

**Identifizierung stadienspezifischer Proteine von
Leishmania donovani [Ross, 1903] und
Charakterisierung einer Amastigoten-spezifischen
Thymidin Kinase**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Meike Bente

aus Hamburg

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 30. Juni 2006

Hamburg, den 12. Juni 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Leishmania</i> : Lebenszyklus und Invasionsmechanismen	1
1.2	Die wichtigsten Leishmaniosen und ihre Verbreitung	3
1.2.1	Kutane Leishmaniose	3
1.2.2	Diffuse kutane Leishmaniose	3
1.2.3	Mukokutane Leishmaniose (Espundia)	4
1.2.4	Viszerale Leishmaniose (Kala Azar)	4
1.2.5	Therapieformen	5
1.3	<i>In vitro</i> Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i>	6
1.4	Stadienspezifische Genexpression bei Leishmanien	7
1.5	Genregulation bei Kinetoplastiden	14
1.6	Identifizierung stadienspezifischer Proteine	16
1.7	Vergleichende Proteomanalysen	18
1.8	Zielsetzung	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Enzyme	23
2.1.3	Immunreagenzien	23
2.1.4	Oligonukleotide	23
2.1.5	Spezielle Geräte	24
2.1.6	Marker	25
2.1.7	Sonstige Materialien	25
2.1.8	Medien und Medienzusätze	26
2.1.8.1	LB-Medium	27
2.1.8.2	LB-Agar zur Herstellung von Agarplatten	27
2.1.8.3	Medienzusätze	27
2.1.9	Puffer und Lösungen	28
2.1.10	Organismen und Plasmide	30
2.1.10.1	Organismen	30
2.1.10.2	Plasmide	30

2.2 Methoden	31
2.2.1 Zellkultur	31
2.2.2 Einfrieren von Zellen	31
2.2.3 <i>In vitro</i> Stadiendifferenzierung	31
2.2.4 Zellernte	32
2.2.5 <i>In vitro</i> Infektion von peritonealen Exsudat Zellen	33
2.2.6 Kultivierung von Bakterien	33
2.2.7 Isolierung von Nukleinsäuren	34
2.2.7.1 Plasmid-Mini-Präparation	34
2.2.7.2 Plasmid-Maxi-Präparation	34
2.2.7.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>Leishmania spec.</i>	34
2.2.7.4 Isolierung von RNA aus <i>Leishmania spec.</i>	34
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.2.9 Enzymatische Modifikationen von DNA	35
2.2.9.1 Restriktionsanalysen von DNA	35
2.2.9.2 Dephosphorylierung freier 5'- Enden von DNA	35
2.2.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.9.4 <i>Fill-in</i> Reaktionen	36
2.2.9.5 Radioaktive Markierung von DNA	36
2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.11 Reinigen und Fällern von DNA	37
2.2.11.1 Elution aus Agarosegelen	37
2.2.11.2 Chloroformextraktion	37
2.2.11.3 Reinigung von PCR-Amplifikaten	38
2.2.11.4 Fällern von Nukleinsäuren	38
2.2.12 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	38
2.2.13 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	39
2.2.13.1 Northern-Blot-Analysen	39
2.2.13.2 Southern-Blot-Analysen	39
2.2.13.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	40
2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion	40
2.2.15 Sequenzierung von DNA	41
2.2.16 Transfektion von Leishmanien und Selektion rekombinanter Zellen	42
2.2.17 Vereinzelung von Zellen	42
2.2.18 Herstellung von Proteinextrakten aus Leishmanien	43
2.2.18.1 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakt für die eindimensionale Gelelektrophorese	43
2.2.18.2 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakt für die zweidimensionale Gelelektrophorese	43
2.2.18.3 Herstellung löslicher Proteinextrakte für die zweidimensionale Gelelektrophorese	44
2.2.19 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45

2.2.20	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
2.2.21	Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen	50
2.2.21.1	Coomassie Brilliant Blau-Färbung	50
2.2.21.2	Die kolloidale Coomassie-Blau-Färbung (nach V. Neuhoff)	50
2.2.21.3	Silberfärbung (nach J. Heukeshoven, R. Dernick)	51
2.2.21.4	Aufbewahrung	51
2.2.22	MALDI TOF MS	52
2.2.22.1	Probenvorbereitung	52
2.2.22.2	Massenspektrometrische Messungen	53
2.2.22.3	Datenbankanalyse	53
2.2.23	Western Blot: Transfer von Proteinen auf Membranen	54
2.2.24	Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen	54
2.2.25	Rekombinante Expression von <i>L. donovani</i> Proteinen	55
2.2.25.1	Überexpression in <i>E. coli</i>	55
2.2.25.2	Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie	55
2.2.26	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	56
2.2.27	Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY)	57
2.2.28	Mikroskopie	58
2.2.28.1	Fluoreszenzmikroskopie und Thymidin Kinase-Bromiduridin-Assay	58
2.2.28.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie	59
2.2.28.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Proteomanalyse von <i>L. donovani</i> während der <i>in vitro</i> Stadiendifferenzierung	60
3.1.1	Die <i>in vitro</i> Stadiendifferenzierung für <i>L. donovani</i>	60
3.1.2	Vergleichende Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese	60
3.1.3	Identifizierung der stadienspezifischen Proteine mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie	64
3.1.4	Einteilung regulierter <i>L. donovani</i> Proteine in funktionelle Kategorien	72
3.1.4.1	Stressantwort	74
3.1.4.2	Zytoskelett und Zellmembran	74
3.1.4.3	Energiestoffwechsel und Phosphorylierung	75
3.1.4.4	Zellzyklus und Proliferation	76
3.1.4.5	Aminosäurestoffwechsel	76
3.1.5	Auswahl Amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen	77
3.2	Strategie zur Charakterisierung ausgewählter Proteine respektive der kodierenden Gene	78
3.2.1	Klonierung der Gene	78
3.2.2	Überprüfen der genomischen Organisation	79
3.2.3	Northern Blot-Analysen: Vergleich der Transkriptionsmuster	79

3.2.4	Weitere Charakterisierung Amastigoten-spezifischer Proteine	81
3.3	Charakterisierung eines Amastigoten-spezifischen Proteins: Die putative Thymidin Kinase von <i>L. donovani</i>	82
3.3.1	Analyse der Aminosäuresequenz der <i>L. donovani</i> Thymidin Kinase	82
3.3.2	Rekombinante Expression von <i>Ldtk</i> und Generierung von Antikörpern	86
3.3.3	Proteinsynthese des <i>LdTK</i> während der <i>in vitro</i> Stadiendifferenzierung	87
3.3.4	Intrazelluläre Lokalisierung von <i>LdTK</i>	88
3.3.5	Generierung einer Δtk Deletions-Mutante	89
3.3.5.1	DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination	89
3.3.5.2	Amplifikation der 5'- und 3'- UTR	90
3.3.5.3	Transfektion und Selektion rekombinanter Klone	90
3.3.6	Überexpression von <i>ldtk</i> in <i>L. major</i> und Versuch der Rekonstitution der <i>LmΔtk</i> – Mutanten	94
3.3.7	Phänotypische Charakterisierung der <i>L. major</i> $\Delta tk^{+/n}$ - und <i>L. major</i> $\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten	97
3.3.7.1	Überprüfung der Thymidin Kinase-Aktivität durch Einbau von Bromid-Uridin in <i>LmΔtk</i> -Mutanten	97
3.3.7.2	Immunfluoreszenz-Analyse und Vergleich der Flagellenlängen bei <i>Lm$\Delta tk^{+/n}$</i> - und <i>Lm$\Delta tk^{p/n}$</i> -Mutanten	99
3.3.7.3	Elektronenmikroskopische Analyse	103
3.3.7.4	Rasterelektronenmikroskopische Analyse	104
3.3.7.5	Bestimmung der Wachstumsraten	105
3.3.7.6	<i>In vitro</i> -Infektion peritonealer Exsudat Zellen	106
3.4	Zusammenfassung der durchgeführten Arbeiten an den Amastigoten-spezifischen Proteinen <i>LdArfGap</i>-ähnliches Zink-Finger Protein, <i>LdArginin Kinase</i>, <i>LdNeg. Regulator des cdc42p</i>, <i>LdCAC14613</i> und <i>LdCAC33984</i>	110
4	DISKUSSION	114
4.1	Proteomanalyse der <i>in vitro</i> Stadiendifferenzierung von <i>L. donovani</i>	114
4.1.1	Analyse der Proteinmuster und die massenspektrometrische Identifizierung stadienspezifischer Proteine	114
4.1.1.1	Promastigoten-spezifische Proteine	119
4.1.1.2	Amastigoten-spezifische Proteine	120
4.1.2	Kriterien zur Auswahl Amastigoten-spezifischer Proteine zur näheren Charakterisierung	126
4.2	Thymidin Kinase: Vorkommen und Funktion	128
4.2.1	Analyse der Aminosäuresequenz von <i>LdTK</i>	131
4.2.2	Expressionsmuster der <i>LdTK</i> und Lokalisierung des Proteins im Cytosol	132
4.2.3	Generierung einer Δtk -Mutante	135
4.2.4	Phänotypische Veränderungen der Δtk -Mutanten	136

4.2.4.1	Morphologie und Wachstumsverhalten	136
4.2.4.2	Die Aktivität der Thymidin Kinase in <i>LmΔtk</i> -Mutanten:	141
4.2.4.3	Intrazelluläre Lokalisierung der TK in <i>LmΔtk</i> -Mutanten	142
4.2.4.4	<i>In vitro</i> Infektion peritonealer Exsudat Zellen	143
5	ZUSAMMENFASSUNG	146

1 Einleitung

1.1 *Leishmania* : Lebenszyklus und Invasionsmechanismen

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida. Namengebendes Merkmal dieser Ordnung ist der Kinetoplast, welcher einen färbbaren Abschnitt des Mitochondriums darstellt und ca. 15% der zellulären DNA enthält. Er liegt in unmittelbarer Nähe des Geißelbasalkörpers. Das in dieser Arbeit untersuchte parasitische Protozoon *Leishmania donovani* wurde 1903 - unabhängig voneinander - durch Sir William Leishman und Charles Donovan erstmals beschrieben und nach ihnen benannt (Fulton and Joyner 1949; Bailey and Bishop 1959).

Die Parasiten werden durch den Biss weiblicher Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* (semiaride und Savannengebiete Europas, Afrika und Asien) und *Lutzomyia* (Waldgebiete Zentral- und Südamerikas) auf den Säugerwirt (Mensch, Hund, Nagetiere) übertragen (Harms 1993).

Die Leishmanien zeichnen sich durch einen biphasischen Lebenszyklus aus. Im Insektenvektor existieren sie in promastigoter Form (sie leben nicht in der promastigoten Form) als 10-15 µm lange, begeißelte Zellen extrazellulär im Darmlumen. Mit der Übertragung auf den Säugerwirt wandeln sie sich in die 2-5 µm große amastigote Form um. Diese besitzt nur ein rudimentäres Flagellum und vermehrt sich intrazellulär im Phagolysosom der Wirtszelle.

Weibliche Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus*, *Lutzomyia* u.a. nehmen während einer Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt Makrophagen auf, die amastigote Stadien enthalten. Diese amastigoten Formen differenzieren sich im Mitteldarm der Sandmücke in 12-24 Stunden zu 10-20 µm langen, nicht-infektiösen, promastigoten Stadien. In der peritrophen Matrix, einer Membranfalte im Mitteldarm des Insekts, sind die Parasiten vor hydrolytischer Enzymaktivität geschützt (Pimenta, Turco et al. 1992). Um nicht aus dem Darm ausgeschieden zu werden, heften sich diese prozyklischen Formen über das Lipophosphoglykan (LPG), das Hauptoberflächenmolekül promastigoter Leishmanien, zwischen die Mikrovilli des Darmepithels und vermehren sich dort durch Zweiteilung (Pimenta, Turco et al. 1992). Die Anheftung erfolgt vektorspezifisch durch Polymorphismen

in terminalen Sacchariden des LPG (Sacks, Saraiva et al. 1994; Sacks, Pimenta et al. 1995). Nach 5-8 Tagen entwickeln sich die prozyklischen Leishmanien zu den hochgradig infektiösen metazyklischen Stadien. Während der Metazyklogenese kommt es zu Modifikationen des LPG, wodurch die Parasiten ihre Fähigkeit zur Anheftung an das Darmepithel verlieren (Pimenta, Turco et al. 1992; Sacks, Pimenta et al. 1995). Nach Ablösung vom Darm gelangen die Parasiten in Ösophagus und Pharynx der Sandmücke. Bei der nächsten Blutmahlzeit auf einem Säugerwirt regurgitiert die Sandmücke mit metazyklischen Stadien kontaminierten Darminhalt in die Stichwunde (Mehlhorn 1998). Dort sind die metazyklischen Stadien dem Immunsystem des Säugerwirts ausgesetzt. Die Aktivierung des Komplementsystems wird hier über den alternativen Weg eingeleitet. Die daraufhin gebildete C3/C5-Konvertase generiert u.a. den Komplementfaktor C3b, welcher den Parasiten über Bindung an Gp63- und LPG-Moleküle, zwei Hauptmembranbestandteile von Leishmanien, opsoniert. Über den Komplementfaktor wird der Parasit an einen spezifischen Makrophagen-Rezeptor (CR1, bzw. CR3) gebunden und phagozytiert (Puentes, Sacks et al. 1988). In dem durch Verschmelzung von Phagosom und Lysosomen entstandenen Phagolysosom differenzieren sich die metazyklischen Formen durch Regression des externen Flagellums, Reduzierung der Zellgröße und einiger Organellen zu den rundlichen, nur 2-5 µm langen amastigoten Stadien. Im Makrophagen findet eine starke Vermehrung der Amastigoten durch ständige Zweiteilung statt.

Induziert durch die Phagozytose werden im Makrophagen normalerweise verschiedene mikrozide Agentien, wie Wasserstoffperoxid, Superoxid, Stickstoffoxid und Lysozym freigesetzt (Janeway 1995). Doch die Amastigoten besitzen die Fähigkeit, die Auswirkungen des "*oxidative burst*" abzuschwächen (Passwell, Shor et al. 1994; Chakraborty, Mukherjee et al. 1996). Des Weiteren wird die Proteinkinase C, die ein Schlüsselenzym für den sogenannten "*oxidativen burst*" darstellt, durch LPG gehemmt. Außerdem sind LPG und weitere Enzyme des Parasiten, wie Gluthationperoxidase, Superoxiddismutase und Katalase am Abbau von Sauerstoffmetaboliten beteiligt (Murray 1982; Chan, Fujiwara et al. 1989). Lysosomale Enzyme und Hydrolasen werden durch LPG und Gp63 inaktiviert (Etges, Bouvier et al. 1986; Turco 1988). Die amastigoten Leishmanien können in der sauren Umgebung im Makrophagen intrazellulär einen neutralen pH-Wert aufrecht erhalten (Mukkada, Meade et al. 1985; Glaser, Baatz et al. 1988). Es können sich etwa 200 Parasiten ansammeln, bis der Makrophage reißt. Die Amastigoten werden frei und können neue Zellen befallen oder die infizierten Makrophagen werden bei der Blutmahlzeit von einer Sandmücke aufgenommen.

1.2 Die wichtigsten Leishmaniosen und ihre Verbreitung

Die Leishmaniosen sind auf vier Kontinenten vertreten und in 88 Ländern endemisch. Mit weltweit ca. 12 Millionen Infizierten und weiteren 350 Millionen in Risikogebieten lebenden Menschen ist die Leishmaniose eine bedeutende parasitäre Erkrankung (WHO, World Health Report, 2004). Beim Menschen lassen sich je nach Erregerspezies drei Formen der Krankheit unterscheiden, deren unterschiedliche Symptome und Verlaufsformen auch abhängig vom Immunstatus des Wirtes sind. Entsprechend dem Krankheitsbild spricht man von kutaner, mukokutaner und viszeraler Leishmaniose.

1.2.1 Kutane Leishmaniose

Die kutane Leishmaniose ist die häufigste Form der Erkrankung (50-75% aller Leishmaniosen-Neuinfektionen). Sie wird durch Infektion mit *L. tropica* und *L. major* (Mittelmeerraum, mittlerer Osten), sowie *L. aetiopica* (Äthiopien, Kenia, Sudan), aber auch Erreger des *L. braziliensis*-Komplexes (Süd- und Mittelamerika: kutane und mukokutane Leishmaniose) ausgelöst. Hier entsteht 3-5 Wochen nach dem Stich einer infizierten Sandmücke eine juckende Papel, die sich zu einer ulzerierenden Läsion entwickelt. Mögliche Komplikation ist eine Superinfektion der Wunde. Nach spontaner Heilung bleibt eine eingezogene Narbe zurück. Der Patient erwirbt eine mehrjährige Immunität gegen die auslösende Spezies.

1.2.2 Diffuse kutane Leishmaniose

In seltenen Fällen wird durch Erreger des *L. mexicana*-Komplexes (Mittelamerika, Venezuela, Kolumbien) sowie durch *L. aetiopica* (Äthiopien, Kenia, Sudan) bei Patienten mit Immundefekten eine diffuse kutane Leishmaniose ausgelöst. Dabei bilden Parasiten-haltige Makrophagen knotige Hautläsionen am ganzen Körper, die jedoch nicht ulzerieren. Diese Krankheitsform heilt nicht spontan und ist durch häufige Rezidive gekennzeichnet.

1.2.3 Mukokutane Leishmaniose (Espundia)

Während einer kutanen Leishmaniose, verursacht durch Erreger des *L. braziliensis*-Komplexes, oder auch erst Jahre später, kann es zu einer Invasion der nasopharyngealen Schleimhäute kommen, die daraufhin nekrotisieren. Auf diese Weise kann es zur vollständigen Zerstörung des Nasenseptums, des Gaumens, der Zunge und der Lippen kommen. 90% der Fälle treten in Brasilien, Bolivien und Peru auf (WHO, World Health Report, 2004).

1.2.4 Viszerale Leishmaniose (Kala Azar)

Die viszerale Leishmaniose, auch Kala Azar genannt, ist die schwerwiegendste Form. Hier kommt es zum Befall des gesamten retikulo-endothelialen Systems. Die Hauptsymptome sind Hepato- und Splenomegalie sowie Anämie. Aufgrund einer zunehmenden Depigmentierung bekommt die Haut einen Grauton, woher die Bezeichnung Kala Azar (schwarze Krankheit) in Indien rührt. Unbehandelt endet diese Krankheit in 90% der Fälle nach 1 bis 2 Jahren tödlich. Die Mortalitätsrate bei behandelten Patienten liegt bei 15%. Nach einer unzureichend behandelten viszeralen Leishmaniose können hypopigmentierte, d.h. nichtpigmentierte, Flecken der Haut besonders an Gesicht und Armen beobachtet werden, die Leishmanien enthalten. Diese Erscheinung wird als Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose bezeichnet und verschwindet bei erneuter Behandlung. Der Erreger dieser Krankheit ist *L. donovani* und die Hauptverbreitungsgebiete liegen in Bangladesch, Indien, Nepal, Sudan und Brasilien (Zijlstra, Musa et al. 2003; WHO 2004). Zudem stellen in Afrika und Südeuropa die *Leishmania*/HIV-Koinfektionen ein zunehmendes Problem dar. Im Mittelmeerraum ist *L. donovani infantum* als Auslöser für die kutane und auch viszerale Leishmaniose bekannt. Bei einer HIV-Koinfektion kommt es aufgrund der Immunsuppression immer zur Ausbildung einer viszeralen Leishmaniose (Gradoni, Scalone et al. 1996; Alvar, Canavate et al. 1997).

1.2.5 Therapieformen

Die Mittel der Wahl sind nach wie vor pentavalente Antimonpräparate. Am häufigsten werden Pentostam (Natriumantimonoglukonat) und Glucantim (N-Methylglucaminantimonat) eingesetzt, deren Wirkung auf der Hemmung von Purinnukleotidtriphosphaten beruht. Hier liegen die Heilungsraten bei 95%. Jedoch ist die Therapie mit zum Teil schweren Nebenwirkungen verbunden und wird durch zunehmende Resistenzentwicklung eingeschränkt. In einigen Regionen zeigen sich Resistenzen in 80% der Fälle (Sundar 2001). Erschwerend kommt hinzu, dass die Therapie stationär erfolgen muss. Bei Resistenz wurden alternativ bislang Pentamidin-Präparate gegeben, die auf den Kinetoplasten des Parasiten einwirken. Diese Therapieform verursacht ebenfalls schwere Nebenwirkungen, häufig sind Pankreasschädigungen bis hin zur Entwicklung eines Diabetes mellitus die Folge (Harms 1993). Daneben kommt Amphotericin B zum Einsatz. Dessen Wirkung beruht auf der Inhibierung der Ergosterol-Synthese, welches ein Bestandteil der *Leishmania*-Membran ist. Neben der üblichen Infusionstherapie wurde mit liposomalem Amphotericin B eine Applikationsmöglichkeit mit geringerer Toxizität erprobt. Aufgrund der extrem hohen Kosten ist dieses Medikament jedoch keine echte Alternative zu den herkömmlichen Medikamenten.

Miltefosin ist ein neu entwickeltes Medikament, das in klinischen Studien getestet und in Indien bereits zugelassen ist. Es zeigt gute Heilungsraten: 96% bei viszeraler Leishmaniose in Indien und 94% bei kutaner Leishmaniose in Europa (Fischer, Voss et al. 2001). Aufgrund seiner teratogenen Wirkung ist dieses Mittel jedoch nicht für weibliche Patienten im gebärfähigen Alter geeignet.

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

Seit einigen Jahren kann die Differenzierung von promastigoten zu amastigoten *Leishmania*-Zellen *in vitro* durchgeführt werden (Pan, Duboise et al. 1993), was Studien zur stadienspezifischen Genexpression ermöglicht. Bei den Alte-Welt-Spezies, wie *L. donovani*, erfolgt die Differenzierung bei erhöhten Temperaturen und niedrigem pH-Wert (Zilberstein, Blumenfeld et al. 1991; Saar, Ransford et al. 1998).

