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**, 189-196.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. und Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. und Clos, J. (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* **1491**, 65-74.
- Schulte, T. W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T., Sugimoto, S., Nakano, H., Lee, Y. S., Simen, B. B., Argon, Y., Felts, S., Toft, D. O., Neckers, L. M. und Sharma, S. V. (1999). Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Mol Endocrinol* **13**, 1435-1448.
- Schumacher, R. J., Hurst, R., Sullivan, W. P., McMahon, N. J., Toft, D. O. und Matts, R. L. (1994). ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **269**, 9493-9499.
- Seraphim, T. V., Alves, M. M., Silva, I. M., Gomes, F. E., Silva, K. P., Murta, S. M., Barbosa, L. R. und Borges, J. C. (2013). Low resolution structural studies indicate that the activator of Hsp90 ATPase 1 (Aha1) of *Leishmania braziliensis* has an elongated shape which allows its interaction with both N- and M-domains of Hsp90. *PLoS One* **8**, e66822.
- Shahinas, D., Folefoc, A., Taldone, T., Chiosis, G., Crandall, I. und Pillai, D. R. (2013). A purine analog synergizes with chloroquine (CQ) by targeting *Plasmodium falciparum* Hsp90 (PfHsp90). *PLoS One* **8**, e75446.

- Shapira, M. und Pinelli, E. (1989). Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. *Eur J Biochem* 185, 231-236.
- Siligardi, G., Hu, B., Panaretou, B., Piper, P. W., Pearl, L. H. und Prodromou, C. (2004). Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* 279, 51989-51998.
- Silva, K. P., Seraphim, T. V. und Borges, J. C. (2013). Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. *Biochim Biophys Acta* 1834, 351-361.
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J. und Reiner, N. E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9, R35.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J. und Reiner, N. E. (2010a). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123, 842-852.
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M. A., McMaster, W. R., Foster, L. J., Levings, M. K. und Reiner, N. E. (2010b). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 185, 5011-5022.
- Singh, M., Shah, V. und Tatu, U. (2014). A novel C-terminal homologue of Aha1 co-chaperone binds to heat shock protein 90 and stimulates its ATPase activity in *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* 426, 1786-1798.
- Singh, N., Kumar, M. und Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 5, 485-497.
- Soroka, J., Wandinger, S. K., Mausbacher, N., Schreiber, T., Richter, K., Daub, H. und Buchner, J. (2012). Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation. *Mol Cell* 45, 517-528.
- Student (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 6, 1-25.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7

- RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.
- Taldone, T., Sun, W. und Chiosis, G. (2009). Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17, 2225-2235.
- Tejera Nevado, P., Bifeld, E., Hohn, K. und Clos, J. (2016). A Telomeric Cluster of Antimony Resistance Genes on Chromosome 34 of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 5262-5275.
- Tripathi, V., Darnauer, S., Hartwig, N. R. und Obermann, W. M. (2014). Aha1 can act as an autonomous chaperone to prevent aggregation of stressed proteins. *J Biol Chem* 289, 36220-36228.
- Trotter, E. W., Kao, C. M., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G. A. und Gray, J. V. (2002). Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 44817-44825.
- Ubeda, J. M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J. und Ouellette, M. (2014). Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite *Leishmania*. *PLoS Biol* 12, e1001868.
- Varela, M. R., Mollinedo-Gajate, C., Muro, A. und Mollinedo, F. (2014). The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine. *Acta Trop* 131, 32-36.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J. und Ouellette, M. (2007). A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6, 88-101.
- Wang, T., Bisson, W. H., Maser, P., Scapozza, L. und Picard, D. (2014). Differences in conformational dynamics between *Plasmodium falciparum* and human Hsp90 orthologues enable the structure-based discovery of pathogen-selective inhibitors. *J Med Chem* 57, 2524-2535.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D. M., Koulov, A. V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., Riordan, J. R., Kelly, J. W., Yates, J. R., 3rd

- und Balch, W. E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Skeiky, Y. A. und Reed, S. G. (1997). Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 89, 179-193.
- Whitesell, L. und Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 761-772.
- Whitley, D., Goldberg, S. P. und Jordan, W. D. (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 29, 748-751.
- Wiesgigl, M. und Clos, J. (2001a). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.
- Wiesgigl, M. und Clos, J. (2001b). The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol* 190, 27-31.
- Yau, W. L., Blisnick, T., Taly, J. F., Helmer-Citterich, M., Schiene-Fischer, C., Leclercq, O., Li, J., Schmidt-Arras, D., Morales, M. A., Notredame, C., Romo, D., Bastin, P. und Spath, G. F. (2010). Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e729.
- Yau, W. L., Lambertz, U., Colineau, L., Pescher, P., MacDonald, A., Zander, D., Retzlaff, S., Eick, J., Reiner, N. E., Clos, J. und Spath, G. F. (2016). Phenotypic Characterization of a *Leishmania donovani* Cyclophilin 40 Null Mutant. *J Eukaryot Microbiol* 63, 823-833.
- Yau, W. L., Pescher, P., MacDonald, A., Hem, S., Zander, D., Retzlaff, S., Blisnick, T., Rotureau, B., Rosenqvist, H., Wiese, M., Bastin, P., Clos, J. und Spath, G. F. (2014). The *Leishmania donovani* chaperone cyclophilin 40 is essential for intracellular infection independent of its stage-specific phosphorylation status. *Mol Microbiol* 93, 80-97.
- Zamora-Veyl, F. B., Kroemer, M., Zander, D. und Clos, J. (2005). Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania donovani*, CPN10. *Kinetoplastid Biol Dis* 4, 3.
- Zilberstein, D. und Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the develop-

ment of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol* 48, 449-470.

Zuehlke, A. D., Beebe, K., Neckers, L. und Prince, T. (2015). Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene* 570, 8-16.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α	alpha
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp, kb	Basenpaar, Kilobasen
BNITM	Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin
BSA	Rinderserumalbumin
$^{\circ}\text{C}$	Temperatur in Grad Celsius
CO_2	Kohlenstoffdioxid
D, kD	Dalton, Kilodalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
μF	Mikrofarad
FCS	Fötale Kälberserum
<i> fwd</i>	<i>forward</i>
g, mg, μg , ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GA	Geldanamycin
h, min, s, ms	Stunden, Minuten, Sekunden, Millisekunden
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure

IgG, IgY	Immunglobulin G/Immunglobulin Y
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L, mL, μ L	Liter, Milliliter, Mikroliter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
Ld	<i>Leishmania donovani</i>
M	Marker
m, cm, mm, μ m, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, μ M, nM	molar (mol L ⁻¹), millimolar (mmol L ⁻¹), mikromolar (μ mol L ⁻¹), nanomolar (nmol L ⁻¹)
M199	Medium 199
mA	Milliampere
MES	MOPS-EDTA-Saccharose
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mk	monoklonal
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NC	nicht-codierend
NH ₄	Ammonium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pk	polyklonal
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAD	Radicicol
<i>rev</i>	<i>reverse</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>super optimal broth</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V, kV	Volt, Kilovolt
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight/volume</i> (g Gewicht pro mL Volumen)
× g	Erdbeschleunigung

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 03. April 2017