Im Folgenden wird das für diese Arbeit verwendete System vorgestellt. Zunächst werden *L. donovani* Promastigote für 24 Stunden einem Hitzeschock von 25°C auf 37°C und einer anschließenden Ansäuerung des Kulturmediums von pH 7,0 auf pH 5,5 ausgesetzt. Nach dem pH-*shift* werden die Zellen unter CO₂-Begasung kultiviert. Unter diesen Bedingungen ist die Differenzierung zum Amastigoten-Stadium innerhalb von 120 Stunden abgeschlossen. Diese ist durch Kultivierung der Amastigoten unter den Bedingungen der Promastigoten (25°C, pH 7,0) reversibel. Die *in vitro* differenzierten amastigoten Zellen sind den aus Tiermodellen gewonnenen Amastigoten sehr ähnlich (Saar, Ransford et al. 1998). So synthetisieren sie alle Proteine der A2-Genfamilie, wobei es sich um Amastigoten-spezifische Protein-Marker handelt (Charest and Matlashewski 1994), über die eine Beschreibung im nächsten Abschnitt folgt. Als weiterer Marker für die erfolgreiche Differenzierung kann die LPG-Expression verwendet werden, da sie stadienspezifisch ist (McConville, Turco et al. 1992). Bei axenischen Amastigoten findet die LPG-Synthese auf einem niedrigeren Niveau statt. Bei Rückdifferenzierung zu Promastigoten steigt sie nach 2 Stunden an, um nach 6 Stunden wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Da die axenischen *L. donovani* Amastigoten den *in vivo*-generierten Zellen sehr ähnlich sind, sind sie überaus geeignet, den Differenzierungsprozess dieses Organismus zu untersuchen.

1.4 Stadienspezifische Genexpression bei Leishmanien

Die Stadiendifferenzierung von promastigoten zu amastigoten Formen führt neben morphologischen Veränderungen auch zu Veränderungen in der Genexpression.

Die stadienspezifische Expression von Genen amastigoter und promastigoter Stadien äußert sich oftmals lediglich als eine Erhöhung bzw. Erniedrigung in der Expression der jeweiligen Gene. Bei vielen der stadienspezifisch exprimierten Gene ist die biologische Funktion noch nicht geklärt. Im Folgenden werden einige Beispiele stadienspezifischer Genexpression bei Leishmanien erläutert:

A2-Proteine

Die A2-Protein-Familie stellt den ersten beschriebenen Amastigoten-spezifischen Protein-Marker in *L. donovani* dar. Sie besteht aus mindestens sieben Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 45 und 100 kDa (Zhang, Charest et al. 1996). Die für diese Proteine kodierenden Gene liegen in Gruppen, so genannten "clustern", tandemartig angeordnet und alternierend mit dem A2rel-Gen auf einem 850 Kb langen Chromosom vor. Während die A2-Gene nur von amastigoten Stadien von *L. donovani* exprimiert werden, werden die A2rel-Gene konstitutiv sowohl in amastigoten als auch in promastigoten Stadien exprimiert (Charest and Matlashewski 1994; Charest, Zhang et al. 1996; Zhang, Charest et al. 1996). Die Expression der A2-Gene wird post-transkriptionell reguliert (Charest, Zhang et al. 1996). Repetitive Sequenzen in den A2-Proteinen weisen 50% Identität und 80% Ähnlichkeit zum Carboxy-terminalen Bereich des S1-Antigens von *Plasmodium falciparum* auf, das ebenfalls stadienspezifisch exprimiert wird (Charest and Matlashewski 1994). Zhang und Matlashewski (Zhang and Matlashewski 1997) untersuchten die biologische Funktion des A2-Proteins mittels A2-defizienter *L. donovani*-Zellen. Bei diesen A2-defizienten Amastigoten ist *in vitro* die Proliferation in den Makrophagen stark eingeschränkt. *In vivo* ist die Virulenz ebenfalls stark verringert. Das A2-Protein repräsentiert also einen Virulenzfaktor. In Seren von Patienten mit viszeraler Leishmaniose wurden Antikörper gegen das A2-Protein nachgewiesen (Ghedini, Zhang et al. 1997).

Membranoberflächenmoleküle: LPG und Gp63

Während die Promastigoten vorwiegend artspezifische Lipophosphoglycane (LPG) als Glycocalyxschicht ausbilden, zeigen die Amastigoten dort hauptsächlich Glycosylphosphatidylinositole (GIPL) (Mehlhorn 1998). Bei amastigoten Stadien von *L. donovani* und *L. major* wird ein LPG exprimiert, welches sich strukturell vom LPG promastigoter Stadien unterscheidet (Glaser, Moody et al. 1991; Turco and Sacks 1991; McNeely and Doyle 1996). Das LPG ist ein kritischer Virulenzfaktor. Die Glucosylierung des LPG wird durch die Aktivität der Glucosyltransferase stadienspezifisch reguliert. In metazyklischen Promastigoten wurde eine um 80% geringere Aktivität gemessen als in prozyklischen Stadien (Mahoney and Turco 1999). Amastigote von *L. mexicana* sezernieren ein makromolekulares Proteophosphoglycan in das Phagolysosom ihrer Wirtszelle (Ilg, Craik et al. 1998).

Gp63, eine Metalloproteinase, stellt eines der Hauptmembranmoleküle dar, das ebenfalls stadienspezifisch exprimiert wird. Wie am Beispiel von *L. donovani chagasi* gezeigt wurde, steigt die Expression des Gp63 während der Entwicklung von weniger infektiösen Promastigoten der logarithmischen Wachstumsphase zu den hochinfektiösen Formen der stationären Phase um das 6 bis 11-fache an (Ramamoorthy, Donelson et al. 1992). Das Gp63 wird von einer aus 7 Mitgliedern bestehenden hoch konservierten Multi-Gen-Familie kodiert (Button, Russell et al. 1989; Medina-Acosta, Karess et al. 1993). Die Gene *gp63* 1-5 werden nur im promastigoten Stadium exprimiert, *gp63* Gen 6 sowohl in Promastigoten als auch in Amastigoten und *gp63* Gen 7 hauptsächlich in Promastigoten der stationären Wachstumsphase und in Amastigoten (Voth, Kelly et al. 1998).

spliced-leader-RNA

Bei Trypanosomatiden verfügen alle mRNAs an ihrem 5'-Ende über eine identische Sequenz von 35-39 Nukleotiden, den *spliced leader* (SL) (Sutton and Boothroyd 1986; Walder, Eder et al. 1986; Agabian 1990). Auch für Leishmanien wurde die Nukleotid-Sequenz des SL aufgeklärt (Agami and Shapira 1992). Die SL-RNA, die bei Leishmanien essentiell für die Prozessierung aller prä-mRNAs durch *trans-splicing* ist, wird stadienspezifisch in Amastigoten von *L. donovani* reguliert. Es wird postuliert, dass über Polyadenylierung der SL-RNA die Anzahl reifer SL-Transkripte kontrolliert wird. Die Regulation wird schnell induziert, sobald der Parasit unter sauren Bedingungen wächst (Lamontagne and Papadopoulou 1999).

Histon H1

Während der Metazyklognese akkumuliert das Protein in den Parasiten und bleibt in großen Mengen in amastigoten Stadien erhalten. Bei der Rückdifferenzierung von amastigoten zu promastigoten *L. major*-Zellen nimmt die Konzentration des Histons H1 ab (Noll, Desponds et al. 1997). Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen H1-Mengen einen Einfluss auf den Kondensierungsgrad des Chromatins während des Lebenszyklus von *L. major* haben.

Cysteinproteinasen

Durch Proteinase wird es dem Parasiten ermöglicht, Wirtsgewebe zu befallen, Wirtsproteine abzubauen und sich dem Immunsystem des Wirtes zu entziehen. In *L. donovani* wurden zwei Cysteinproteinasen identifiziert, von denen eine (*Ldcccys1*) verstärkt in Amastigoten und nur schwach in Promastigoten exprimiert wird (Omara-Opyene and Gedamu 1997). Bei *L. mexicana* wurden ebenfalls zwei Cysteinproteinasen identifiziert, die spezifisch in amastigoten Stadien exprimiert werden (North and Coombs 1981; Pupkis and Coombs 1984; Lockwood 1987). Nach weiteren Untersuchungen wurden die Cysteinproteinasen von *L. mexicana* in drei Gruppen eingeteilt, die aus mehreren Isoenzymen bestehen (Robertson and Coombs 1990; Robertson and Coombs 1994). Die Gene, die für die unterschiedlichen Isoformen der Cysteinproteinasen (CP) kodieren, sind in einem als "*lmcpb*" bezeichneten *Gencluster* hintereinander angeordnet. Die Virulenz von LmCPa-Nullmutanten ist der von *L. mexicana*-WT-Zellen ähnlich. Dagegen zeigen *LmCPb*-Nullmutanten eine geringere Infektiösität in BALB/c-Mäusen. Durch sie werden nur sehr langsam wachsende kleine Läsionen verursacht. Die Deletion der Gene *LmCPa* und *LmCPb* wirkt vermutlich synergistisch in der Reduzierung der Infektiösität, denn *LmCPa/b*-Doppelnulmutanten verursachten keine Läsionen in BALB/c-Mäusen (Alexander, Coombs et al. 1998)). Auch CPc-Nullmutanten zeigen eine geringere Infektiösität (Bart, Frame et al. 1997). Einige Cysteinproteinasen stellen demnach Virulenzfaktoren dar.

Proteinkinasen

Eine Proteinkinase mit einer molekularen Masse von 50 kDa wurde bei *L. major* nachgewiesen, die nur in Promastigoten aktiv ist. Aktive Amastigoten-spezifische Phosphatasen bewirken Veränderungen im Phosphorylierungsmuster Serin- und Threonin-phosphorylierter Proteine (Dell and Engel 1994). Außerdem wurde in *L. major* eine cAMP-abhängige Proteinkinase (*c-lpk2*) identifiziert, die in Promastigoten stärker exprimiert wird als

in Amastigoten (Siman-Tov, Aly et al. 1996).

Für *L. mexicana* konnte gezeigt werden, dass eine Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Kinase (*LmxMKK*) nur in Promastigoten vorhanden ist (Wiese, Wang et al. 2003). Dagegen ist ein *L. mexicana* MAP-Kinasen-homologes Protein als Amastigoten-spezifisch identifiziert worden (Wiese et al., 1998). Das *LmxMPK9* Protein wurde nur in Promastigoten nachgewiesen, die entsprechende mRNA ist dagegen in allen Stadien vorhanden (Bengs, Scholz et al. 2005). Erst kürzlich wurde ein weiteres MAP Kinase Homolog, die *LmxMPK3* identifiziert, welche nur in Promastigoten vorkommt (Erdmann, Scholz et al. 2006).

Glukose- und Fettsäure-Stoffwechsel

Desweiteren ist die stadienspezifische Regulierung des Glukose-Transports bei *L. mexicana mexicana* bekannt. Bei der Differenzierung von promastigoten zu amastigoten Stadien wird der Glukosekatabolismus drastisch reduziert. Der Glukosetransporter *LmGT2* wurde als Promastigoten-spezifisches Protein charakterisiert (Burchmore and Landfear 1998). Umgekehrt verhält es sich mit dem Fettsäuremetabolismus: er ist in amastigoten Zellen um das 10-fache erhöht gegenüber den promastigoten Zellen (Hart and Coombs 1982; Burchmore and Hart 1995). Auch bei Amastigoten von *L. donovani* wurde ein reduzierter Glukosemetabolismus nachgewiesen (Mukkada, Meade et al. 1985).

Energiestoffwechsel

Im Zuge einer *L. infantum* Proteomanalyse wurden zwei Amastigoten-spezifische Proteine identifiziert: die Isocitratdehydrogenase und die Triosephosphatisomerase (El Fakhry, Ouellette et al. 2002). Messungen der Enzymkinetiken ergaben eine erhöhte Aktivität in diesem Stadium des Parasiten.

Aminosäurestoffwechsel

Die Parasiten der Ordnung Kinetoplastida sind purinauxotroph, d.h. unabhängig von der Aufnahme dieser Nukleotide aus ihren Wirten. Für *L. donovani* wurde eine stadienspezifische Expression für verschiedene Adenosintransporter gezeigt (Ghosh and Mukherjee 2000). Im Gegensatz zu den Promastigoten besitzen die Amastigoten zwei verschiedene Adenosintransporter, von denen einer identisch zu dem Adenosin-/Pyrimidinnukleotidtransporter der Promastigoten ist. Der zweite ist dagegen spezifisch für das amastigote Stadium und transportiert ausschließlich Purinnukleotide.

Hitzeschockproteine

Der durch den biphasischen Lebenszyklus der Leishmanien bedingte Wirtswechsel vom poikilothermen Insektenvektor auf den homeothermen Säugerwirt beinhaltet für den Parasiten eine Temperaturerhöhung von 10-15 C°. Infolge eines solchen Temperaturwechsels wird die sogenannte Hitzeschock-Antwort ausgelöst, mit der die Synthese einiger hochkonservierter Proteine, der Hitzeschock-Proteine, einhergeht (Lindquist 1986). Bei *L. donovani* wurde HSP100 als Amastigoten-spezifisches Protein identifiziert. Durch Hitze-Stress induziert wird das HSP100 sowohl bei Amastigoten als auch bei Promastigoten exprimiert. Die als Folge der Übertragung auf den Säugerwirt ausgelöste Hitzeschock-Antwort muss als Einleitung der Stadiendifferenzierung zu Amastigoten gesehen werden (Krobitsch, Brandau et al. 1998). Die HSP100-Synthese wurde auch bei echten, aus Gewebe isolierten *L. major* Amastigoten beobachtet (Hubel, Krobitsch et al. 1997). Interessant ist die Beobachtung, dass das Fehlen von HSP100 die Expression von A2-Proteinen beeinträchtigt (Krobitsch, Brandau et al. 1998). Die Expression der Hitzeschock-Gene wird posttranskriptional reguliert, möglicherweise auf der Ebene der Translation (Miller 1988; Argaman, Aly et al. 1994; Brandau, Dresel et al. 1995).

Weitere stadienspezifische Gene bzw. Proteine

Bei einer Differential Display Analyse von *L. mexicana* wurde das Amastigoten-spezifische Gen VG7A5 ermittelt, welches für einen offenen Leserahmen von 587 Aminosäuren kodiert, dessen Funktion aber noch nicht bekannt ist (Liu 2000).

Für drei Peroxiredoxine wurde eine stadienspezifische Expression bei *L. chagasi* gezeigt. Während *lcpxn1* hauptsächlich in den Amastigoten exprimiert wird, finden sich im promastigoten Stadium überwiegend *lcpxn2* und *lcpxn3* (Barr and Gedamu 2001).

An *L. mexicana* Amastigoten wurde festgestellt, dass eine neue Genfamilie (A600) und ein β -Tubublin-Gen verstärkt exprimiert wird (Bellatin, Murray et al. 2002).

Das Protein ARL-3A von *L. donovani*, ein G-Protein, welches an der Flagellen-Synthese beteiligt ist, wurde als Promastigoten-spezifisch identifiziert (Cuvillier, Redon et al. 2000).

Für das *paraflagellar rod protein 2* (PFR-2) von *L. mexicana* wurde eine stadienspezifische Expression nachgewiesen (Moore, Santrich et al. 1996). Dieses Gen liegt im Genom in

dreifacher Kopie vor und die Anzahl der entsprechenden Transkripte ist im promastigoten Stadium im Vergleich zum amastigoten Stadium 15-fach erhöht.

Zur besseren Übersicht wurden die beschriebenen stadienspezifisch regulierten Gene/Proteine in einer Tabelle (Tab. 1.1) zusammengefasst.

Tab. 1.1: Stadienspezifisch regulierte Gene/Proteine bei Leishmanien

Gene/ Genprodukte	Amastigoten-spezifisch	Promastigoten-spezifisch	gezeigt bei	Literatur
Adenosin- /Pyrimidinnukleotidtransporter	xx	xx	<i>L. donovani</i>	(Ghosh and Mukherjee 2000)
Adenosintransporter für Purinnukleotide	xxx		<i>L. donovani</i>	(Ghosh and Mukherjee 2000)
ARL-3A		xxx	<i>L. donovani</i>	(Cuvillier, Redon et al. 2000)
A2-Protein-Familie	xxx		<i>L. donovani</i>	(Charest and Matlashewski 1994; Zhang, Charest et al. 1996)
A600 -Genfamilie	xxx		<i>L. mexicana</i>	(Bellatin, Murray et al. 2002)
β-Tubublin	xxx	x	<i>L. mexicana</i>	(Bellatin, Murray et al. 2002)
cAMP-abhängige Proteinkinase c- lpk2	x	xxx	<i>L. major</i>	(Siman-Tov, Aly et al. 1996)
Cysteinproteinase Ldcys1	xxx	x	<i>L. donovani</i>	(Omara-Opyene and Gedamu 1997)
Cysteinproteinasen	xxx	x	<i>L. mexicana</i>	(Robertson and Coombs 1990; Robertson and Coombs 1994)
Glukosetransporter <i>LmGT2</i>	x	xxx	<i>L. mexicana</i>	(Burchmore and Landfear 1998)
Gp63, Metalloproteinase Multi-Gen-Familie gp63 Gen 1-5 gp63 Gen 6 gp63 Gen 7	xx xx	xxx xx xxx (stationäre Promastioten)	<i>L. donovani chagasi</i>	(Button, Russell et al. 1989; Ramamoorthy, Donelson et al. 1992; Medina-Acosta, Karess et al. 1993; Voth, Kelly et al. 1998)

Histon H1	xxx	x	<i>L. major</i>	(Noll, Desponds et al. 1997)
HSP100	xxx	x	<i>L. donovani</i>	(Hubel, Krobitsch et al. 1997; Krobitsch, Brandau et al. 1998)
Isocitratdehydrogenase	xxx	x	<i>L. infantum</i>	(El Fakhry, Ouellette et al. 2002)
<i>Lmx</i> MAPKK		xxx	<i>L. mexicana</i>	(Wiese, Wang et al. 2003)
Phosphatase (Serin, Threonin)	xxx		<i>L. major</i>	(Dell and Engel 1994)
Peroxiredoxin lcpxn1	xxx		<i>L. chagasi</i>	(Barr and Gedamu 2001)
Peroxiredoxin lcpxn2		xxx	<i>L. chagasi</i>	(Barr and Gedamu 2001)
Peroxiredoxin lcpxn3		xxx	<i>L. chagasi</i>	(Barr and Gedamu 2001)
PFR-2 Paraflagellar rod protein	x	xxx	<i>L. mexicana</i>	(Moore, Santrich et al. 1996)
Triosephosphatisomerase	xxx	x	<i>L. infantum</i>	(El Fakhry, Ouellette et al. 2002)
VG7A5	xxx		<i>L. mexicana</i>	(Liu 2000)
50 kDa Proteinkinase		xxx	<i>L. major</i>	(Dell and Engel 1994)

1.5 Genregulation bei Kinetoplastiden

Die umfangreichen Veränderungen in Proteinsynthesemustern setzen ein gut funktionierendes System voraus, über das die Regulation der Gentranskription gesteuert wird (Stiles, Hicock et al. 1999).

Bei den meisten Eukaryoten verläuft die Transkription monocistronisch. Jedes Gen stellt eine separate Transkriptionseinheit dar, wobei Exons (kodierende Bereiche) von Introns (nichtkodierenden Bereichen) getrennt werden. In einem Prozess, der als *cis*-Spleissen bezeichnet wird, entsteht durch Entfernen der Introns die mature mRNA. Jedes Gen wird durch einen Promotor kontrolliert, der die Transkription initiiert. Die Konzentration des Genproduktes in der Zelle wird im Allgemeinen über die Aktivität dieses Promotors gesteuert. Mit der Transkriptionsinitiation beginnt die Prozessierung des primären Transkriptes. Dabei wird an das wachsende 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe angefügt (Banerjee 1980), während das Spleissen beginnt (Maniatis and Reed 2002). Am 3'-Ende der mRNA erfolgt die Synthese des poly(A)-Endes (Proudfoot 1989). Nach Abschluss des Spleissens wird die mature mRNA über nukleare Poren in das Cytoplasma transportiert (Sharp 1994). Die Genexpression wird bei höheren Eukaryoten demnach hauptsächlich transkriptionell reguliert. Daneben gibt es die Möglichkeit der post-transkriptionellen Kontrolle, wobei die Zahl der Transkripte während der mRNA-Biogenese oder direkt die Proteinsynthese (Translationskontrolle) beeinflusst wird.

Bei Kinetoplastiden erfolgt die Transkription Protein-kodierender Gene polycistronisch. Die Gene liegen hier in Gruppen vor. Jedem Gen folgt dabei eine kurze intergenische Region aus wenigen hundert Basenpaaren. Ausgehend von einem einzelnen 5'-Promotor werden die sogenannten polycistronischen Einheiten kotranskribiert, wodurch eine polycistronische Vorläufer-mRNA entsteht. Die Gene der Kinetoplastiden enthalten keine Introns, weshalb das *cis*-Spleissen hier nicht erforderlich ist. Während der mRNA-Reifung werden die intergenischen Regionen entfernt und es erfolgt die Prozessierung der 5'- und 3'- Enden. Die maturen mRNA-Moleküle zeichnen sich an ihrem 5'-Ende durch eine identische 39 Nukleotide umfassende *spliced leader* Sequenz (SL) aus. Dieses Mini-Exon stammt von einem in mehreren Kopien im Genom vorkommenden Transkriptionsabschnitt ab, wobei die primären Transkripte der Mini-Exons eine typische 5'-Spleissstelle aufweisen. Die Protein-

kodierenden mRNA-Moleküle enthalten stromaufwärts des offenen Leserahmens eine 3`-Spleissstelle. Die Verbindung des SL mit der prä-mRNA bezeichnet man als *trans*-Spleissen (Laird, Zomerdijs et al. 1987; Agabian 1990), sie erfolgt kotranskriptionell (Ullu, Matthews et al. 1993). Nach Prozessierung des 5`-Endes werden an das 3`-Ende der mRNA Adenylatreste polymerisiert.

Die Transkriptionseinheiten der Kinetoplastiden enthalten keine bekannten *cis*-aktiven Promotor-Elemente. RNA-Polymerase II Promotoren wurden, bis auf eine Ausnahme, nicht gefunden (Clayton 2002). So kann die Transkriptionsinitiation an jeder Stelle im Genom erfolgen. Lediglich die Gene der SL-RNA, welche sich abseits der Protein-kodierenden Gene befinden, weisen eindeutig identifizierbare Promotoren auf. Die Aktivität einzelner Gene kann daher nicht auf der Ebene der Transkriptionsinitiation reguliert werden. Es müssen hier post-transkriptionelle Mechanismen zu Grunde liegen.

Weder auf Transkriptionsebene, noch während des *trans*-Spleissens, konnten Regulatoren identifiziert werden. Auffallend ist, dass die in hoher Anzahl in der Zelle vorhandenen Proteine wie alpha- und beta-Tubuline, Hitzeschockproteine, Flagellenproteine, Oberflächenantigene und Proteasen in so genannten Multigen-Familien vorkommen. Es wird vermutet, dass diese tandemartige Anordnung der Gene zur Erhöhung der Transkriptmenge beiträgt (Stiles, Hicock et al. 1999). Außerdem gibt es Hinweise für eine Beteiligung bestimmter Sequenzen der 3`-untranslatierten Bereiche (UTR) und intergenischen Regionen (IR) an der Stabilität bzw. Degradation der Transkripte zur Beeinflussung der Anzahl der mRNA-Moleküle, die durch labile Proteinfaktoren und deren Erkennungssequenzen vermittelt wird (Aly, Argaman et al. 1994; Zilberstein and Shapira 1994; Charest, Zhang et al. 1996; Burchmore and Landfear 1998; Stiles, Hicock et al. 1999; Wu, El Fakhry et al. 2000; Brittingham, Miller et al. 2001; Kelly, Nelson et al. 2001). So wurde bereits ein 450 Nukleotide langes Sequenzmotiv identifiziert, welches eine stadienspezifische Regulation vermittelt und das in vielen Leishmanien-RNAs konserviert ist; wobei für einige dieser RNAs eine differenzielle Regulation gezeigt werden konnte (Boucher, Wu et al. 2002).

Über Regulationsmechanismen auf Translationsebene ist bisher nur sehr wenig bekannt, genauso wenig über die auslösenden Faktoren und Steuerung solcher Prozesse.

1.6 Identifizierung stadienspezifischer Proteine

Für die Identifizierung stadienspezifischer Proteine bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Eine in der Literatur häufig zu findende Anwendung ist die Suche nach differentiellen Produkten in cDNA-Bibliotheken. Bei dieser Methode wird die gesamte mRNA eines Zelltyps zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung isoliert und in cDNA überführt, welche anschließend kloniert und mit spezifischen Proben hybridisiert wird. Über den Vergleich der Intensitäten der Hybridisierungssignale können so stadienspezifische Gene identifiziert werden. Die meisten der bisher als stadienspezifisch beschriebenen Gene wurden auf diese Weise identifiziert (Coulson and Smith 1990; Flinn and Smith 1992; Charest and Matlashewski 1994; Moore, Santrich et al. 1996; Lamontagne and Papadopoulou 1999; Liu 2000; Wu, El Fakhry et al. 2000; Bellatin, Murray et al. 2002). In der Regel wurden zusätzlich mittels Northern Blot Analysen die unterschiedlichen RNA-Mengen der Transkripte nachgewiesen.

Eine besonders in den letzten Jahren an Popularität gewinnende Methode zur Bestimmung der unterschiedlichen Expressionsmuster einzelner Gene ist die *Microarray*-Technik. Es werden hierbei fluoreszierende cDNAs aus verschiedenen RNA-Proben hergestellt und diese mit auf Objektträgern immobilisierten Nukleinsäuren hybridisiert. Mithilfe einer *Microarray*-Analyse wurde bereits der Differenzierungsprozess bei *L. major* (Almeida, Norrish et al. 2002; Beverley, Akopyants et al. 2002; Saxena, Worthey et al. 2003) und auch *L. donovani* (Duncan, Salotra et al. 2004) untersucht. In diesen Studien konnten zwar für eine Vielzahl von Genen signifikante Unterschiede bezüglich der vorhandenen RNA-Menge gezeigt werden, jedoch erwiesen sich diese Unterschiede im Vergleich zu Studien an anderen Organismen nur moderat. Außerdem war bedingt durch die unvollständige Annotation der Genome die Interpretation der erhobenen Daten nur eingeschränkt möglich (Duncan, Salotra et al. 2004). Obgleich die Stadien der Parasiten erhebliche Unterschiede in Morphologie und Biochemie zeigen, wurden nur sehr geringe Unterschiede der Transkriptmengen (1,2- bis 3-fach) als reproduzierbar publiziert (Duncan, Salotra et al. 2004). Bei den Kinetoplastiden sind also die Unterschiede auf mRNA-Ebene nicht so ausgeprägt, wie bei anderen Organismen, was konform geht mit der in Kapitel 1.5 beschriebenen charakteristischen Art ihrer Genexpression.

Avila und Mitarbeiter konnten für das Metazyklogenin-Gen von *T. cruzi* zeigen, dass im Northern Blot mit Gesamt-RNA zwar in beiden Stadien, differenzierenden und proliferierenden Zellen, gleichermaßen viel RNA nachzuweisen ist, dass das Protein jedoch nur in differenzierenden Epimastigoten zu detektieren ist (Avila, Yamada-Ogatta et al. 2001). In einer Northern Blot Analyse mit aktiv translatierten, an Ribosomen gebundenen Transkripte, die zuvor als Polysomen durch Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde das Metazyklogenin ebenfalls nur in differenzierenden Zellen detektiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Mobilisierung der RNA zu Polysomen einen wichtigen Mechanismus der Regulation der Genexpression bei *T. cruzi* darstellt (Avila, Yamada-Ogatta et al. 2001).

Es kann also nicht per se über die vorhandene mRNA-Menge auf die Abundanz des entsprechenden Proteins in der Zelle geschlossen werden. Um darüber eine Aussage treffen zu können, ist es unerlässlich, die Unterschiede auf Proteinebene aufzuzeigen. Dies geschah bislang für verhältnismäßig wenige Proteine, deren Stadien-Spezifität über Nachweis im Western Blot oder mittels Messung von Enzymaktivität gezeigt wurde (Charest and Matlashewski 1994; Handman, Osborn et al. 1995; Streit, Donelson et al. 1996; Burchmore and Landfear 1998; Krobitch, Brandau et al. 1998; Ghosh and Mukherjee 2000; Wiese, Kuhn et al. 2003). Eine vergleichende Proteomanalyse bietet die Möglichkeit, die Veränderungen im Expressionsmuster eines Zelltyps direkt auf Proteinebene zu analysieren.

1.7 Vergleichende Proteomanalysen

Der Begriff „Proteom“ bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, die nach den Vorgaben deren Genoms synthetisiert wurden (Wilkins, Sanchez et al. 1996). Alle Techniken, welche der Darstellung und Analyse des Proteoms dienen, werden unter dem Ausdruck „Proteomics“ zusammengefasst.

Die Zwei-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) ermöglicht die Trennung von Proteingemischen anhand zweier Parameter: dem isoelektrischen Punkt in der 1. Dimension und dem Molekulargewicht in der 2. Dimension.

Mit Hilfe der *Matrix Assisted Laser Ionization/Desorption Time-Of-Flight Massspectrometry* (MALDI-TOF MS) wird die Molekülmasse frei fliegender Ionen im Hochvakuum bestimmt (Karas and Hillenkamp 1988). Aus einer Probe, wie z.B. einem Peptidmassengemisch, wird an einer Ionenquelle ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, die in einem sich anschließenden Flugrohr nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten in Verbindung mit einer gepulsten Ionenerzeugung getrennt (Time-Of-Flight, TOF-Analysator) und schließlich an einem Detektor nachgewiesen werden können. Das Peptidmassengemisch wird aus dem zu analysierenden Protein durch Verdau mit Trypsin hergestellt. Das Enzym katalysiert die Spaltung der Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin. Mit diesem Wissen können die Massen der entstehenden Peptide für jeden Eintrag einer Protein-Datenbank theoretisch bestimmt werden. Diese theoretischen Werte werden mit den in der MALDI-TOF MS Analyse experimentell ermittelten Peptidmassen, den sogenannten *Peptide Mass Fingerprints*, verglichen. Bei ausreichender Übereinstimmung kann das Protein identifiziert werden.

Die 2-D PAGE in Verbindung mit (MALDI-TOF MS) ist zu einem Schlüsselement auf dem Gebiet der *Proteomics*-Technologien geworden. Durch die Einführung kommerziell verfügbarer Gele mit immobilisierten pH-Gradienten für die isoelektrische Fokussierung wurde eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht (Bjellqvist, Ek et al. 1982). Die Optimierung von Reagenzien sowie Geräten als auch die Erhöhung der Messgenauigkeit der Massenspektrometer und die kostengünstigere Handhabung machten diese Technologie zunehmend attraktiver (Ashton, Curwen et al. 2001).

Mit diesen Methoden wurden bereits zahlreiche Studien an klinisch bedeutenden Pathogenen durchgeführt (Cash 2000). So wurden z.B. wichtige Pathogenitäts-Faktoren bei *Haemophilus* (D'Mello, Langford et al. 1997) sowie *Mycobacterium bovis* (Jungblut, Schaible et al. 1999) bestimmt. Mit Hilfe von Proteomanalysen konnten die Mechanismen einiger Medikamentresistenzen aufgeklärt werden (Cash 2000). Erfolgreich war die Anwendung auch in der biomedizinischen Forschung. Hier wurden verschiedene Krebsarten, insbesondere Brustkrebs (Jungblut, Zimny-Arndt et al. 1999; Patwardhan, Strittmatter et al. 2005; Willard, Angrist et al. 2005), neurodegenerative Krankheiten (Langen, Berndt et al. 1999), sowie Herzkrankheiten (Knecht, Regitz-Zagrosek et al. 1994) untersucht.

1.8 Zielsetzung

Gene, die nur im Amastigoten-Stadium exprimiert werden, sind möglicherweise essentiell für das Überleben im Säugetierwirt und stellen deshalb potentielle Kandidaten für Virulenzfaktoren dar. Bislang konnten nur wenige solcher Amastigoten-spezifischen Gene identifiziert werden.

Durch eine Proteomanalyse sollten die Proteinsynthesemuster der amastigoten und promastigoten Stadien dargestellt und analysiert werden. Dafür sollten Proteinextrakte der beiden Stadien hergestellt und mittels 2D-PAGE getrennt werden. Die resultierenden zweidimensionalen Protein-Verteilungsmuster der beiden Stadien sollten im Hinblick auf differentiell vorkommende Proteine miteinander verglichen und diese später aus präparativen Gelen isoliert werden. Der Fokus sollte hierbei vor allem auf Amastigoten-spezifischen Proteinen liegen, da dieses Stadium verantwortlich für die Symptome der Leishmaniose ist.

Für jedes dieser Proteine sollte durch massenspektrometrische Analysen (MALDI -TOF MS) ein *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) erstellt werden. Über diese PMF sollten die jeweiligen Proteine durch Vergleich mit den Daten des *L. major*-Genom-Projektes und unter Einbeziehung zugänglicher Proteindatenbanken identifiziert werden.

Anschließend sollten einige dieser Proteine für weitere charakterisierende Studien ausgewählt werden. Im Einzelnen sollten die Proteine dann rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Das rekombinante Protein sollte zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte die Differenz der Proteinmenge in beiden Stadien überprüft und die zelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins gezeigt werden. Ferner sollte versucht werden, durch gezielten Gen-*knock-out* und Überexpression der Gene ihre Funktion zu bestimmen.

Die Analysen des Proteinrepertoires sollen eine Grundlage bilden für das Verständnis der molekularen und biochemischen Mechanismen, die der Umwandlung des Parasiten vom promastigoten zum amastigoten Stadium zu Grunde liegen. Diese Differenzierung ist Voraussetzung für die Adaption des Parasiten an die veränderten Bedingungen im neuen Säugerwirt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

³² P dATP	Hartmann Analytic
30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Proteingel)	AppliChem BioChemica
Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (Proteingel)	AppliChem BioChemica
Agarose	LifeTechnology, Paisley, Scotland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
ASB-14 (Aminosulfobetain-14)	Calbiochem
BCIP-Touloudin-Salz	Biomol, Hamburg
(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat- Touloudin-Salz)	
Bleocin	Calbiochem
Bradfordreagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylamino)- 1-propansulfonat)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
dNTP-Set	AmershamPharmacia
DTT (Dithiothreitol)	Biomol, Hamburg
EDTA (Ethylen-Dinitrilotetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fast Violet B salt	Sigma, Deisenhofen
FCS (Fötales Kälberserum)	GibcoBRL, Eggenstein
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Gentamycin (Gencin)	Ratiopharm, Ulm
Glutardialdehyd (25% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Glycerol 87%	Merck, Darmstadt
G418-Sulfat (Genitacin)	GibcoBRL, Eggenstein

Haemin	Qiagen
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
HPLC-Wasser (LiChrosolv®)	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid)	Biomol, Hamburg
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Lennox L Broth Base	GibcoBRL, Eggenstein
Lennox L Agar	GibcoBRL, Eggenstein
M199-Medium	GibcoBRL, Eggenstein
Methanol	Merck, Darmstadt
NaAcetat x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Naphtol AS Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
NBT (Nitrotetrazoliumblau)	Biomol, Hamburg
Ni-NTA Superflow	Qiagen
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, Eggenstein
Phenol	Biomol, Hamburg
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Puromycin Dihydrochlorid	Calbiochem
RPMI-Medium	GibcoBRL, Eggenstein
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
SEAKEM GTG Agarose	FCM BioProducts
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
TEMED (Tetramethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Thiourea	Fluka
Tris (Sequenzgele)	Bio-Rad, München
TrisBase	Biomol, Hamburg
Tris-gesättigtes Phenol	Biomol, Hamburg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
TRIzol-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Urea (Proteingele)	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Appligene Oncor
6-Biopterin	Fluka

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen, soweit im Folgenden nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad pro analysi.

2.1.2 Enzyme

CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Amersham Bioscience
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Taq Polymerase FIREpol	Solis Biodyne
Trypsin, rekombinant, Proteomics grade	Roche Diagnostics
T4-DNA Ligase USB	

2.1.3 Immunreagenzien

CyTM2-konjugierte Anti-Huhn IgG (Esel) und CyTM2-konjugierte Anti-Maus IgG (Esel), beides Dianova

AP-konjugierte Anti-Huhn IgG (Kaninchen), AP-konjugierte Anti-Maus IgG (Ziege), HRP-konjugierte Anti-Huhn IgG (Kaninchen), Anti- β Tubulin (monoklonal), alles Sigma-Aldrich.

2.1.4 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde bei der Firma Invitrogen in Auftrag gegeben. Sie wurden in einer Konzentration von 100 pmol bei -20°C gelagert. Die Arbeitskonzentration betrug 10 pmol.

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die fett gedruckten Bereiche markieren die Restriktionsschnittstellen.

Amplifikation der folgenden Gene:

ArfGap ähnliches Protein, *L. major*

5'GAGACATATGGCGAGCACTGGCAAGCTGAA 3'	ArfGap-S30(<i>Nde</i> I)
5'GAGACTCGAGCTACAGATCATCCAGGAAGT 3'	ArfGap-AS30(<i>Xho</i> I)

Arginin Kinase, *L. major*

5'GAGACATATGGCCTCCGCGGAAGTTGTCAGCAAACCTTGA 3'	AK-S39(<i>Nde</i> I)
5'GAGACTCGAGTCACCTCGCAGATTCCCTCCGCTTGATGA 3'	AK-AS39(<i>Xho</i> I)

Neg. Regulator des cdc42p Proteins, *L. major*

5'GAGACATATGGAAGGGGATGACAAGTA 3'	cdc42p-S27(<i>Nde</i> I)
5'GAGACTCGAGAGCCTAGCACAAGTACT 3'	cdc42p-AS27(<i>Xho</i> I)

Thymidin Kinase, *L. major*

5'GAGACATATGTTCCGCGGTCGTATAGA 3'	TK-S27(<i>Nde</i> I)
5'GAGACTCGAGTCACTCTGAGGATGCAGCCG 3'	TK-AS30(<i>Xho</i> I)

CAC14613, *L. major*

5'-GAGACATATGGCCCGTCGTGATCGCGTGCCGCGGCA 3'

CAC1-S36(*Nde*I)

5'-GAGACTCGAGCTACGCGAAGAGCGGGAAGCTCGT 3'

CAC1-AS33(*Xho*I)

CAC33984, *L. major*

5'-GAGACATATGCTGCGCACGTCTCTCGTTG 3'

CAC3-S29(*Nde*I)

5'-GAGACTCGAGTCACCAGCCTTGAGGAAACAT 3'

CAC3-AS31(*Xho*I)

Amplifikation der 5'UTR:

Thymin Kinase, *L. major*

5'-GAGAATTCATTTAAATCCTTGTGTCCATGT-3'

TK-5'UTR (S30) E/S

5'-GAGGATCCGGTACCGATCGCGACGTGTGG-3'

TK-5'UTR (AS29) B/K

Amplifikation der 3'UTR:

Thymin Kinase, *L. major*

5'-GAGGATCCCCTAGAGGCGCAAGCCTCTTG-3'

TK-3'UTR(S29) B

5'-GAAAGCTTATTTAAATATCATTTCCCCTGAGGAAAGAGG-3'

TK-3'UTR(AS39) H/S

Sequenzierung der Gene und UTR im TOPO-Vektor:

5'-CGACGTTGTAAAACGACGACGGCCAGT-3'

M24F

5'-ACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

M24R

Sequenzierung der Gene im Expressionsvektor pX63pol:

5'-AAACCGCTCGCGGTGTGTT-3'

pXPHLEO Sense

5'-TCCCCGCGCGTTGGCCGAT-3'

pXPHLEO Antisense

2.1.5 Spezielle Geräte

BioRad Gene Pulser™

Biometra Duo-Therm Hybridisierungssofen

CASY 1- Cell Counter & Analyser

(Schärfe System Reutlingen)

IPGphor™ Isoelectric Focusing System

(Amersham Pharmacia Biotech)

Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480

RoboCycler Gradient 40 Stratagene

Stratagen UV Stratalinker™1800

Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF Massenspektrometer

Alle anderen laborüblichen Geräte werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1.6 Marker

Protein-Größenstandard: Bio-Rad Marker low range, 107 - 20,9 kda, (Bio-Rad),

PAGERuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)

DNA-Längenstandard: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

RNA-Längenstandard: 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen)

2.1.7 Sonstige Materialien

Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Cryoröhrchen	Nalgene
DNA Isolierungs Kit, Puregene	Biozym, Genra Systems
DNA Ladepuffer, 6x	MBI Fermentas
ECL plus Western Blot Detection System	Amersham Bioscience
Elektroporationsküvetten	Eurogentec
Faltenfilter	Schleicher & Schüll
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation
GeneClean® Spin Kit	Q-Biogene
Gewebekultur-Flaschen 50ml/250ml mit und ohne Filterdeckel	Sarstedt
High-Pure PCR Purification Kit	Roche Diagnostics
Hybridisierungsröhrchen	Biometra
<i>Immobiline Dry Strips</i> 18 cm pH 4-7	Amersham Bioscience
<i>LiChrosolv</i> ® Wasser f.d. Chromatographie	Merck
<i>MicroSpin</i> ™MS-300 HR Säulen	Amersham Bioscience
<i>MitoTracker red</i> CMXRos, Hoechst3328	Molecular Probes
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	Schleicher und Schüll
Nucleospin® Plasmid und <i>NucleoBond</i> ®PC2000	Macherey-Nagel
Nylonmembran Biodyne	GIBCO BRL Life Technologies
Prime-a-Gene® labeling System	Promega
Rnase free QuikSpin columns and Elution tubes	Ambion Inc.
Röntgenfilme X-OMAT™AR und <i>BIOMAX</i> ™MS	Eastman Kodak
Spectra/Por® Membrane MWCO:6-8000	Spectrum Laboratories Inc.
TOPO TA Cloning® Kit und TOP 10 One Shot™ Kit	Invitrogen
Whatman Papier	Schleicher & Schüll
<i>ZipTips</i> C18	Millipore

2.1.8 Medien und Medienzusätze

M199-Medium pH 7,0

1 x M199-Medium

25% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)

0,2% Natriumhydrogencarbonat

20 µg/µl Gentamycin

5 mM L-Glutamin

Das Medium wurde steril angesetzt.

M199-Medium pH 5,5

1xM199-Medium

25% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)

25 mM MES

20 µg/µl Gentamycin

5 mM L-Glutamin

Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt und das Medium steril filtriert.

Einfriermedium pH 7,0

20% DMSO

50% FCS

30% M199-Medium mit 15% FCS

Das Medium wurde steril filtriert.

Modifiziertes M199-Medium pH 7,0

1 x M199-Medium

25% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)

0,2% Natriumhydrogencarbonat

40 mM HEPES pH 7,4

100 µm Adenin

1,2 µg/ml 6-Biopterin

10 µg/ml Haemin

20 µg/ml Gentamycin

5 mM L-Glutamin

steril filtrieren

2.1.8.1 LB-Medium

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

2.1.8.2 LB-Agar zur Herstellung von Agarplatten

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

2.1.8.3 Medienzusätze

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

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

2.1.9 Puffer und Lösungen

1 x Elektrophorese-Puffer für PAGE

Trisbase	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1% (w/v)

Trenngelpuffer für PAGE

(4x Tris/SDS pH 8,8)

Trisbase	1,5 M
SDS	0,4%

ad 500 ml A.dest.

pH-Wert mit HCl einstellen

steril filtrieren

1 x PBS

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	8,06 mM
KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM

20 x SSC

NaCl	3 M
NaCitrat	0,3 M
pH 7,0	

1 x TBE

Trisbase	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ₂ EDTA	2,5 mM

Probenpuffer für PAGE (6x)

Tris	1,52 g
Glycerol	20 ml
SDS	2%

In 40 ml A.dest. lösen

pH 6,8 mit HCl einstellen

2 ml Bromphenolblau zugeben

auf 100 ml mit A. dest. auffüllen

Sammelgelpuffer für PAGE

(4x Tris/SDS pH 6,8)

Trisbase	500 mM
SDS	0,4%

ad 500 ml A.dest.

pH-Wert mit HCl einstellen

steril filtrieren

Elektroporationspuffer

HEPES pH 7,5	21 mM
NaCl	137 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	0,7 mM
Glukose	6 mM

Steril filtrieren

AP-Puffer

Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
NaCl	100 mM
Mg ₂ Cl	10 mM

10 x TBS

Tris-HCl (pH 7,2)	100 mM
NaCl	1,5 M

Coomassie-Färbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%
A.dest.	40%
Coomassie Brilliant Blue	0,05%

Coomassie-Entfärber

Methanol	45%
Eisessig	10%
A.dest.	45%

10 x MOPS-Puffer

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM

pH 7,0 mit NaOH einstellen

RNA-Probenpuffer

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

RNA-Dye

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

Church-Mix

Na ₂ HPO ₄	500 mM
SDS	7%
EDTA	1 mM

pH 7,2 einstellen

Church-Wash

Na ₂ HPO ₄	40 mM
SDS	1%

pH 7,2 einstellen

Bindungspuffer für Chromatographie (8x)

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

Waschpuffer I für

Chromatographie (8x)

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

Waschpuffer II für Chromatographie (4x)

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

Elutionspuffer für Chromatographie (4x)

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

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

2.1.10 Organismen und Plasmide

2.1.10.1 Organismen

Leishmania-Stämme

Es wurden zwei Stämme verwendet.

L. donovani: Der Stamm MHOM/IN/Lo8 wurde von Dan Zilberstein (Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa) zu Verfügung gestellt.

L. major: Es wurde der von der WHO empfohlene Referenzstamm MHOM/SU/73/5ASKH verwendet (David Evans, London School of Hygiene and Tropical Medicine).

Tab. 2.1: Bakterien-Stämme

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

2.1.10.2 Plasmide

Hier sind Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide aufgeführt, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tab. 2.2: Vektoren und Plasmide

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

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

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die promastigoten Leishmania-Zellen wurden in Polystyren Kulturflaschen (Sarstedt) in M199-Medium pH 7,0 in einem Brutschrank bei 25°C kultiviert. Um ein logarithmisches Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen 2 mal pro Woche auf eine Dichte von ca. 5×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml verdünnt. Es wurde immer steril gearbeitet. Die Zelldichte wurde mittels einer Doppelbestimmung mit einem Zellcounter (CASY®1 Cell Counter & Analyser) gemessen. Dabei werden die Zellen in einer CASYton®-Lösung, einem schwachen Elektrolyten, verdünnt und in dem Meßgerät durch eine Kapillare eingesaugt. Jede durchtretende Zelle verändert den Widerstand entlang der Kapillare und ist somit ein Maß für das Volumen der Zellen. Die Signalauswertung erfolgt über Pulsflächenanalyse. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren. Deshalb wurden sie für eine Messung 1:1000 verdünnt.

2.2.2 Einfrieren von Zellen

Logarithmisch wachsende promastigote Zellen wurden sedimentiert (4°C, 10 min, 690 x g). Das Leishmanien-Sediment wurde in 1/30 Volumen eiskaltem M199- und 1/30 Volumen Einfriermedium (s. 2.1.8) aufgenommen, wobei eine Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt wurde. Die Suspension wurde in vorgekühlte Cryoröhrchen gefüllt und für mindestens 2 Stunden bei -70°C eingefroren, um sie dann dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196°C zu lagern.

2.2.3 *In vitro* Stadiendifferenzierung

Die Stadiendifferenzierung von *L. donovani* Promastigoten zu axenischen Amastigoten wurde nach (Saar, Ransford et al. 1998) durchgeführt.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Die promastigoten Zellen wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in M199-Medium pH 7,0 verdünnt und in Zellkulturflaschen (gasdurchlässiger Deckel) aus Polystyren für 24 h bei 37°C in einem Brutschrank mit Kohlendioxid-/Luftgemisch-Begasung (5% Kohlendioxid, 95% Luft)

kultiviert. Um ein optimales Oberflächen/Volumenverhältnis zu gewähren, wurden Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 25 cm² mit maximal 12 ml Kultursuspension und Zellkulturflaschen mit 150 cm² mit maximal 150 ml Kultursuspension befüllt. Nach 24 h wurde die Kultur in 50 ml Schraubgefäße überführt und zentrifugiert (RT, 10 min, 690 x g). Der Überstand wurde mit Vakuum abgesogen, das Sediment in doppeltem Volumen M199-Medium pH 5,5 aufgenommen und in Kultur-Flaschen mit gasdurchlässigem Deckel überführt. Die Zellkultur wurde weitere 96 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert, wobei nach 72 h das Medium gewechselt wurde, dann war die Umwandlung promastigoter Zellen zu amastigoten Zellen abgeschlossen. Der Differenzierungsprozess wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Gewinnung axenischer amastigoter Leishmanien diente ausschließlich zur Herstellung von Zelllysaten.

2.2.4 Zellernte

Zum Ernten wurde die Leishmanien-Zellkultur in 50 ml Schraubgefäße überführt. Die Zellen wurden 10 min bei 4°C mit 690 x g sedimentiert und dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Dabei war PBS entweder auf pH 7.0 oder pH 5,5 eingestellt, entsprechend dem pH-Wert des Mediums, in dem die Zellen (Promastigote oder Amastigote) zuvor kultiviert worden waren. Der Überstand wurde nach dem letzten Waschschrift dekantiert und das Sediment in dem restlichen PBS (ca. 50-100 µl) resuspendiert und bei -20°C eingefroren oder direkt aufgeschlossen.

Es wurden neben promastigoten und amastigoten Zellen auch alle 24 h während der Stadien-Differenzierung Zellen geerntet. Die Stadien wurden mit Tag 0-5 bezeichnet, wie in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: Bezeichnung der Stadien und Zeitpunkte ihrer Ernte während der Stadien-Differenzierung

Bezeichnung des Stadiums	Kulturbedingungen zur Zeit der Ernte	Zeitpunkt der Ernte
Tag 0 (= Promastigote)	25°C; Medium pH 7,0	jederzeit möglich, wenn Wachstum stationär
Tag 1	37°C; Medium pH 7,0	24 h nach Hitzeschock
Tag 2	37°C; Medium pH 5,5	24 h nach pH-Änderung
Tag 3	37°C; Medium pH 5,5	48 h nach pH-Änderung
Tag 4	37°C; Medium pH 5,5	72 h nach pH-Änderung
Tag 5 (= Amastigote)	37°C; Medium pH 5,5	96 h nach pH-Änderung

2.2.5 *In vitro* Infektion von peritonealen Exsudat Zellen

Für die *in vitro* Infektion wurden peritoneale Exsudat-Zellen von 8 Wochen alten männlichen Balb/c Mäusen eingesetzt. Die Mäuse wurden getötet und der Bauchraum mit 10 ml sterilem PBS gespült. Die Zellsuspension wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt und es wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte bestimmt. Nach Sedimentation wurden die Makrophagen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Vertiefung in *chamberslides* in modifiziertem M199-Medium ausgesät. Zur Adhäsion der Zellen wurden diese 24 h bei 37°C in einem Brutschrank (5% CO₂) inkubiert, bevor die Leishmanien zugegeben wurden.

Für die Infektion mit Leishmanien aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden diese 2-3 Tage unter täglichem Mediumwechsel bis zu einer Zelldichte von $2-5 \times 10^7$ Zellen/ml kultiviert. Die Inkubation der peritonealen Exsudat Zellen mit den Leishmanien erfolgte im Verhältnis von 1:10. Die gewünschte Anzahl an Leishmanien wurde der Kultur entnommen, bei 720xg, 10 min und RT sedimentiert und in dem entsprechenden Volumen modifiziertem M199 Medium aufgenommen. Pro Zellstamm wurden drei Ansätze für drei verschiedene Zeitpunkte vorbereitet. Die Makrophagen wurden dann zusammen mit den Leishmanien bei 37°C und 5% CO₂ Begasung für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsstart wurden die Ansätze dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubationskammern wurden vom Objektträger entfernt, die Zellen mit Methanol 2 min fixiert und mit Giemsa 15 min gefärbt. Es folgte die mikroskopische Kontrolle (Zeiss Axioskop) und Auszählung der infizierten Makrophagen. Es wurde die Anzahl infizierter peritonealer Exsudat Zellen gezählt und die Anzahl an Leishmanien pro infizierter Zelle bestimmt.

Alle Zählungen erfolgten nach vorheriger Kodierung der Proben, um Voreingenommenheit zu verhindern.

2.2.6 Kultivierung von Bakterien

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium aerob bei 37°C in Falcons auf einem Rundschüttler (B. Braun Biotec International, Certomat, 120-200 Upm) angezogen. Um Bakterienstocks anzulegen, wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit 1/5 Vol Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.7.1 Plasmid-Mini-Präparation

Zur Aufarbeitung geringer Mengen bakterieller Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit der Fa. Machery-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Nach dem Prinzip der alkalischen Lyse wurden die Bakterien mit Hilfe von SDS lysiert, die DNA durch Natriumhydroxid denaturiert und die Lösung durch Zusatz von Kaliumacetat neutralisiert. Denaturierte Proteine sowie chromosomale DNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt jedoch gelöst und kann isoliert werden.

2.2.7.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Für die Transfektion von *Leishmania donovani* als auch *L. major* wurden größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde mit Hilfe des NucleoBond® PC2000-Kits der Fa. Machery-Nagel nach Angaben des Herstellers aus Bakterien isoliert. Die Isolierung beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Isolierte DNA wurde in HPLC-H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.7.3 Isolierung genomischer DNA aus *Leishmania spec.*

Hierfür wurden 1-2x10⁶ Zellen geerntet und gewaschen, wie unter 2.2.4 beschrieben. Die Isolierung genomischer DNA aus *Leishmania spec.* erfolgte mit dem *Pure Gene DNA Purification Kit* der Fa. Genra Systems (Minneapolis, USA) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.7.4 Isolierung von RNA aus *Leishmania spec.*

Hierfür wurden 1-2x10⁶ Zellen geerntet und gewaschen, wie unter 2.2.4 beschrieben. Danach wurde sofort 1 ml Trizol® auf das Sediment gegeben und die resuspendierten Zellen 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und der Ansatz gemischt. Nach erneuter Inkubation für 3 min bei RT wurde 15 min bei 11.600 x g zentrifugiert und die RNA mit 500 µl Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Die RNA wurde noch einmal mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, das Sediment bei 60°C getrocknet und dann in 50-100 µl HPLC-H₂O bei 60°C gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Dabei wird die Absorption der zu bestimmenden Nukleinsäurelösung in Quarzküvetten bei 260 nm gemessen und unter Einbeziehung des OD-Wertes die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{OD}_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (DNA) bzw. } 40 \text{ (RNA)}}{1000}$$

Für eine OD von 1 wurde bei doppelsträngiger DNA eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und bei RNA von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ angenommen.

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde bestimmt über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm sowie 280 nm. Eine reine DNA-Lösung hat einen $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ -Wert von 1,8; eine reine RNA-Lösung von 2,0.

2.2.9 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.2.9.1 Restriktionsanalysen von DNA

Restriktionsanalysen wurden sowohl zur Identifizierung, Charakterisierung und auch zur Isolierung von DNA-Molekülen angewendet. Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Fa. NEB enzymatisch gespalten und die entstandenen DNA-Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese getrennt. Die Enzyme wurden in den mitgelieferten Puffersystemen nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Für einen analytischen Verdau wurden 1-2 μg DNA und für einen präparativen Ansatz 20 mg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden mit 3-10 U Enzym/ μg DNA für 2-24 h inkubiert.

2.2.9.2 Dephosphorylierung freier 5'- Enden von DNA

Durch einen Restriktionsverdau entstehen an den Schnittstellen freie 3'-OH-Enden sowie freie 5'-Phosphatgruppen. Um bei den nachfolgenden Ligationen eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase abgespalten. Hierfür wurde ein 50 μl Ansatz mit 1 U „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“ (CIAP) im dazugehörigen Puffersystem für 45 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde danach durch eine Chloroformextraktion (s. 2.2.11.2) entfernt.

2.2.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA wurde das T4-DNA-Ligase-System der Fa. Pharmacia benutzt. In 15 µl Ansätzen wurden Vektor-DNA und DNA-Fragment im Verhältnis 1:3 mit ca. 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligationen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. In der Regel wurde 1 U Ligase eingesetzt, für die Ligationen sehr großer DNA-Fragmente (≥ 2000 Bp) wurden jedoch 5 U Enzym eingesetzt.

PCR-Produkte mit Adenosinüberhängen (siehe 2.2.14) konnten direkt mittels des TOPO[®]TA Cloning Kits subkloniert werden.

2.2.9.4 Fill-in Reaktionen

War zu Klonierungszwecken ein *blunt-end* notwendig, mussten bestehende 5'-Überhänge von Schnittstellen aufgefüllt werden. Dazu wurden 20 µg DNA in einem 40 µl Reaktionsansatz mit der Polymerase I (Klenow-Fragment) in dem dazugehörigen Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 8 µl dNTP-Mix (je 25 µM) hinzugegeben und der Ansatz weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abbruch der Synthesereaktion wurde der Ansatz auf 100 µl mit HPLC-H₂O aufgefüllt und einer Chloroformextraktion unterzogen.

2.2.9.5 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden zur Hybridisierung von Nucleinsäuren wurde mit dem *Prime-a-Gene[®] Labeling Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden 25 ng eines linearen DNA-Fragments in 10 µl A. bidest. für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 1x Labeling-Puffer, 40 µg/ml BSA, je 20 µM dCTP, dGTP und dTTP, sowie 50 µCi ³²P-dATP und 5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert und danach die freien Nucleotide über eine Gelfiltrationssäule (MicroSpin TMS-300 HR Column) filtriert. Die überschüssigen Nucleotide verblieben in der Säule und die markierte DNA-Sonde war im Durchfluss enthalten. Die Sonde wurde vor dem Einsatz noch mal 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Elektrophorese in Agarosegelen wurden lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente, die im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern, zu analytischen und präparativen Zwecken getrennt. Entsprechend der erwarteten Fragment-Größen wurden 0,7-2%ige Agarosegele verwendet. Die in 1xTBE gelöste Agarose wurde mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden 5:1 mit Probenpuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden die in 2.1.6 aufgeführten Längenstandards parallel aufgetragen. Die Spannung wurde bei 50-100 V festgelegt. Nach etwa 1 h wurde die Elektrophorese beendet, die DNA-Banden im UV-Licht detektiert und das Gel dokumentiert.

2.2.11 Reinigen und Fällern von DNA

2.2.11.1 Elution aus Agarosegelen

Mittels *Quik Spin Columns* (Fa. Roche) und Elutionsreaktionsgefäßen wurde DNA aus Agarosegelstückchen eluiert. Die zu eluierende DNA-Bande wurde unter UV-Lichtbestrahlung (366 nm) ausgeschnitten, in ein *Quik Spin Column* überführt und bei 15.800 x g für 20 min zentrifugiert. Die im Durchfluss befindliche DNA wurde mit NaAcetat/EtOH gefällt (s. 2.2.11.4). Um die Ausbeute zu erhöhen wurde i.d. Regel das Elutionsreaktionsgefäß mit dem Gelstück vor der Zentrifugation für mindestens 3 h bei -20°C eingefroren.

Die für die Transfektion von *L. donovani* eingesetzten linearen DNA-Fragmente wurden mit dem GeneClean[®]Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die so isolierte DNA wurde in einer Gelelektrophorese bezüglich der Größe überprüft und ihre Konzentration bestimmt.

2.2.11.2 Chloropanextraktion

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen wurde eine Chloropanextraktion durchgeführt. Chloropan ist ein 1:2 Gemisch aus Tris-gesättigtem Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol Chloropan versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 6000 x g für 10 min zentrifugiert. Danach befindet sich die DNA in der oberen, wässrigen Phase, wohingegen die durch das Phenol denaturierten Proteine sich in der Interphase sammeln. Abschließend wurde ein weiterer Extraktionsschritt der oberen Phase mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt und die DNA danach mit NaAcetat gefällt (s. 2.2.11.4).

2.2.11.3 Reinigung von PCR-Amplifikaten

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

2.2.11.4 Fällen von Nukleinsäuren

In Anwesenheit monovalenter Kationen bildet DNA bzw. RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, welcher sedimentiert werden kann.

Die Ansätze wurden mit 0,7-0,8 Vol Isopropanol oder 1/10 Vol 3 M NaAcetat (bei DNA pH 4,6 bei RNA pH 5,2) und 2,5 Vol 99% (v/v) EtOH versetzt, 15 min bei 15.800 x g und RT zentrifugiert und anschließend zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um die mitgefällten Salze zu entfernen. Die getrockneten Nukleinsäuren wurden in HPLC-H₂O resuspendiert.

2.2.12 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Durch Behandlung der Bakterien mit hohen CaCl₂-Konzentrationen werden diese kompetent gemacht, fremde DNA-Moleküle mit hoher Effizienz aufzunehmen.

E. coli DH5 α oder pAPlacI^Q Bakterien wurden in 40 ml Kulturen in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden 10 min bei 4000 x g und 4°C sedimentiert und in 20 ml kaltem 50 mM CaCl₂ (steril filtriert) resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C) und das Sediment in 4 ml kaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen und die Suspension bei 4°C gelagert. So wurden die Bakterien 7 Tage für die Transformation verwendet. Für längere Aufbewahrung wurden die Zellen mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

Außerdem wurden die kommerziell erhältlichen OneShot™ Top10 Zellen verwendet. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Bei diesem Klonierungssystem kann eine Blau-Weiß-Selektion durch Zusatz von 50 μ l 2% X-Gal zum Transformationsansatz durchgeführt werden.

Die kompetenten DH5 α Bakterien wurden ebenfalls mittels Hitzeschock transformiert. 3 μ l

Ligationsansatz plus 200 µl Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 60 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Abkühlung auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Danach wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.2.13.1 Northern-Blot-Analysen

Der Transfer von RNA auf eine Nylonmembran wird als Northern-Blot-Analyse bezeichnet. Dafür wurde die RNA zuvor in einem denaturierenden 0,8%igem Agarosegel (SEAKEM® GTG Agarose) getrennt. Dabei wurde durch Zusatz von 6,7% (v/v) Formaldehyd die Ausbildung von Sekundärstrukturen weitgehend verhindert. Das Agarosegel wurde mit 1xMOPS-Puffer hergestellt, der zugleich als Laufpuffer diente. 20 µg RNA in einem Volumen von max. 28 µl wurden mit 28 µl RNA-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 60°C inkubiert. Nach Zusatz von 4 µl RNA-Dye und 1µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) wurde die RNA über Nacht bei 1 V/cm aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Dokumentation des Gels unter UV-Licht. Das Blotting geschah wie folgt: Mehrere Lagen Papiertücher, 2 Lagen Whatmanpapier, eine Nylonmembran sowie das Gel und schließlich wieder 2 Lagen Whatmanpapier wurden übereinandergelegt. Membran und Whatmanfilter wurden zuvor in 20xSSC getränkt, ebenso ein Schwamm, der während des Blot-Vorgangs als Pufferspeicher diente. Der Transfer erfolgte für mindestens 3h, meist aber über Nacht bei RT. Anschließend wurde die Membran bei 85°C im Hybridisierungsofen gebacken und mit UV-Licht bestrahlt (1200 kJ, UV Stratalinker™1800), so dass die RNA kovalent gebunden wurde. Die Membran wurde dann erneut unter UV-Licht fotografiert, bei RT gelagert oder direkt zur Hybridisierung eingesetzt (siehe 2.2.13.3).

2.2.13.2 Southern-Blot-Analysen

Der Transfer von DNA auf eine Membran wird als Southern-Blot-Analyse bezeichnet. Dafür wurden zunächst 10 µg chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA wurde in einem 1%igen präparativen Agarosegel getrennt und unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wurde das Gel nacheinander 15 min in 0,25 M HCl, 2 x 15 min in 0,5 M NaOH und 2 x 15 min in 3 M NaAcetat pH 5,2 inkubiert. Aufbau des Blots, Fixierung der DNA und Lagerung der Membran erfolgte wie unter 2.2.13.1 beschrieben.

2.2.13.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Northern-, bzw. Southern-Blot-Membranen wurden in Hybridisierungsröhren überführt und mindestens 30 min mit „Church-Mix“ bei 50°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Danach wurde die denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe 2.2.9.5) hinzugefügt und über Nacht bei 50°C hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen 30 min bei 50°C mit „Church-Wash“ gewaschen und in Folie eingeschweißt. Schließlich wurden durch die Belichtung eines Röntgenfilms die Signale dokumentiert, wobei die Expositionszeit bei -70°C von 1 h bis hin zu mehreren Tagen variierte.

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der PCR (*polymerase chain reaction*) können bestimmte DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Welcher Abschnitt amplifiziert wird, ergibt sich aus der Wahl der eingesetzten Matrizen-DNA und der Oligonukleotide.

Die PCR besteht aus drei, sich zyklisch wiederholenden, Schritten:

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

Reaktionsansatz 50 µl (*Taq Polymerase System* Fa. Solis *biodyne*):

10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
Oligonukleotid 1 (10pmol)	2 µl
Oligonukleotid 2 (10pmol)	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
FIREPol (5U/µl)	0,2 µl
DNA	0,1-0,5 µg
HPLC-H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Protokoll:

Die Denaturierung erfolgte für 1 min bei bei 95°C. Der Syntheseschritt dauerte, in Abhängigkeit von der Fragmentgröße, 1min 30 s bis zu 4 m bei 72°C.

Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge und Spezifität der Oligonukleotide. Dabei darf die Schmelztemperatur T_m nicht überschritten werden. Sie berechnet sich wie folgt:

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4.$$

Die Zeiten für die Hybridisierung der Oligonukleotide lagen bei 1 min bis 2 min. Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt, wobei die Anzahl der wiederholten Zyklen 30 oder 35 war.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft. Sollte das PCR-Produkt in den TOPO®-Vektor kloniert werden, wurden durch einen 10minütigen Inkubationsschritt bei 72°C nach den Zyklen, die dazu erforderlichen Adenosinüberhänge synthetisiert.

2.2.15 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden mittels einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (Sanger, Nicklen et al. 1977) (Sanger, Coulson et al. 1980) durchgeführt. Dabei erfolgte der Kettenabbruch durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide. Es wurde das *Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit* der Fa. Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein 20 µl Ansatz enthielt 1 µg DNA, 10 pmol Oligonukleotid (M24F oder R, bzw. spezifische Oligonukleotide) sowie 4 µl *Terminator Ready Reaction Mix*. Folgende Reaktion durchlief 25 Zyklen: 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C. Anschließend wurde der Ansatz mit HPLC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit NaAcetat und EtOH gefällt (siehe 2.2.11.4). Die DNA wurde in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe eines ABIPRISM TM377-DNA-Sequencers der Fa. Perkin Elmer.

2.2.16 Transfektion von Leishmanien und Selektion rekombinanter Zellen

Die Leishmanien wurden durch Elektroporation transformiert. Hierbei wurden die Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Impulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Bei dieser Methode, die 1990 von Kapler und Mitarbeitern (Kapler, Coburn et al. 1990) etabliert wurde, entstehen in der Plasmamembran der Leishmanien für kurze Zeit Poren, durch welche die DNA in die Zellen gelangen kann.

Logarithmisch wachsende Zellen wurden geerntet und zweimal mit sterilem, eiskaltem PBS pH 7,0 gewaschen. Zentrifugiert wurde mit 720 x g bei 4°C. Der letzte Waschgang erfolgte mit Elektroporationspuffer, wonach das Sediment in demselben resuspendiert wurde. Für den Transfektionsansatz wurde eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Nun wurden 400 µl dieser Zellsuspension (entsprechend 4×10^7 Zellen) und DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt: 5 µg lineare DNA für eine Integration durch homologe Rekombination bzw. 100 µg Plasmid-DNA für eine episomale Etablierung. Es wurde dreimal hintereinander im Abstand von 10 s bei 1,5 kV (3750 V/cm), 25 µF und 200 Ohm elektroporiert. Die resultierende Zeitkonstante betrug 0,5-1,2 ms. Anschließend wurden die Zellen sofort für 10 min auf Eis gestellt und dann in 10 ml frischem, modifizierten M199 pH 7,0 aufgenommen. 24 h nach der Transfektion wurde, je nach Antibiotikaresistenz, durch Gabe des entsprechenden Antibiotikums mit der Selektion rekombinanter Zellen begonnen.

2.2.17 Vereinzlung von Zellen

Die transfizierten Zellen wurden in 96well Mikrotiterplatten vereinzelt, um Einzelklone zu erhalten. Die Zellpopulation wurde auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen /ml eingestellt und dann in einer seriellen Verdünnung auf eine Endkonzentration von 5 Zellen /ml gebracht. Die Verdünnung erfolgte mit dem modifizierten M199 pH 7,0 und mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum. Jede Vertiefung einer 96well Mikrotiterplatte wurde mit 200 µl dieser Zellsuspension befüllt, sodass sich in jeder Vertiefung theoretisch eine Zelle befand. Wenn nach 2-3 Wochen Inkubation der Mikrotiterplatten bei 25°C ein Drittel bis die Hälfte aller Vertiefungen bewachsen waren, wurde von selektierten Einzelklonen ausgegangen. Diese wurden dann in ein größeres Kulturvolumen überführt.

2.2.18 Herstellung von Proteinextrakten aus Leishmanien

2.2.18.1 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakt für die eindimensionale Gelelektrophorese

Sowohl *L. donovani* als auch *L. major* promastigote bzw. *in vitro* differenzierte amastigote Zellen wurden geerntet, zweimal mit PBS pH 7,0 bzw. 5,5 gewaschen und das Sediment in heißem SDS-Probenpuffer resuspendiert, wobei eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ 20 μ l eingestellt wurde. Dann wurde die Suspension 10 min bei 95°C inkubiert. Um die Proteine vor Proteolyse zu bewahren wurde während der Extraktion ein Proteinaseinhibitor-Mix (10 μ M E-64 und 2 mM Ortho-Phenantrolin) zugesetzt. Die fertigen Extrakte wurden aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.18.2 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakt für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Für ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes 2D-Gel wurden 5×10^8 *Leishmania*-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen wie unter 2.2.18.1 beschrieben. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment in 50 μ l Lysepuffer (40 mM Tris pH 9,5; 1 mM EDTA; 0,01 mM E-64 und 2 mM Ortho-Phenantrolin) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen in Trockeneis/Ethanol und bei 37°C im Thermomixer. Zur Solubilisierung der Proteine wurden dem Lysat 150 μ l Rehydrierungspuffer (8 M Urea; 2 M Thiourea; 4% CHAPS; 2,4% Aminosulfofetain-14 (ASB-14)) hinzugefügt und der Ansatz 15 min auf einem Rollenschüttler bei RT inkubiert. Schließlich folgte eine Zentrifugation bei RT mit 11.600 x g für 1 h, um die löslichen Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und bis zum Einsatz in der 2D-GE bei -70°C gelagert.

2.2.18.3 Herstellung löslicher Proteinextrakte für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Für ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes 2D-Gel wurden 5×10^8 *Leishmania*-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen wie unter 2.2.18.1 beschrieben. Um die Proteine vor Proteolyse zu bewahren wurde während der Extraktion ein Proteinaseinhibitor-Mix (10 μ M E-64 und 2 mM Ortho-Phenantrolin) zugesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen in Trockeneis/Ethanol und bei 37°C im Thermomixer. Anschließend wurden die Proben einer Ultrazentrifugation unterzogen (100000 x g; 30 min bei 4°C). Der resultierende Überstand wurde abgenommen und vierfach verdünnt mit Rehydrierungspuffer (8 M Urea; 4% CHAPS; 2,4% Aminosulfofetain-14 (ASB-14); 1% IPG-Puffer pH 3-10; 0,01% Bromphenolblau; 0,01 mM E-64). Diese Art der Probengewinnung konnte nur für *L. donovani* Zellen von T0 bis T4 der *in vitro* - Stadiendifferenzierung benutzt werden. Die Zellen nach T4 ließen sich nur durch wiederholtes Einfrieren/Auftauen nicht mehr aufschließen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem *bichinonic acid reagent* von Pierce (Rockford, IL, USA) mit Rinder-Serum-Albumin als Standard bestimmt.

2.2.19 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Separierung der zu analysierenden Proteinlösung erfolgte im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970).

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse trennen. Die Proteine werden in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Das anionische Detergenz SDS bindet an die Polypeptide (ca. 1,4 g SDS /g Protein) und maskiert so die eigentliche Ladung der Proteine. Aus den Polypeptiden entstehen anionische Micellen mit einer konstanten negativen Nettoladung pro Masseneinheit. Die Zugabe von DTT bewirkt die Reduzierung von Disulfidbrücken und dadurch die völlige Entfaltung der Proteine. Somit können Ladungs- und Konformationsunterschiede der Proteine vernachlässigt werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit des Moleküls ist nur abhängig von seiner Größe und der Porengröße des Gels. Durch die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme im Laufpuffer und den Puffern für Trenn- und Sammelgel wird die Konzentrierung der Probe in einer scharfen Bande im großporigen Sammelgel erzielt, bevor die eigentliche Trennung des Polypeptidgemisches im engporigen Trenngel erfolgt.

Zusammensetzung des Trenngels:

	7%	8%	10%	12%
AA/Bis* ml	1,75	2	2,5	3
TrisCl/SDS**ml	1,88	1,88	1,88	1,88
A. bidest. ml	3,88	3,6	3,1	2,6
APS 25% µl	25	25	25	25
TEMED µl	5	5	5	5

* 30% AA/ 0,8% Bis; ** Trenngelpuffer

Zusammenstezung des Sammelgels:

AA/Bis* ml	0,65
TrisCl/SDS** ml	1,25
A. bidest. ml	3,05
APS 25% µl	25
TEMED µl	5

* 30% AA/ 0,8% Bis; ** Sammelgelpuffer

Die Gelapparatur aus zwei Glasplatten und Abstandshaltern wurde gründlich mit 70% Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Das Trenngel wurde zwischen die vertikal aufgestellten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde darauf das Sammelgel gegossen. Das Gel wurde in eine Vertikal-Apparatur (Kammern von Bio-Rad oder Phase) eingebaut und die Pufferkammern mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Es wurden 2 Teile zu analysierende Proteinlösung mit 1 Teil 2x SDS-Probenpuffer gemischt und DTT zugegeben (Endkonzentration 10 mM DTT je Probe). Die Proben wurden 3 min bei 95°C erhitzt und aufgetragen. Es wurde ein Größenstandard aufgetragen (s. dazu 2.1.6). Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 25 mA/Gel. Die Gele wurden nachfolgend mit Coomassie-Brilliant-Blau (siehe 2.2.21.1) oder Silbernitrat (siehe 2.2.21.3) gefärbt. Alternativ wurden die Proteine in einem Western Blot (siehe 2.2.23) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

2.2.20 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sehr komplexe Proteingemische, wie z.B. der Gesamt-Proteinextrakt einer Zelle können mit der eindimensionalen Gelelektrophorese nicht ausreichend getrennt werden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese hingegen erlaubt eine bessere Separierung von Proteingemischen.

Bei dieser Technik werden Protein-Gemische nach zwei Parametern getrennt: in der 1. Dimension nach dem isoelektrischen Punkt und in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht. Der isoelektrische Punkt entspricht dem pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. Als Ergebnis erhält man ein Polyacrylamidgel, in dem jede Proteinspezies eines Gemisches als einzelner Punkt angefärbt werden kann.

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) wurde in der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, das IPGphor System mit den immobilisierten pH-Gradienten-Gelstreifen ("IPG-DryStrip Gels") und den entsprechenden Gelhaltern ("Strip holders") der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, verwendet. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es bei der 2D-GE besonders wichtig, die vielen Arbeitsschritte zu standardisieren. Die einzelnen Punkte werden deshalb im Folgenden detailliert beschrieben.

Rehydratisierung der Gelstreifen, Probenapplikation und die 1. Dimension: Die Isoelektrische Fokussierung

Im Wesentlichen erfolgte die Vorbereitung der 1. Dimension nach den Angaben des Herstellers, bzw. dem Skript von A. Görg (Görg et al., 1998).

Das besondere am IPGphor-System ist, dass, im Gegensatz zum älteren Multiphor-System, die Probe gleichzeitig mit der Rehydrationslösung aufgetragen werden kann. Sowohl die Rehydratisierung der Gelstreifen als auch die anschließende isoelektrische Fokussierung wurde in den Gelhaltern durchgeführt. Diese Gelhalter sind längliche Keramik-Gefäße mit einer Vertiefung für den Gelstreifen. In den Boden des Gelhalters sind zwei Elektroden eingearbeitet, die den elektrischen Kontakt zwischen Gel und Flachbett-Kammer herstellen.

Für den Rehydrierungspuffer (s. 2.2.18.2) wurde der Harnstoff in A. bidest. gelöst, CHAPS und IPG-Puffer (Pharmacia) für den gewünschten pH-Bereich hinzugegeben und mit A. bidest. auf das korrekte Volumen aufgefüllt. Es wurde nur soviel Bromphenolblau zugesetzt (*trace*), dass die Lösung hellblau aussah. Der IPG-Puffer enthält Ampholine, kleine Trägermoleküle mit einem definierten isoelektrischen Punkt, welche die Trennung des Proteingemisches entlang des pH-Gradienten erleichtern sollen. Der Rehydrationspuffer wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. DTT wurde erst direkt vor Gebrauch zugegeben. Es wurde in der 1. Dimension mit den Gelstreifen der Länge 18 cm und verschiedenen pH-Gradienten gearbeitet: pH 3 - 10 L (=linear); pH 4 - 7 L und pH 5-6 L.

Die Gelhalter für 18 cm-Gelstreifen haben ein maximales Fassungsvermögen von 340 µl, um Probe sowie Rehydrationslösung für die trockenen Gelstreifen aufzunehmen. Der Anteil an Rehydrationslösung sollte mindestens 50% betragen. Da die Proteinproben schon in Solubilisierungslösung (= Rehydrationslösung) aufgenommen wurden (siehe 2.2.18.2), konnten bis zu 340 µl Proteinprobe appliziert werden.

Für ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes 2D-Gel wurden 5×10^8 *Leishmania*-Zellen eingesetzt.

Probe, Rehydrationslösung und DTT (Endkonzentration max. 40 mM) wurden in die Vertiefung des Gelhalters pipettiert. Die Schutzfolie wurde vom Gelstreifen entfernt und dieser mit der geltragenden Seite nach unten in die Lösung gelegt. Luftblasen unter dem Gel wurden vorsichtig mit einer Pinzette herausgedrückt. Der Streifen wurde mit 1 ml "Dry Strip Cover Fluid" (Mineralöl) bedeckt, um ein Austrocknen des Gels während der Elektrophorese zu vermeiden. Anschließend wurde der Deckel des Gelhalters aufgesetzt, der Gelhalter in korrekter Orientierung auf die Elektrodenplatten der IPGphor-Kammer gesetzt und das Laufprotokoll gestartet. Da sich jede Probe in Bezug auf Gesamtmenge und Abundanz bestimmter Proteine unterscheidet, muss das Laufprotokoll individuell eingestellt werden. Mit dem folgenden Protokoll wurden die in dieser Arbeit angefertigten Gele hergestellt:

<u>Spannung [V]</u>	<u>Dauer [h]</u>
0	2
30	12
500	1
1000	1
2000	1
4000	1
8000	1

bei 20°C; 100 µA/Gelstreifen

Nach Erreichen von mindestens 94000 Vh wurde der Lauf gestoppt und die Gelstreifen umgehend für die 2. Dimension vorbereitet.

Äquibrierung für die 2. Dimension

Material: Tris-Cl, Harnstoff, Glycerol (87% v/v), SDS, Bromphenolblau, DTT, IAA
Äquibrierungspuffer (50 mM Tris-Cl, 6 M Urea, 30% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, Bromphenolblau)

Der Äquibrierungspuffer wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Direkt vor der Äquibrierung wurden die eigentlichen Lösungen hergestellt:

Äquibrierungslösung 1: 10 ml Äquibrierungspuffer wurde bei RT aufgetaut und mit 100 mg DTT versetzt.

Äquibrierungslösung 2: 10 ml Äquibrierungspuffer wurde bei RT aufgetaut und mit 250 mg IAA versetzt.

Vor dem Einsetzen des Gelstreifens in der 2. Dimension musste er in einer SDS- und DTT-haltigen Lösung äquibriert werden (Äquibrierungslösung 1, 15 min). Dazu wurde der Gelstreifen mit einer Pinzette in eine unten verschlossene 5-ml-Sterilpipette überführt. Ein zweiter Äquibrierungsschritt folgte mit IAA, um die reduzierten SH-Gruppen zu alkylieren, (Äquibrierungslösung 2, 15 min). Nach der Äquibrierung wurde der Gelstreifen unmittelbar weiterverwendet.

Die 2. Dimension - SDS-PAGE

Die SDS-PAGE als 2. Dimension funktioniert so, wie bereits unter 2.2.19 beschrieben. Es wurden Gelkammern mit der Abmessung 18 x 20 cm verwendet. Die Dicke der Abstandhalter zwischen den Glasplatten betrug 1 mm. Es wurde ein 12,5% Trenngel (siehe unten) gegossen und zwar bis ca. 0,5 cm unter den oberen Rand des vertikalen Gießstandes und mit Isopropanol überschichtet. Es wurde kein Sammelgel gegossen! Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut, und diese mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Auf das Trenngel wurde ein 1-2 cm breiter Streifen aus einer Agarose-Bett-Lösung (Elektrophoresepuffer; 0,5% Agarose) gegossen und die äquibrierten Gelstreifen wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf dem Trenngel platziert. Als Größenmarker dienten die unter 2.2 aufgeführten Standards. Es wurde eine Spannung von 15 mA/Gel bei 4°C angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden nachfolgend mit Coomassie-Brilliant-Blau oder Silbernitrat angefärbt (s. 2.2.21).

Zusammensetzung eines 12,5% Trenngels für die 2. Dimension:

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

2.2.21 Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.2.21.1 Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Der Farbstoff CBB R-250 bindet unspezifisch an fast alle Proteine.

Durch die Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau können in einer Bande ca. 8-10 ng Protein nachgewiesen werden.

Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blau R 250, 10% Essigsäure, 50% Methanol, 40% Wasser)

Entfärber (10% Essigsäure, 45% Methanol, 45% Wasser)

Proteine wurden durch Schwenken der Proteingele in Färbelösung über Nacht gefärbt. Durch nachfolgendes Schwenken in Entfärber wurden Proteinbanden nach mehrmaligem Erneuern der Lösung sichtbar.

2.2.21.2 Die kolloidale Coomassie-Blau-Färbung (nach V. Neuhoff)

Stammlösung 1 (5% CBB G-250 (hochrein) in A. bidest.),

Stammlösung 2 (2% (w/v) Phosphorsäure (2 g 85% H₃PO₄ in 100 ml A. bidest.), 10% (w/v) Ammoniumsulfat (AMS)),

Stammfärbelösung (0,1% CBB G-250 in Stammlösung 2).

Färbelösung (80 ml (gut durchgeschüttelter) Stammfärbelösung plus 20 ml Methanol absolut)

Außer der Stammlösung 1 wurde alles vor Gebrauch frisch angesetzt. Die Gele wurden über Nacht in Färbelösung bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde einmal mit 25% MeOH gewaschen und das Gel dann in 25% AMS überführt. Darin können die Gele ohne Farbverluste aufbewahrt werden, da die Protein-Farbstoffmicellen präzipitiert werden (Neuhoff, Arold et al. 1988). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,2 - 1 ng Protein pro Bande.

Bei dieser Methode wird der Farbstoff CBB G-250, der eine geringere Löslichkeit aufweist als CBB R-250, in Phosphorsäure gelöst. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat wird der Farbstoff in seine kolloidale Form gedrängt. Die kolloidalen Partikel sind so groß, dass sie nicht in die Gelporen eindringen können. Der gleichzeitig vorhandene molekular-disperse Farbstoff kann aber ins Gel diffundieren und an die Proteine binden. Dies führt zu einer weitgehend hintergrundfreien Färbung. Auf eine Fixierung mit 12 % TCA wurde verzichtet, um einen späteren *in-situ*-Verdau zu ermöglichen.

2.2.21.3 Silberfärbung (nach J. Heukeshoven, R. Dernick)

Material:

Lösung 1	(30% Ethanol (99%); 10% Eisessig)
Lösung 2	(30% Ethanol (99%); 0,5 M NaAcetat; 0,5% Glutardialdehyd; 0,2% Na ₂ S ₂ O ₃)
Lösung 3	(0,1% AgNO ₃ ; 0,02% Formaldehyd)
Lösung 4	(2,5% Na ₂ CO ₃ ; 0,01% Formaldehyd)
Lösung 5	(0,05 M EDTA-Na-Salz)

Die Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Silbernitrat beruht auf der Komplexbildung von Silberionen mit einigen Aminosäureseitenketten. Durch Reduktion der an Protein-Molekülen komplexierten Silberionen entsteht metallisches Silber. Die Silberfärbung von Proteinen ist ca. 10-50 mal empfindlicher als die Coomassie Brilliant-Blau-Färbung (siehe 2.2.21.1).

Die Gele wurden nacheinander in den Lösungen 1 - 6 geschwenkt:

1. 10 min mit Lsg. 1,
2. 10 min mit Lsg. 2,
3. 5 x 8 min mit A. bidest. waschen,
4. 10 min mit Lsg. 3, (Lsg. 3 wurde als Silber-Abfall entsorgt).

Anschließend wurden die Gele ca. 5-10 min in Lösung 4 entwickelt. Der Entwickler wurde abgossen, sobald sich ein Grauschleier bildete und die Reduktion mit frischem Entwickler fortgeführt. Die Entwicklung wurde mit Lösung 5 gestoppt.

2.2.21.4 Aufbewahrung

Die Gele wurden digitalisiert und anschließend gut gewässert in Klarsichtfolie luftdicht eingeschweißt und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.22 MALDI TOF MS

(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry)

Die mit Hilfe der 2D-GE separierten Proteine wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Mit dieser Technik kann die Molekülmasse im Hochvakuum frei fliegender Ionen bestimmt werden. Dafür wird mittels einer Ionenquelle aus einer Probe, wie etwa einem Peptidgemisch, ein Strahl gasförmiger Ionen generiert, die dann in einem Massenanalysator bezüglich ihres Masse/Ladungsquotienten getrennt und an einem Detektor nachgewiesen werden. Das Peptidgemisch wird in eine sogenannte Matrix (α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure) eingebettet und durch Laserdesorption ionisiert. Die Trennung der Ionen erfolgt abhängig von ihrem Flugverhalten/ der Flugzeit in einem Messrohr, angeregt durch eine gepulste Ionenerzeugung.

2.2.22.1 Probenvorbereitung

Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Proteine wurden mit einer gekürzten 1000 μ l-Pipettenspitze aus dem Gel ausgestochen und auf einer mit 70%-igem EtOH gereinigten Glasfläche mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gelstücke wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in 50% v/v Acetonitril in 25 mM Ammoniumbikarbonat gewaschen und anschließend in 100% Acetonitril dehydriert. Nach Rehydrierung in 10 μ l 5 mM Ammoniumbikarbonat wurde das Protein enzymatisch verdaut mit 300 ng Trypsin in 10 μ l 5 mM Ammoniumbikarbonat. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Um anschließend die Peptide aus der Gelmatrix zu extrahieren, wurde 20 μ l 0,3% v/v TFA zu dem Ansatz gegeben und dieser im Ultraschallbad für 10 min beschallt. In einer anschließenden Vakuumzentrifugation (30 min) wurde das Flüssigkeitsvolumen des Ansatzes eingengt und danach die Peptide in 8 μ l 0,1% v/v TFA; 5% v/v Acetonitril in H₂O aufgenommen. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Peptide über eine C18 Revers-Phasen-Minisäulen-Chromatographie in einer Mikropipettenspitze (Zip Tip C18) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Für die MALDI TOF MS wurden die Peptide mit 2,5 μ l Matrix-Lösung (7 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure in 60% v/v Acetonitril/ 0,12% v/v TFA) eluiert und auf einer goldbeschichtete Platte (*grid*) platziert.

2.2.22.2 Massenspektrometrische Messungen

Die Messungen wurden mit einem *Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI TOF* Massenspektrometer durchgeführt.

Die Parameter wurden wie folgt gewählt:

- Reflektiermodus
- 70%-ige Netzspannung
- Beschleunigungsspannung 20 kV
- Verzögerung 200 ns
- 256 Laserschüsse/Spektrum

Die so erhaltenen Massenspektren wurden anhand bekannter Massen autokatalytischer Trypsin-Fragmente kalibriert. Es wurden die monoisotopischen Massen bestimmt und die resultierenden Spektren mit der *Data Explorer Software* (IBM) manuell prozessiert.

2.2.22.3 Datenbankanalyse

Trypsin spaltet Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin. Daher können die Massen der durch Trypsin-Verdau entstandenen Peptide für jeden Eintrag in einer Protein-Datenbank berechnet werden. Die theoretisch ermittelten Massen werden mit den experimentell ermittelten Massen verglichen. Stimmen ausreichend viele der Peptidmassen überein, kann das Protein identifiziert werden.

Um die Proteine zu identifizieren wurde eine Datenbankanalyse mit den erhaltenen Peptidmassen-Listen durchgeführt. Dabei wurden die *NCBI* und die *Leishmania major Gene DB* Datenbanken durchsucht. (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/database/L.major/sequences/LEISHPEP>). Als Suchprogramme dienten MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) und MASCOT (Matrix Science; http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ).

Es wurden folgende Suchparameter angelegt: Zugelassen war eine Misspaltung durch das Trypsin. Es wurden nur monoisotopische Massen berücksichtigt und eine Massentoleranz von +/- 0,7 Da erlaubt. Außerdem wurde eine mögliche Modifikation von Propionamid an Cysteinresten und eine eventuelle Oxidation des Methionins berücksichtigt.

2.2.23 Western Blot: Transfer von Proteinen auf Membranen

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen, da sie dadurch für eine Reaktion mit spezifischen Antikörpern zugänglich gemacht werden. Es wurde mit der *semi-dry blot*-Methode gearbeitet. Als Transferpuffer diente 1x Elektrophoresepuffer. Whatmanpapier, Membran und Gel wurden in 1x Elektrophoresepuffer gelegt. Die Elektrodenplatten wurden mit A. bidest gereinigt. Als erstes wurden 2 Lagen feuchtes Whatmanpapier auf die Anode gelegt, dann das Gel, danach die Nitrocellulosemembran und abschließend 2 Lagen Whatmanpapier darauf gelegt. Die obere Elektrodenplatte wurde aufgesetzt und der Blot-Vorgang gestartet: 75 min mit 1,3 mA/cm².

2.2.24 Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen

In einem Immuno-Blot werden individuelle Proteine durch spezifische Antikörper Reaktionen indirekt nachgewiesen. Um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern, wurden zunächst freie Bindungsstellen durch Inkubieren mit Blockierlösung (5% Milchpulver in 1xTBS/0,5%Tween20) für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde der Blot in frische Blockierlösung überführt und der 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Danach wurde die Membran bei RT 3 x mit 1xTBS/0,5%Tween20 gewaschen und anschließend mit dem 2. Antikörper für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde wieder 3x mit 1xTBS/0,5%Tween20 gewaschen und der Blot kurz in AP-Puffer äquilibriert. Die Bindung der Antikörper wurde sichtbar gemacht durch Schwenken in Entwicklerlösung (66 µl NBT (5% w/v in 70%DMF) + 33 µl BCIP (5% w/v in 70%DMF) ad 10 ml AP-Puffer. Mit Wasser wurde die Entwicklung gestoppt.

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
<u>Anti-LmTK polyklonales Antiserum</u>	<u>1:200</u>
<u>Anti-HSP 70 polyklonales Antiserum</u>	<u>1 :1000</u>
<u>Anti-HSP 90 polyklonales Antiserum</u>	<u>1 :1000</u>
<u>Anti-HSP 100 polyklonales Antiserum</u>	<u>1 :1000</u>
<u>Anti-Tubulin, monoklonal</u>	<u>1 :500</u>
<u>Anti-A2-Proteine, monoklonal</u>	<u>1 :50</u>
<u>Sekundärer Ak Anti-Maus IgG, AP-konjugiert</u>	<u>1:500</u>
<u>Sekundärer Anti-Huhn, AP-konjugiert</u>	<u>1:1000</u>

2.2.25 Rekombinante Expression von *L. donovani* Proteinen

2.2.25.1 Überexpression in *E. coli*

Die Überexpression der Proteine erfolgte in pAPlacI^Q-Zellen. Die kodierenden Regionen wurden mittels PCR amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pJC45 ligiert. Dieser Vektor zeichnet sich durch ein N-terminales His-*tag* aus, bestehend aus zehn Histidinen, was eine Reinigung der Proteine erlaubt. Die resultierenden Plasmide *LdTK:pJC45*, *LdAK:pJC45*, *LdCAC1-pJC45*, *LdCAC1pJC45*, *LdArfGappJC45* wurden in pAPlacI^Q-Zellen transfiziert. Nach mindestens 14 h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienklone von den LB-Amp-Agarplatten in 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 100 µg/ml Kanamycin) plus 50 ml 20% Glukose überführt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Protein-Expression induziert und die Bakterien-Kultur weitere 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur bei 6000 x g für 20 min sedimentiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.25.2 Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die rekombinant exprimierten Proteine wurden nach dem Prinzip der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA *superflow* Säule (Fa. Qiagen) gereinigt. Hierfür wurde das Bakteriensediment zunächst in 12 ml 1x Bindungspuffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall-Behandlung lysiert. Durch Zentrifugation bei 15.800 x g und 4°C für 45 min wurden die unlöslichen *inclusion bodies* von den löslichen Proteinen im Überstand getrennt und diese über Affinitätschromatographie isoliert. Dabei binden die Proteine über ihren N-terminalen His-*tag* an eine mit Ni-Ionen beladene Säulenmatrix. Ungebundene Proteine werden ausgewaschen und die gebundenen Proteine werden durch eine Steigerung der Imidazol-Konzentration eluiert, wobei das gebundene Protein kompetitiv von der Matrix verdrängt wird.

Die Säulenmatrix wurde zunächst mit dem 10fachen Volumen an Bindungspuffer äquilibriert, bevor sie mit der Proteinlösung beladen wurde. Anschließend wurde mit dem 10-fachen Volumen an Waschpuffer I und mit 20 ml Waschpuffer II gespült und danach die Zielproteine mit 12 ml Elutionspuffer in 1 ml Aliquots eluiert. Die resultierenden Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf Reinheit und Proteingehalt geprüft. Die Aliquots mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt und direkt für die Immunisierung von Hühnern eingesetzt (siehe 2.2.27). Zur Herstellung der entsprechenden Antikörper wurden Aliquots mit rekombinantem Protein *LdCAC1* sowie *LdCAC3* für die Immunisierung in Kaninchen an die Fa. Eurogentec gesandt.

2.2.26 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Dieser Test beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau G-250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm verschiebt, sobald Proteinbindung erfolgt.

5 -100 µl Proteinlösung wurden in 800 µl H₂O verdünnt und mit 200 µl Bradfordreagenz für 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve wurde der Proteingehalt ermittelt. Die Eichkurve wurde mit verschiedenen BSA-Konzentrationen von 0 bis 0,5 mg/ml aufgenommen.

2.2.27 Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY)

Für die Antikörper-Gewinnung wurden Hühner mit rekombinantem Protein immunisiert. Die Isolierung der Antikörper (IgY) aus dem Eigelb erfolgte nach Polson et al. (Polson, von Wechmar et al. 1980) durch fraktionierende Polyethylenglykol-Fällung. Wie nachfolgend beschrieben, wurde aus den Eiern zunächst ein Präimmunserum gewonnen und dieses im Western Blot auf eine Reaktion mit *Leishmania* Zellextrakten getestet. Zeigte sich hierbei bereits eine Immunreaktion, konnte das Huhn nicht zur Immunisierung eingesetzt werden. Für die Immunisierung wurden dem Huhn 200-300 µg rekombinantes Protein, gemischt mit komplettem Freudschem Adjuvanz im Verhältnis 1:2, subkutan injiziert. Zwei und vier Wochen danach folgten die *booster* Immunisierungen, wobei die gleiche Menge Antigen mit inkomplettem Freudschem Adjuvanz 1:2 gemischt und injiziert wurde.

Für die Gewinnung von Antiseren wurde das Eigelb vom Eiweiß getrennt und nach Entfernen der Dotterhaut mit 1 Vol Kaliumphosphatpuffer (10 mM K₂PO₄; pH 7,2; 100 mM NaCl) gemischt. Mit Zusatz von 1 Vol Kaliumphosphatpuffer mit 7% Polyethylenglykol (PEG) 6000 und 30-minütiger Inkubation auf einem Rollenschüttler bei 4°C wurden kontaminierende Lipidverbindungen bei einer Endkonzentration von 3,5% PEG gefällt und abzentrifugiert (8.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde filtriert und die Antikörper durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 12%) unter ständigem Mischen gefällt und sedimentiert (8.000 x g, 10 min, 4°C). Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 Vol Kaliumphosphatpuffer resuspendiert. Mit Zugabe von 1 Vol Kaliumphosphatpuffer mit 24% PEG 6000 (Endkonzentration 12% PEG 6000) wurden die Antikörper erneut gefällt und sedimentiert (8.000 x g, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde nun in 5 ml Kaliumphosphatpuffer gelöst und mit einer abschließenden Zentrifugation (8.000 x g, 45 min, 4°C) erfolgte die Trennung von ungelösten Bestandteilen. Das nun klare Immunserum wurde in ein frisches Schraubgefäß überführt, durch Zugabe von 0,02% Natriumazid konserviert und bei -20°C gelagert. Die Qualitätsprüfung der Immunseren erfolgte durch eine Western Blot Analyse.

2.2.28 Mikroskopie

2.2.28.1 Fluoreszenzmikroskopie und Thymidin Kinase-Bromiduridin-Assay

Verschiedene rekombinante und Wildtyp *Leishmania*-Stämme wurden in einem Thymidin Kinase-Bromiduridin-Assay auf bestehende Thymidin-Kinase-Aktivität untersucht. Hierfür wurden die Zellen *in situ* für 4 Stunden mit 10 μ M Bromiduridin in M199 pH 7,0 bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1×10^7 Zellen geerntet, 10 min bei 720 x g und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit M199 pH 7,0 gewaschen und das Zellsediment in 100 μ l M199 pH 7,0 resuspendiert. 20 μ l dieser Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und die Zellen in Methanol bei -20°C über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS pH 7,0 gewaschen und dann die Zellen mit PBS/ 0,2% Triton X-100 für 15 min permeabilisiert. Danach wurde wiederum dreimal mit PBS pH 7,0 gewaschen und die Zellen dann für 30 min in PBS/10% FCS inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Hiernach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in PBS/ 10% FCS für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS pH 7,0 wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper inkubiert - verdünnt in PBS/ 10% FCS für 1 h bei RT. Abschließend wurden die Zellen für 2 min mit Hoechst 33258 (DAPI) in PBS pH 7,0 inkubiert, um die DNA enthaltenden Organellen zu färben. Die Präparate wurden in *Mounting Medium* gebettet und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte an einem Zeiss *Axioskop 2 Plus* Immunfluoreszenzmikroskop bei 630- und 1000-facher Vergrößerung mit der *Improvision software*.

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
<u>Anti-LdTK polyklonales Antiserum (Huhn)</u>	<u>1 : 500</u>
<u>Anti-LdDC2 polyklonales Antiserum (Huhn)</u>	<u>1 : 500</u>
<u>Anti-β-tubulin, monoklonal, <i>clone tube2.1</i>, Sigma</u>	<u>1 : 500</u>
<u>Anti- Bromiduridin, monoklonal, Sigma</u>	<u>1 : 100</u>
<u>Sek. AK Anti-Maus IgG, CyTM 2-konjugiert</u>	<u>1 : 1000</u>
<u>Sek. AK Anti-Huhn IgG, CyTM 2-konjugiert</u>	<u>1 : 1000</u>

2.2.28.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Es wurden 1×10^7 *Leishmanien* sedimentiert (720xg, 10 min, 4°C), zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen und für 1 h in 2% Paraformaldehyd/ 0,25% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Proben in aufsteigender Ethanolkonzentration von 30-99% für jeweils 30 min entwässert. Anschließend folgte über Nacht die Inkubation in 90% Ethanol / 10% L.R.White, wonach in vier Schritten die Ethanolkonzentration verringert und gleichermaßen die Konzentration des L.R.White erhöht wurde, bis die Proben schließlich in 100% L.R.White vorlagen. Die Proben wurden dann in Gelatine kapseln überführt und nach Aushärtung erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut-E). Die Schnitte wurden auf so genannte *grids* gezogen und über Nacht getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Proben für 1 h mit 3% BSA/ 0,1% Tween 20 in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS wurde mit dem ersten Antikörper (1:500 in 3% BSA/ 0,1% Tween 20 in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde wiederum dreimal mit 3% BSA/ 0,1% Tween 20 in PBS gewaschen und die Proben anschließend 1 h mit aus Kaninchen gewonnenem anti-Huhn-IgY (1:1500 in 3% BSA/ 0,1% Tween 20 in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Protein A-Goldpartikeln behandelt und zur Kontrastierung wurden die Schnitte in einer gesättigten Uranylacetatlösung inkubiert. Die fertigen Präparate wurden mit einem Philips TEM 301-Gerät mikroskopisch untersucht. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Manfred Krömer durchgeführt.

2.2.28.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Es wurden 1×10^8 *Leishmanien* sedimentiert (720 x g, 10 min, 4°C), zweimal mit PBS pH 7.0 gewaschen und in 2% Glutaraldehyd in Natriumcacodylat-Puffer sowie anschließend in 1% Osmium fixiert.

Die Proben wurden in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen von 30-100% entwässert. Nach der so genannten Kritischen-Punkt-Trocknung (*critical point drying*) wurden sie mit Gold behandelt und mit einem Philips SEM 500 mikroskopisch untersucht. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Andrea Macdonald durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Proteomanalyse von *L. donovani* während der *in vitro* Stadiendifferenzierung

3.1.1 Die *in vitro* Stadiendifferenzierung für *L. donovani*

Während der Stadiendifferenzierung, der Umwandlung vom promastigoten zum amastigoten Stadium, kommt es zu gravierenden Veränderungen auf morphologischer und biochemischer Ebene. Dieser Prozess wirkt sich folglich auch im Proteinmuster der Zelltypen aus.

Die Stadiendifferenzierung lässt sich *in vitro*, in Zellkultur, vollziehen. Diese Methode bietet die Möglichkeit, große Mengen kontaminationsfreie promastigote und amastigote Zellen zu gewinnen, die für die Proteomanalyse benötigt werden.

Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.2.3 beschrieben kultiviert. Für die im Folgenden beschriebenen Analysen wurden Zellextrakte von Tag 0 (T0=Promastigote) bis Tag 5 (T5=Amastigote) eingesetzt. Nach dem dritten Tag haben beide Auslöser für die *in vitro* Stadiendifferenzierung, Hitzeschock und Absenkung des pH-Wertes, stattgefunden.

3.1.2 Vergleichende Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese

Grundlage für eine Proteomanalyse ist die Vorbereitung der zu untersuchenden Proben (siehe dazu 2.2.18.2 und 2.2.18.3). In dieser Arbeit wurde sowohl Gesamtproteinextrakt aus Zellen von T0 bis T5 der *in vitro* Stadiendifferenzierung, als auch die Fraktion der löslichen Proteine von T0 bis T4 mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Bei den Gesamtproteinextrakten war aufgrund der hohen Konzentration an Harnstoff und Detergenz eine zuverlässige photometrische Bestimmung des Proteingehalts nicht möglich. Es wurden daher stets gleiche Zellzahlen für die Herstellung der Extrakte eingesetzt: 5×10^8 Zellen für ein Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes Gel, dies entspricht ca. 500 μg Protein und 1×10^8 Zellen für ein silbergefärbtes Gel (entspricht ca. 100 μg Protein).

Die Reproduzierbarkeit der 2D- Gelelektrophorese (2D-GE) ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteomanalyse. Es wurden daher für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt der Stadiendifferenzierung (T0 bis T5) mindestens 3 2D-Gele mit Proben aus verschiedenen Zellaufschlüssen gefertigt.

Insgesamt konnten aus Gesamtproteinextrakt und löslichem Proteinextrakt unter Verwendung verschiedener pH-Gradienten in der 1. Dimension etwa 2000 verschiedene, mit Silber anfärbende Proteine mittels der 2D-GE getrennt werden. Mit dem pH-Gradient 4-7 linear wurden mit verschiedenen Proben 600-700 unterschiedliche Proteine getrennt. Die Verwendung der engeren pH-Gradienten 5-6 und 4-5 erzielte eine Auflösung von 100 bis 300 Proteinen. Wie erwartet, war die Färbung mit Silber sensitiver als mit Coomassie. Jedoch sind die Färbungen auch in gewissem Maße abhängig von der Proteinspezies. Es wurde beobachtet, dass im silbergefärbten Gel sehr abundant erscheinende Proteine sich mit Coomassie kaum bis gar nicht anfärben ließen und umgekehrt. In Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gelen (pH4-7 L) wurden durchschnittlich 500 verschiedene Protein-*spots* detektiert. Abb. 1 zeigt 2D-Gele von Gesamtproteinextrakten der Stadien T0 und T3 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung von *L. donovani*. In Abb. 2 sind als Beispiel für die 2D-GE von Proben der löslichen Proteinfraction 2D-Gele der Stadien T0 und T2 gezeigt. Die spezifischen Protein-*spot* Muster und die Intensität der einander entsprechenden Protein-*spots* sind reproduzierbar und konnten miteinander verglichen werden.

Auswertung der Proteinmuster

Der Vergleich der Protein-Verteilungs-Muster der zu analysierenden Proben erfolgte manuell. Die Auswertung erfolgte in mehreren Schritten: 1. Vergleich der Proben aus verschiedenen Zeitpunkten der Stadiendifferenzierung T0 bis T5; 2. Vergleich der Proteinmuster zwischen Gesamtproteinextrakt und löslichem Proteinextrakt und 3. Vergleich einer Probe eines bestimmten Zeitpunktes der Stadiendifferenzierung nach Separierung in verschiedenen pH-Gradienten.

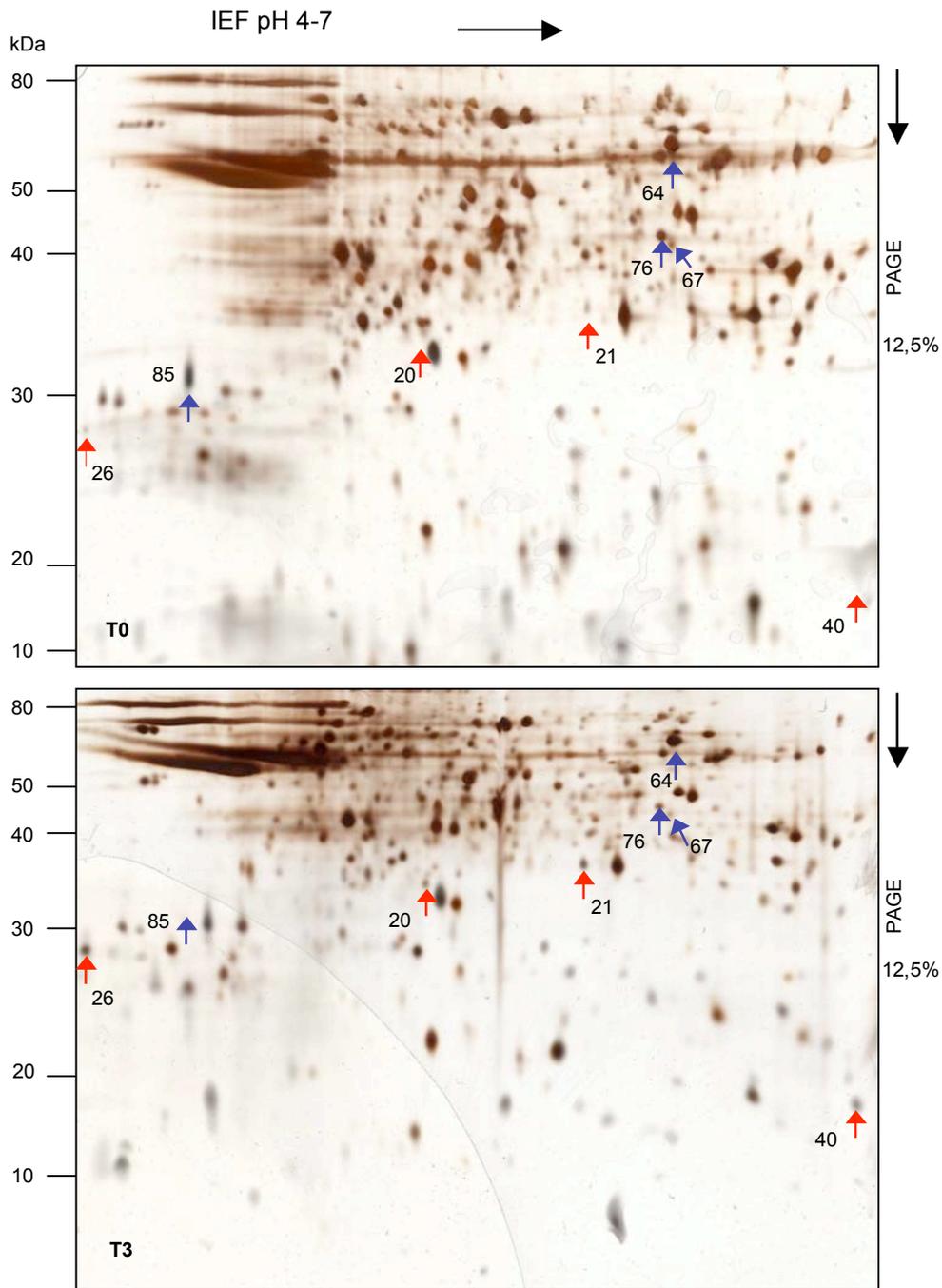


Abb. 1
2D-Gele von Gesamtproteinextrakten der Stadien T0 und T3 der *in vitro* Differenzierung von *L. donovani*
 Die Lysate der Tage T0 (=Promastigote) und T3 der *in vitro* Stadiendifferenzierung wurden in der 1. Dimension in einem immobilisierten pH-Gradienten von pH4-7L* nach dem isoelektrischen Punkt und in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel separiert. Amastigoten-spezifische Protein-spots sind rot und Promastigoten-spezifische Protein-spots sind blau markiert. Die Ziffern entsprechen den Nummern der Proteinliste aus Tab. 3.1. Der molekulare Standard ist jeweils auf der linken Seite angegeben.
 *L=linear

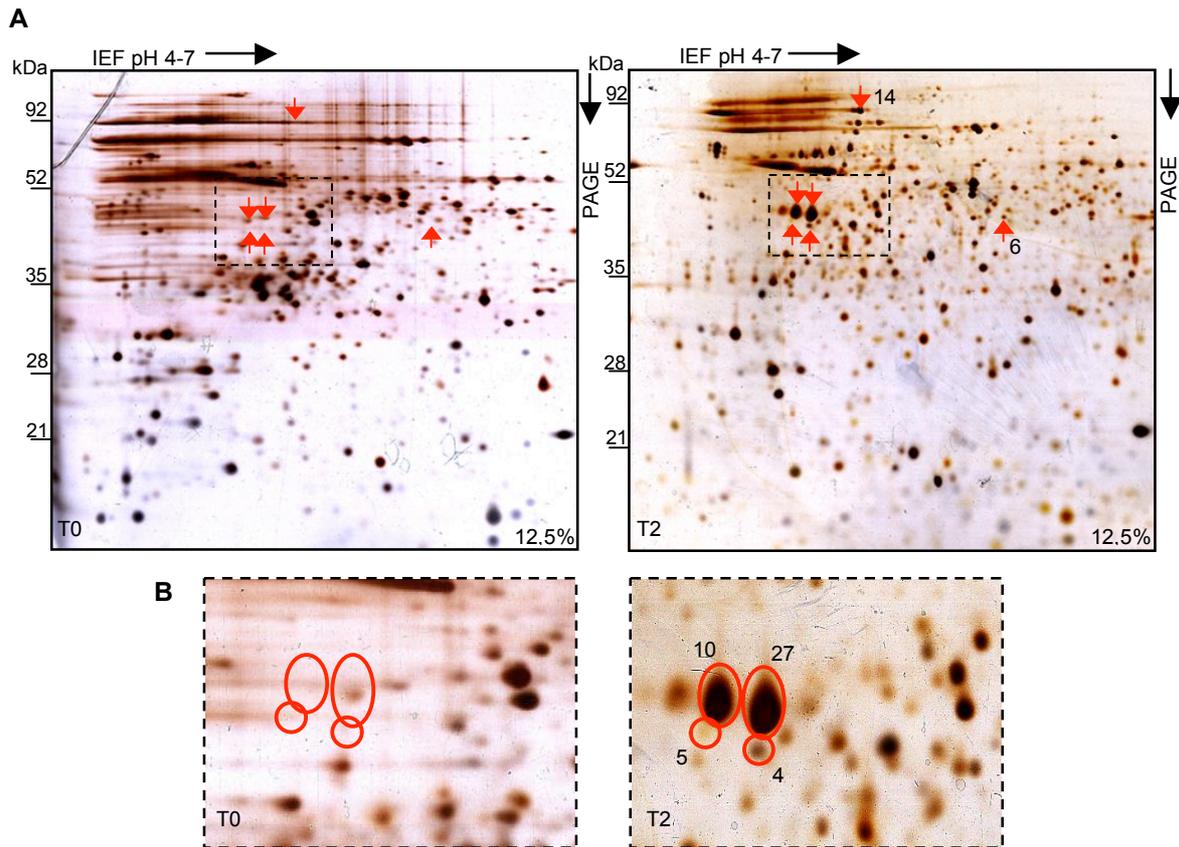


Abb. 2

2D-Gele der löslichen Fraktion von T0- und T2-Lysaten *in vitro* differenzierter *L. donovani*-Zellen

A. Die löslichen Fraktionen von Leishmanienlysaten der Tage T0 (=Promastigote) und T2 der *in vitro* Stadiendifferenzierung wurden in der 1. Dimension in einem immobilisierten pH-Gradienten von pH4-7L* nach dem isoelektrischen Punkt und in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel separiert. Der molekulare Standard ist jeweils auf der linken Seite angegeben. Die roten Pfeile markieren die Positionen Amastigoten-spezifischer Protein-spots. **B.** Es sind vergrößerte Ausschnitte aus den markierten Bereichen der entsprechenden Gele gezeigt. Die Ziffern entsprechen den Nummern der Proteinliste aus Tab. 3.1: Nr.4= ArfGap ähnliches Zink-Finger Protein; Nr.5= Arginin Kinase; Nr.6= Cyclophilin D; Nr.10= Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase; Nr. 14= Hitzeschock Protein 83; Nr.21= putative Thymidin Kinase. *L=linear

3.1.3 Identifizierung der stadienspezifischen Proteine mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie

Alle identifizierten Proteine aus den Coomassie gefärbten 2D-Gelen, deren Abundanz während der Stadiendifferenzierung reguliert war, wurden mittels MALDI-TOF analysiert. Insgesamt wurden 94 differentielle Protein-*spots* untersucht. Um sicher zu gehen, dass es sich bei als gleich identifizierten *spots* von verschiedenen Gelen auch tatsächlich um dieselbe Proteinspezies handelt, wurden solche auch aus mehreren Gelen analysiert. Dies war ausnahmslos der Fall.

Für 86, also 91,5 % der untersuchten Proteine wurden aus der MALDI-TOF-Analyse auswertbare Peptidmassenspektren erhalten. Dabei stammten 65 dieser differentiellen Proteine aus Gesamtzellextrakten und 21 Proteine aus der löslichen Fraktion. Die Abfrage mit den aus den Spektren ermittelten Peptidmassenlisten in der NCBI- bzw. *L. major* GeneDB-Datenbank führte zu einer eindeutigen Zuordnung zu den Einträgen in 71 Fällen. Es wurden also 75,5% der insgesamt 94 als stadienspezifisch reguliert beobachteten Proteine identifiziert (s. Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Liste der mittels MALDI-TOF analysierten stadienspezifischen Proteine

spot Nr.	Expressions- kinetik (Tag)			identifiziertes Protein/ Organismus	Accession Nr.	MW theor/ exp ^{a)}	pI theor/ exp ^{a)}	Anz. der überein- stimmen- den Massen	Signal- Sequenz/ M ^{b)} TMD ^{c)} TMH ^{d)}
	0	1	2-5						
	Gruppe A								
1 G*	-	+	+	Adenosylhomo- Cysteinase <i>L. donovani</i>	323033	47/45	5,6/4,9	6/27	–
2 G*	-	+	+	Alanin- Transaminase/ Aminotransferase <i>L.</i> <i>major</i>	15426123	55/52	5,6/5,8	9/26	M
3 L [#]	-	+	+	Alkohol-Dehydrogenase ähnliches Prot. <i>L. major</i>	9989041	28/30	6,3/6,9	9/62	M
4 L [#]	-	+	+	ArfGap ähnliches Zink-Finger-Protein <i>L.</i> <i>major</i>	11071796	45/43	8,6/5,0	6/32	–
5 L [#]	-	+	+	Arginine Kinas <i>T. cruzi</i>	3831705	44/40	6,7/4,9	7/44	–
6 L [#]	-	+	+	Cyclophilin D (Peptidyl-prolyl- <i>cis</i> - <i>trans</i> -isomerase) <i>L. major</i>	7770370	38/40	6/5,9	7/38	–
7 L [#]	-	+	+	mögliches Elongations- Protein1 <i>L. major</i>	9663709	23/27	9/6	5/35	–
8 L [#]	-	+	+	Enolase <i>L. major</i>	8388689	46/49	5,6/5,6	19/46	–
9 G*	-	+	+	Enolase <i>L. major</i>	8388689	46/35	5,6/5,5	14/27	–
10 L [#]	-	+	+	Fructose-1,6- bisphosphat-Aldolase <i>L. mexicana</i>	5834626	40/46	9/4,9	10/73	–
11 G*	-	+	+	HSP70 verwandtes Protein 1, mitochondr. <i>Precursor</i> <i>L. major</i>	1170375	68/73	5,5/5,2	18/50	M
12 G*	-	+	+	HSP70 <i>L. donovani</i>	1078698	71/74	5,4/5,2	6/50	–
13 G*	-	+	+	HSP70 <i>L. donovani</i>	1078698	71/45	6,5/4,9	8/36	–
14 L [#]	-	+	+	Hitzeschock Protein 83 (=HSP90) <i>L. major</i>	123665	80/85	5/5,2	20/66	–
15 G*	-	+	+	Hitzeschock Protein 83 (=HSP90) <i>L. major</i>	123665	80/50	4,6/4,9	7/24	–
16 G*	-	+	+	Hitzeschock Protein 83 (=HSP90) <i>L. braziliensis</i>	1368348	75/43	5,4/5	12/45	–
17 L [#]	-	+	+	Nukleosiddiphosphat- Kinase <i>L. infantum</i>	12055485	18/16	7,8/6,9	10/45	–
18 G*	-	+	+	wahrscheinliche Proteasom-alpha-7- Untereinheit <i>L. major</i>	CHR27_ tmp.155c 20s GeneDB	26/30	5,9/5,6	5/21	–
19 G*	-	+	+	mögliches	11061633	17/18	5,6/5,4	10/40	–

		ran-Bindungsprotein <i>L. major</i>						
20 G*	- + +	Rieske-Eisen-Schwefel-Protein <i>T. brucei</i>	1142998	33/32	6/5,5	5/32	M TMD	
21 G*	- + +	mögliche Thymidin Kinase <i>L. major</i>	7687932	31/35	8,2/5,6	6/46	-	
22 G*	- + +	β-tubulin <i>L. mexicana</i>	13569565	49/35	4,7/4,9	6/36	-	
23 L [#]	- + +	Hypothetisches Protein CAB55364 <i>L. major</i>	5852119	70/36	5,1/5,7	8/34	Ca ²⁺ - Bindungs-Motif	
24 L [#]	- + +	Hypothetisches Protein CAC14613 <i>L. major</i>	11071769	54/39	6/10,1	6/22	-	
25 G*	- + +	Hypothetisches 17,8 kDa Protein CAC01963 <i>L. major</i>	15426124	82/80	9,4/5,2	7/61	M	
26 L [#]	- + +	Nicht identifiziert		*/10	*/5,9			
27 L [#]	- + +	Nicht identifiziert		*/45	*/5			
28 L [#]	- + +	Putat. thermostabile Carboxypeptidase CAC37108.1 <i>L. major</i>	13751094	57/55	5,55/5,6	19/60	-	
29 L [#]	- + +	Putat. D-ribulose-5-phosphat-3-epimerase L.9280.9 <i>L. major</i>	10305213	28/27	6,1/5,8	4/25	-	
30 G*	- + +	Nicht identifiziert		*/72	*/5,2			
31 G*	- + +	Nicht identifiziert		*/75	*/5,9			
32 G*	- + +	Nicht identifiziert		*/30	*/5,4			
	Gruppe B							
33 G*	- - +	ATPase β-Untereinheit <i>T. brucei</i>	11908130	55/60	5,3/5	15/43	M	
34 G*	- - +	Eukaryotischer Initiationsfaktor 5a <i>L. infantum</i>	8977987	18/26	4,8/4,3	4/30	-	
35 G*	- - +	Putatives HSP60 LmjF36.2030 <i>L. major</i>	CHR36_ tmp.582, xrn4 (GeneDB)	59/68	5,2/5	15/71	-	
36 G*	- - +	Vorläufer für mitochondr. HSP70 <i>L. major</i>	7441850	68/65	5,5/5,7	9/34	-	
37 G*	- - +	26 kDa Protein der HSP70 verwandten Familie; <i>L. major</i>	102056	26/23	8,3/5,4	4/44	M	
38 G*	- - +	HSP70 verwandtes Protein 1, mitochondr., Vorläufer; <i>L. major</i>	1170375	68/65	5,5/5,5	13/34	M	
39 G*	- - +	HSP83 <i>L. infantum</i>	6016263	80/90	5,05/5	13/54	-	
40 G*	- - +	möglicher negativer Regulator des cdc42p <i>L. major</i>	7532743	19/17	7,7/6,8	4/37	3 TMH	
41 G*	- - +	Peroxiredoxin <i>L. major</i>	6066432	25/20	6,4/5,2	6/32	M	
42 G*	- - +	Poly-Zink-finger	3661541	20/40	9/5,1	4/24	-	

		Protein; <i>T. cruzi</i>					
43 G*	- - +	regulatorische ATPase Untereinheit 6 des Proteasoms; <i>T. brucei</i>	9651743	46/45	8,8/5,6	4/48	-
44 L [#]	- - +	Triosephosphat-Isomerase; <i>L. infantum</i>	20378696	27/25	8,3/7	13/45	-
45 G*	- - +	α -Tubulin <i>L. donovani</i>	606648	49/34	4,9/5,1	10/28	-
46 G*	- - +	β -Tubulin LmjF21.1860 <i>L. major</i>	7530134	49/36	4,7/4,8	6/29	-
47 G*	- - +	Hypothetisches Protein CAB55364 <i>L. major</i>	5852119	70/68	5,1/5,3	5/47	Ca ²⁺ Bindungs-Motif
48 G*	- - +	Hypothetisches Protein CAC33984 <i>L. major</i> oder CAC67627 <i>L. major</i>	18129665 15485406	23/24 21/24	10/5,9 7/5,9	4/37 4/37	M M
49 G*	- - +	Hypothetisches Protein AAK27385 <i>L. donovani</i>	13518087	39/20	5,8/5,1	5/40	Signal-peptid secretory pathway
50 G*	- - +	nicht identifiziert		*/66	*/5,8		
51 G*	- - +	nicht identifiziert		*/28	*/5,2		
52 G*	- - +	nicht identifiziert		*/24	*/5,2		
53 G*	- - +	nicht identifiziert		*/28	*/4,2		
54 G*	- - +	nicht identifiziert		*/36	*/5,1		
55 G*	- - +	nicht identifiziert		*/26	*/6,9		
56 G*	- - +	nicht identifiziert		*/65	*/5,4		
57 G*	- - +	nicht identifiziert		*/30	*/4,8		
58 G*	- - +	nicht identifiziert		*/30	*/4,25		
	Gruppe C						
59 G*	- + -	α -Tubulin <i>L. donovani</i>	606648	49/48	4,9/5,8	11/41	-
60 G*	- + -	Proteinphosphatase 2C; <i>L. donovani</i>	2665676	45/50	4,8/4,7	7/33	-
61 G*	- + -	Enolase <i>L. major</i>	8388689	46/48	5,6/5,3	28/69	-
62 G*	- + -	nicht identifiziert		*/40	*/5,3		
63 G*	- + -	Actin a LmjF04.1230 <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB Chr.04	42/48	5,4/5,3	16/63	-
	Gruppe D						
64 G*	+ - -	Adenosylhomocysteinase; <i>L. donovani</i>	1710837	47/65	5,8/6,1	16/43	-
65 G*	+ - -	S-adenosylmethionin Synthase <i>L. infantum</i>	6016549	43/50	5,5/5,4	8/28	-
66 G*	+ - -	Mögliche Adenylatkinase <i>L. major</i>	1231122	23/28	5,9/5,7	5/29	-
67 G*	+ - -	Aldolase Epimerase verwandtes Protein 2 <i>L. major</i>	9954713	41/50	6/6,1	12/48	-
68 G*	+ - -	Put. Pyruvat-	<i>L. major</i>	37,9/39	5,6/4,9	7/45	-

		dehydrogenase, e1-Komponente β-Untereinheit, mitoch. Vorläufer <i>L. major</i>	GeneDB LmjF25.17 10 Chr.25				
69 G*	+ - -	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4a <i>L. major</i> GeneDB= Protein der DEAD-Box Familie	11466166 LmjF01.07 80 Chr.1	45/49	5,8/5,9	23/55	-
70 G*	+ - -	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4a <i>L. major</i> GeneDB= Protein der DEAD-Box Familie	11466166 LmjF01.07 80 Chr.1	45/49	5,8/5,9	8/50	-
71 G*	+ - -	Eukaryotischer Initiationsfaktor 5a <i>L. infantum</i>	8977987	18/20	4,8/4,5	7/23	-
72 G*	+ - -	Hypothetisches Protein LmjF35.4060 <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB Chr. 35	31,9/33	4,8/4,5	6/29	-
73 G*	+ - -	Hypothetisches Protein der Hit-Familie; <i>L. major</i>	8744988	15/20	6,1/6,2	6/33	-
74 G*	+ - -	Aktiviertes Proteinkinase C Rezeptor Homolog LACK; <i>L. donovani</i>	13991854	30/36	6,6/6,6	14/49	-
75 G*	+ - -	Aktiviertes Proteinkinase C Rezeptor Homolog LACK; <i>L. donovani</i>	13991854	30/37	6,6/6,4	12/39	-
76 G*	+ - -	Adenosin Transporter <i>T. equiperdium</i>	14348907	51/50	7,6/6,1	4/12	Sign.sequ. TMD
77 G*	+ - -	möglicher Vorläufer einer mitochondrialen prozessierenden Peptidase α-Untereinheit <i>L. major</i>	11065741	57/40	7,7/6	8/33	-
78 G*	+ - -	Replikationsfaktor A 51 kDa Untereinheit <i>C. fasciculata</i>	Q23696	52/50	6,3/6,3	8/23	-
79 G*	+ - -	Hypothetisches Protein <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB LmjF14.01 90	22,3/28	4,6/4,4	6/34	-
80 G*	+ - -	Hypothetisches Protein <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB LmjF14.01 90	22,3/28	4,6/4,5	6/34	-
81 G*	+ - -	Hypothetisches Protein <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB LmjF14.01 90	22,3/28	4,7/4,6	6/34	-
82 G*	+ - -	Hypothetisches Protein L7535.12 <i>L. major</i>	6759114	53/35	9,8/6,2	5/8	-
83 G*	+ - -	Hypothetisches,	<i>L. major</i>	30,3/35	5,8/5,7	5/32	-

		konserviertes Protein <i>L. major</i>	GeneDB LmjF25.20 10				
84 G*	+ - -	Hypothetisches Protein <i>L. major</i>	<i>L. major</i> GeneDB LmjF18.16 40	13,3/13	5,88/5,2	7/39	-
85 G*	+ - -	TDP-1 (Homolog der <i>high mobility</i> Proteingruppe) <i>T. brucei</i>	123380	30/33	9.6/4,5	5/29	-
	Gruppe E						
86 G*	+ + -	Hypothetisches Protein CAB89590.1 <i>L. major</i>	7677014	42/41	4,6/5,2	5/38	-

^{a)} theoretisch bzw. experimentell ermittelter Wert für molekulare Masse bzw. isoelektrischen Punkt; *G=Protein aus Gesamtextrakt; [#]L= Protein aus löslicher Fraktion; „+“ = Protein verstärkt synthetisiert; „-“ = Proteinsynthese verringert; ^{b)} M= mitochondriale Signalsequenz; ^{c)} TMD = Transmembrandomäne; ^{d)} TMH = Transmembranhelices

Die stadienspezifischen Proteine können bezüglich ihrer Expressionskinetik in fünf Gruppen (A-E) eingeteilt werden: **A)** Proteine, deren Synthese während des Hitzeschocks (HS) in den ersten 24 Stunden zunimmt (Tag 1); **B)** Proteine, deren Abundanz 24 Stunden nach dem pH-shift (Ansäuerung des Mediums) zunimmt (Tag 2-5); **C)** Proteine, deren Synthese während des Hitzeschocks ansteigt (Tag 1), aber während der weiteren Differenzierung zu Amastigoten wieder sinkt (Tag 2-5); **D)** Proteine, die hauptsächlich während des promastigoten Stadiums synthetisiert werden und **E)** Proteine, deren Abundanz erst 48 bis 96 Stunden nach dem pH-shift abnimmt (s. Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Einteilung der identifizierten stadienspezifischen Proteine in Gruppen mit unterschiedlicher Expressionskinetik

Gruppe	Promastigote (Tag 0)	24 h nach HS* (Tag 1)	Amastigote (Tag 2-5)	Anzahl regulierter Proteine	Anzahl identifizierter Proteine
A	-	+	+	32	27
B	-	-	+	26	17
C	-	+	-	5	4
D	+	-	-	22	22
E	+	+	-	1	1

*HS= Hitzeschock; (-) = verringerte Proteinsynthese; (+)= erhöhte Proteinsynthese

In einigen Fällen führte die Analyse von Protein-*spots* mit unterschiedlichem M_r und/oder pI zu dem gleichen Genprodukt. Dies war der Fall bei HSP70, HSP90, Enolase, Adenosylhomocysteinase, Eukaryotischer Initiationsfaktor 4a und 5a, LACK-Protein, α-Tubulin und die hypothetischen Proteine *LmFj14.0190* und *CAB55364*.

Für zwei verschiedene Proteine (Nr.12 und 13) mit unterschiedlicher Masse und pI ergab die Datenbanksuche HSP70, beide stammen aus Gruppe A, Tab. 3.1. Als HSP90 wurden die Protein-*spots* Nr. 14, 15 und 16 mit ähnlichem pI und abweichenden Massen identifiziert, die alle in die Gruppe A, Tab. 3.1 gehören und Protein Nr. 39 aus der Gruppe B.

Die Enolase hat ein Molekulargewicht von 46 kDa. Proteine, die der Enolase zugeordnet wurden haben ein M_r von 35, 48 und 49 kDa. Die 35 und 49 kDa Proteinspezies gehört zur Gruppe A, wohingegen das 48 kDa Protein zur Gruppe C gehört.

Zwei Promastigoten-spezifische Proteine (Nr. 74, 75) mit M_r von 36 und 37 kDa stimmten in der Datenbanksuche mit dem *L. donovani* LACK-Protein (M_r von 30 kDa) überein. Zwei unterschiedliche Proteine (Nr. 34 mit M_r von 26, Gruppe B= Amastigoten-spezifisch und Nr. 71 mit M_r von 20, Gruppe D= Promastigoten-spezifisch) wurde der Eukaryotische Initiationsfaktor 5a identifiziert. Außerdem wurde sowohl das Promastigoten-spezifische Protein Nr. 64 mit M_r von 65 kDa und auch das Amastigoten-spezifische Protein Nr. 1 mit M_r von 45 kDa als Adenosylhomocysteinase (M_r von 47 kDa) identifiziert.

Mehrheitlich stimmten die theoretisch ermittelten Werte für M_r und pI gut mit den beobachteten Positionen der Proteine aus den 2D-Gelen überein. Bei einigen Proteinen war hier jedoch eine Diskrepanz festzustellen, insbesondere bei den theoretisch und experimentell ermittelten molekularen Massen (tmm und emm): Poly-Zink-Finger Protein (tmm 20kDa/emm 40kDa); HSP70 (tmm 71kDa/emm 74 und 45kDa); HSP90 (tmm 80kDa/emm 85, 50 und 43 kDa); α -tubulin (tmm 49kDa/emm 48 und 34kDa); β -tubulin (tmm 49kDa/emm 35 und 36kDa); hypothetische Proteine CAB55364 (tmm 70kDa/emm 36kDa); CAC14613 (tmm 54kDa/emm 39kDa); AAK27385 (tmm 39kDa/emm 20kDa); L7535.12 (tmm 53kDa/emm 35kDa); Vorläufer einer mitochondrialen prozessierenden Peptidase, α -Untereinheit (tmm 57kDa/emm 40kDa).

Das Poly-Zink-Finger Protein hat eine theoretische M_r von 20 kDa. Die beobachtete M_r von 40 kDa (Spot Nr.42) könnte hier ein Hinweis auf Dimerisierung sein. In der Tat zeigten Untersuchungen des homologen Poly-Zink-Finger Proteins von *T. cruzi* (TcPZFP), dass mit einem gegen das rekombinante Protein generierten Antikörper im Western Blot eine 40 kDa-Bande erkannt wird (Espinosa, Portal et al. 2003). TcPZFP scheint also *in vivo* in einer dimerisierten Form vorzuliegen.

Alle übrigen Proteine haben kleinere Massen als vorausgesagt. Dieses Phänomen rührt eventuell von einer Degradation der Proteine während der Extrakt-Herstellung her. Da es auch während natürlicher Stoffwechselfvorgänge zum Proteinabbau kommt, könnte das Auffinden dieser kleineren Proteinfragmente auch darauf zurückzuführen sein. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass die durch MALDI erhaltenen Peptide nicht über die ganze Sequenz verteilt liegen, wie man es erwarten würde, sondern hauptsächlich den *N*-terminalen oder den *C*-terminalen Teil des Proteins abdecken. Interessanterweise wurden dieselben „Degradationsprodukte“ auch beobachtet, wenn verschiedene Extraktionsmethoden angewendet wurden. Die Abweichungen bei den hypothetischen Proteinen können auch auf eine falsche Annotation der Proteine in den Datenbanken zurückzuführen sein.

Mit den Programmen DGPI (<http://dgpil.pathbot.com>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), und MitoProtII (<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>) wurden die identifizierten Proteine nach GPI-Ankern, Transmembrandomänen, Signalsequenzen und Hinweisen zur intrazellulären Lokalisierung durchsucht. Außerdem wurden die Sequenzen der hypothetischen Proteine in einer Homologiesuche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) untersucht, um mögliche konservierte Domänen oder Homologien zu bekannten Proteinen zu finden.

Diese Analysen ergaben, dass neun der Proteine (Nr. 2, 3, 20, 25, 33, 37, 38, 41, 48) eine mitochondriale Signalsequenz aufweisen. Protein Nr. 40 (möglicher negativer Regulator des *cdc42p* Proteins) weist drei Transmembranhelices auf, die in den Bereichen 69-89, 98-120 und 141-160 der Aminosäuresequenz liegen sollen. Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Nr. 20), das auch eine mitochondriale Signalsequenz zeigt, trägt eine Transmembrandomäne an Position 137-159. Der Adenosin-Transporter (Nr. 76) enthält 11 putative Transmembranhelices. Das hypothetische Protein CAB55364 trägt ein Calcium-Bindungsmotiv und es besteht eine Homologie zu einem Protein des sogenannten *outer dynein arm docking complex* (ODA-DC) von *Chlamydomonas reinhardtii* (Harder 2005). Das hypothetische Protein AAK27385 (Nr.49) verfügt über ein Signalpeptid für den Sekretionsweg (*secretory pathway*), wie auch der bereits erwähnte Adenosin-Transporter.

3.1.4 Einteilung regulierter *L. donovani* Proteine in funktionelle Kategorien

39 der 54 verschiedenen Proteinspezies, die in den Datenbanken Proteinen mit bekannter Funktion zugeordnet wurden, konnten in eine oder mehrere von fünf funktionellen Kategorien eingeteilt werden. (siehe Tabelle 3.3)

Tab. 3.3 : Einteilung regulierter *L. donovani* Proteine in funktionelle Kategorien

	Promastigote Tag 0	24 h nach HS* Tag 1	Amastigote Tag 2-5
1 Stress-Antwort			
HSP 83	-	+	+
HSP 70	-	+	+
HSP 70 verwandtes Protein1	-	+	+
Cyclophilin D	-	+	+
Aldolase	-	+	+
Enolase	-	+	+
26kDa HSP verw. Protein	-	-	+
HSP 60	-	-	+
Peroxiredoxin	-	-	+
ATPase β -Untereinheit	-	-	+
2 Cytoskelett und Zellmembran			
Actin a	-	+	-
Arf-Gap ähnliches Zink-Finger Protein	-	+	+
Arginin Kinase	-	+	+
Aldolase	-	+	+
Enolase	-	+	+
Negativer Regulator des cdc42p-Proteins	-	-	+
α -tubulin	-	-	+
α -tubulin	-	+	-
β -tubulin	-	-	+
β -tubulin	-	+	+

Forts. Tab. 3.3

	Promastigote Tag 0	24 h nach HS* Tag 1	Amastigote Tag 2-5
3 Energiestoffwechsel und Phosphorylierung			
Aldolase	-	+	+
Enolase	-	+	+
Alkohol-Dehydrogenase	-	+	+
Triosephosphat-Isomerase	-	-	+
Rieske-Fe-S-Protein	-	+	+
F1 ATPase β -Untereinheit	-	-	+
Arginin Kinase	-	+	+
Thymidin Kinase	-	+	+
Nukleosid-diphosphat Kin.B	-	+	+
LACK Protein	+	-	-
Aldolase-Epimerase	+	-	-
verwandtes Protein			
Pyruvat-Dehydrogenase, Untereinheit, Vorläufer	+	-	-
ATPase Untereinheit 6, regul.	-	-	+
Ribulose-phosph. Epimerase	-	+	+
4 Zellzyklus und Proliferation			
Thymidin Kinase	-	+	+
Poly-Zink-Finger Protein	-	-	+
ran-Bindungs-Protein	-	+	+
Elongations-Protein 1	-	+	+
Enolase	-	+	+
Negativer Regulator des cdc42p-Proteins	-	-	+
Replikationsfaktor A,Untereinh.	+	-	-
EIF 4a	+	-	-
EIF 5a	+	-	-
EIF 5a	-	-	+
Adenosintransporter	+	-	-

Forts. Tab. 3.3

	Promastigote Tag 0	24 h nach HS* Tag 1	Amastigote Tag 2-5
5 Aminosäurestoffwechsel			
Alanintransaminase	-	+	+
Putat. thermostabile Carboxypeptidase	-	+	+
Adenosylhomocysteinase	-	+	+
Adenosylhomocysteinase	+	-	-
S-Adenosylmethioninsynthase	+	-	-
Vorläufer einer mitochondr. prozessierenden Peptidase	+	-	-

*HS=Hitzeschock

3.1.4.1 Stressantwort

Für einige der identifizierten Proteine ist eine Beteiligung an der zellulären Antwort auf Hitzestress, oxidativen und osmotischen Stress bereits bekannt oder wird zumindest angenommen. Während der Stadiendifferenzierung ist die Synthese von HSP60, HSP70, HSP90, dem HSP70 verwandten Protein 1 und dem 26 kDa Protein der HSP70-Familie erhöht. Für einige Hitzeschock-Proteine der Leishmanien ist aus der Literatur bekannt, dass sie unter Hitzestress stärker exprimiert werden (Argaman, Aly et al. 1994; Brandau, Dresel et al. 1995; Hubel, Brandau et al. 1995; Krobitsch, Brandau et al. 1998; Zilka, Garlapati et al. 2001). Für die Proteine Aldolase, Enolase, Proteinphosphatase C, Peroxiredoxin, F1/b-Untereinheit einer ATPase und Cyclophilin D wurde eine Regulation in derselben Weise beobachtet. Insbesondere für das Cyclophilin D ist eine Antwort auf verschiedene Stressoren bereits beschrieben (Shiozaki, Akhavan-Niaki et al. 1994; Andreeva, Heads et al. 1999; Michelis and Gepstein 2000; Quivey, Faustoferri et al. 2000; Chung, Yoo et al. 2001; Demasi, Pereira et al. 2001; Wilkins, Homer et al. 2002).

3.1.4.2 Zytoskelett und Zellmembran

Proteine, die in der zweiten Kategorie eingeordnet wurden, sind bekannt für ihre Assoziation mit dem Zytoskelett (α -tubulin und β -tubulin) oder für ihre Beteiligung an der Reorganisation desselben (ArfGap, neg. Regulator des cdc42p) (Murray and Johnson 2000; de Curtis 2001). Aldolase und Arginin Kinase werden assoziiert mit der Aktin- und/oder Tubulin-

Umwandlung (Wang, Morris et al. 1996; Vertessy, Orosz et al. 1997; Pereira, Alonso et al. 2000; Schindler, Weichelsdorfer et al. 2001). Die Arginin Kinase von *T. cruzi* weist eine Actin-Bindungs-Domäne auf. Dies lässt vermuten, dass dieses Proteins eine Rolle an Strukturen des Zytoskeletts spielt, z. B. bei der Flagellenbewegung oder während der Zellteilung. Für die Enolase wurde gezeigt, dass sie mit der Zellwand oder der Oberfläche assoziiert ist (Pancholi and Fischetti 1998; Fox and Smulian 2001). All diese Proteine, mit Ausnahme der Tubuline, zeigen eine Zunahme während der Differenzierung zum amastigoten Stadium. Unterschiedliche Protein-*spots* der α - und β -Tubuline waren spezifisch für bestimmte Zeitpunkte während der Stadiendifferenzierung. Wie bereits erwähnt (siehe 3.1.3), könnte es sich bei einigen dieser Protein-*spots* um Degradationsprodukte von intakten Tubulinen handeln. Auf dieses Phänomen wird in der Diskussion genauer eingegangen (s. 4.1.1).

3.1.4.3 Energiestoffwechsel und Phosphorylierung

In diese Gruppe gehören 14 Proteine mit unterschiedlichem Expressionsmuster. Fünf Proteine, die in den Kohlenhydratstoffwechsel involviert sind (Aldolase, Enolase, Triosephosphatisomerase, Alkohol-Dehydrogenase und Ribulose-Phosphat Epimerase), ein Enzym aus der Elektronentransportkette (Rieske-Eisen-Schwefel-Protein) und ein Protein (F1-ATPase b-Untereinheit) des F1F0-ATPase Komplexes, der die ATP-Synthese aus ADP und Phosphat katalysiert, sowie die Untereinheit 6 einer regulatorischen ATPase, wurden mit erhöhter Abundanz während des Zeitraums der Amastigoten-Differenzierung gefunden. Dasselbe Expressionsmuster zeigten drei Kinasen (Thymidin Kinase, Arginin Kinase und Nukleosiddiphosphat Kinase B). Die Arginin Kinase ist eine Phosphotransferase mit einer Nitro-Gruppe als Akzeptor. Bei *T. cruzi* Epimastigoten nimmt die Arginin Kinase-Aktivität während der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich zu (Alonso, Pereira et al. 2001).

Das LACK Protein, ein Protein-Kinase-Rezeptor-Homolog, und zwei weitere Proteine aus dem Kohlenhydratstoffwechsel (Aldolase-Epimerase verwandtes Protein und der Vorläufer einer Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase), die dieser funktionellen Gruppe zuzuordnen waren, wurden als Promastigoten-spezifisch identifiziert.

3.1.4.4 Zellzyklus und Proliferation

Für sechs der Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus und der Proliferation beteiligt sind, wurde eine Steigerung der Expression während der Differenzierung zum Amastigoten-Stadium beobachtet: Thymidin Kinase, Enolase, Poly-Zink-Finger-Protein, ran-Bindungs-Protein, Elongationsprotein 1 und Negativer Regulator des cdc42p. Dem entgegen wurden drei Mitglieder dieser Gruppe als Promastigoten-spezifische Proteine identifiziert: Replikationsfaktor A, Eukaryotischer Initiationsfaktor 4a und ein Adenosintransporter. Außerdem wurden zwei verschiedene Proteine, ein Promastigoten- und ein Amastigoten-spezifisches, als Eukaryotischer Initiationsfaktor 5a identifiziert.

3.1.4.5 Aminosäurestoffwechsel

Es wurden drei Proteine identifiziert, die an der Aminosäurebiosynthese beteiligt sind und deren Abundanz nach der Veränderung des pH-Wertes während der Stadiendifferenzierung im Vergleich zum promastigoten Stadium erhöht ist: Alanin-Transaminase, putative thermostabile Carboxypeptidase und Adenosylhomocysteinase. Auch ein Promastigoten-spezifisches Protein wurde als Adenosylhomocysteinase identifiziert. Außerdem wurden zwei weitere Promastigoten-spezifische Proteine identifiziert, die in diese Gruppe gehören: die S-Adenosylmethionin-Synthase und ein Vorläufer einer mitochondrialen Peptidase.

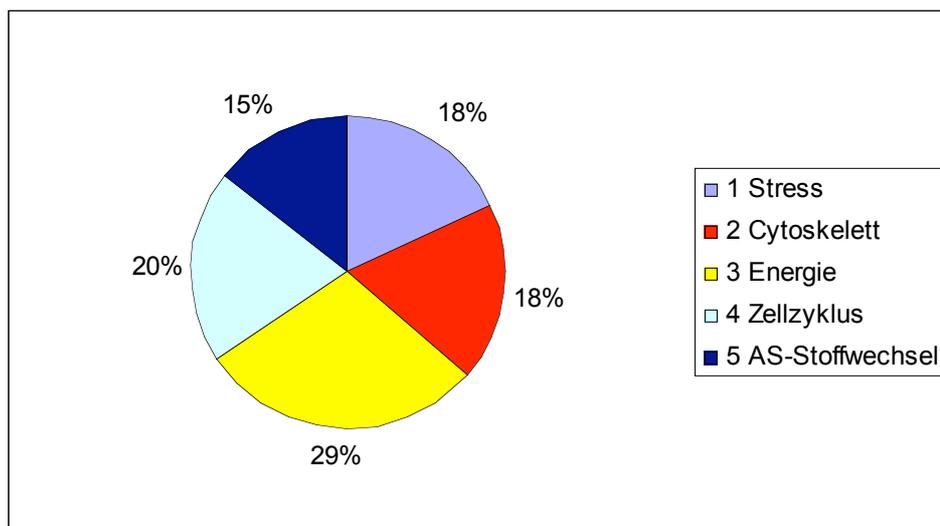


Abb.3

Verteilung stadienspezifischer Proteine in funktionellen Kategorien

Die identifizierten stadienspezifischen Proteine sind nach ihrer vermuteten oder nachgewiesenen Funktion a) zu knapp einem Drittel im Energiehaushalt involviert, b) zu 20% an Prozessen des Zellzyklus beteiligt, c) zu jeweils 18% in der zellulären Stressantwort involviert und d) mit dem Cytoskelett assoziiert und e) am Aminosäurestoffwechsel beteiligt (15%).

3.1.5 Auswahl Amastigoten-spezifischer Proteine für weitere Untersuchungen

Aus der Liste der identifizierten stadienspezifischen Proteine sollten nun einige Proteine ausgewählt werden, um durch deren nähere Charakterisierung zu neuen Erkenntnissen bezüglich der molekularen Prozesse der Stadiendifferenzierung zu gelangen und zum anderen mögliche Zielproteine als Ansatzpunkt für eine Behandlung der Leishmaniose zu finden. Da die Amastigoten das Stadium darstellen, welches die pathogenen Symptome verursacht, erschien es sinnvoll, für diese Untersuchungen nur Amastigoten-spezifische Proteine auszuwählen, bzw. die Proteine, welche während der Differenzierung zur Amastigoten (nach Tag 1) verstärkt synthetisiert werden.

Von der Wahl ausgeschlossen wurden die Proteine, die mit der Hitze-Stress-Antwort in Zusammenhang stehen und Proteine, die im Kohlenhydratstoffwechsel involviert sind, da es zu diesen bereits einige Untersuchungen bei Leishmanien gibt. Es sollten ebenfalls Proteine ausgeschlossen werden, deren Gene in mehreren Kopien im Genom vorliegen, da diese nicht oder nur eingeschränkt zur Generierung von Deletions-Mutanten (*Gen-knockout*) geeignet sind.

Zunächst wurden folgende Proteine für die weiteren Analysen ausgewählt:

1. Thymidin Kinase (=TK), *L. major*
2. Arginin Kinase (=AK), *T. cruzi*
3. ArfGap ähnliches Zink-Finger-Protein (=ArfGap), *L. major*
4. Negativer Regulator des cdc42p Proteins (=Ng. Reg. cdc42p), *L. major*
5. hypothetisches Protein CAC14613 (=CAC1), *L. major*
6. hypothetisches Protein CAC33984 (=CAC3), *L. major*

3.2 Strategie zur Charakterisierung ausgewählter Proteine respektive der kodierenden Gene

- A. Klonierung des Gens
- B. Status der genomischen Organisation: Southern Blot-Analyse
- C. Northern Blot-Analyse: Regulation auf RNA-Ebene?
- D. Rekombinante Expression des Proteins in *E. coli*
- E. Herstellung eines Antiserums
- F. Überprüfen des Expressionsmusters im Western Blot
- G. Intrazelluläre Lokalisierung durch Elektronen-Mikroskopie
- H. Generierung und Charakterisierung von Deletions-Mutanten
- I. Herstellung und Charakterisierung von Überexpressions-Mutanten

Für die sechs Proteine (s. 3.1.5) wurden als erstes die entsprechenden Gene kloniert. Anschließend wurde jeweils eine Southern Blot-Analyse durchgeführt, um den Status der genomischen Organisation (*single copy*-Gen oder *multi copy*-Gen) zu erfassen. Es wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt, um festzustellen, ob bereits auf RNA-Ebene eine Regulation der entsprechenden Transkripte vorliegt.

3.2.1 Klonierung der Gene

Die Gene der sechs unter 3.1.5 aufgeführten Proteine waren bisher für *L. donovani* nicht bekannt. Fünf der Proteine wurden nach den MALDI-Analysen aufgrund der Homologie zu den von *L. major* Gensequenzen abgeleiteten Proteinen identifiziert, eines zeigte eine große Ähnlichkeit zur *T. cruzi* Arginin Kinase. Es wurden deshalb von den *L. major* bzw. *T. cruzi* Sequenzen der entsprechenden Gene Oligonukleotide abgeleitet (s. 2.1.4) und damit die Gene mittels PCR aus genomischer DNA von *L. donovani* amplifiziert und sequenziert.

3.2.2 Überprüfen der genomischen Organisation

Es wurde festgestellt, in wie vielen Kopien das jeweilige Gen im *L. donovani* Genom vorkommt. Dazu wurde genomische *L. donovani* DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Als Sonde wurde die kodierende Region des entsprechenden Gens verwendet. Abb. 4 zeigt die Southern Blot-Analysen der sechs untersuchten Genorte. In allen Fällen wurde gezeigt, dass für jeden Verdau nur ein einzelnes DNA-Fragment mit der jeweiligen Sonde hybridisiert. Dies bedeutet, dass das jeweils untersuchte Gen nur in einer Kopie im Genom vorliegt (*single copy-Gen*). Insofern sind diese Gene grundsätzlich geeignet, um sogenannte *Gen-knockout*-Mutanten zu generieren.

3.2.3 Northern Blot-Analysen: Vergleich der Transkriptionsmuster

Es wurden Northern Blot-Analysen mit aus *L. donovani* isolierter RNA von Tag 0 bis Tag 3 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung durchgeführt, um die Expressionsmuster der unter 3.2 aufgeführten Gene zu untersuchen. Ausschnitte der Autoradiogramme sind in Abb. 5 gezeigt. Mit einer Sonde der für das ArfGap-Gen kodierenden Region wurde ein ca. 2 kB großes Transkript detektiert, dessen Intensität, im Vergleich zum Ergebnis der Tubulin-Sonde als Kontrolle, zu den untersuchten Zeitpunkten gleich bleibend ist. Für die Analyse der CAC1-Transkriptmengen wurde als Sonde die komplette kodierende Region von *ldcac1* eingesetzt. Hier ist bei dem ca. 1,7 kB großen Transkript eine Zunahme der Intensität an Tag 1 zu erkennen, was mit der Beobachtung der Proteinzunahme in den 2D-Gelen korreliert. Für die Thymidin Kinase, die Arginin Kinase, den Negativen Regulator des *cdc42p* und CAC3 konnte trotz mehrfacher Versuche mit verschiedenen Sonden und unterschiedlichen Temperaturen während der Hybridisierung kein Signal detektiert werden.

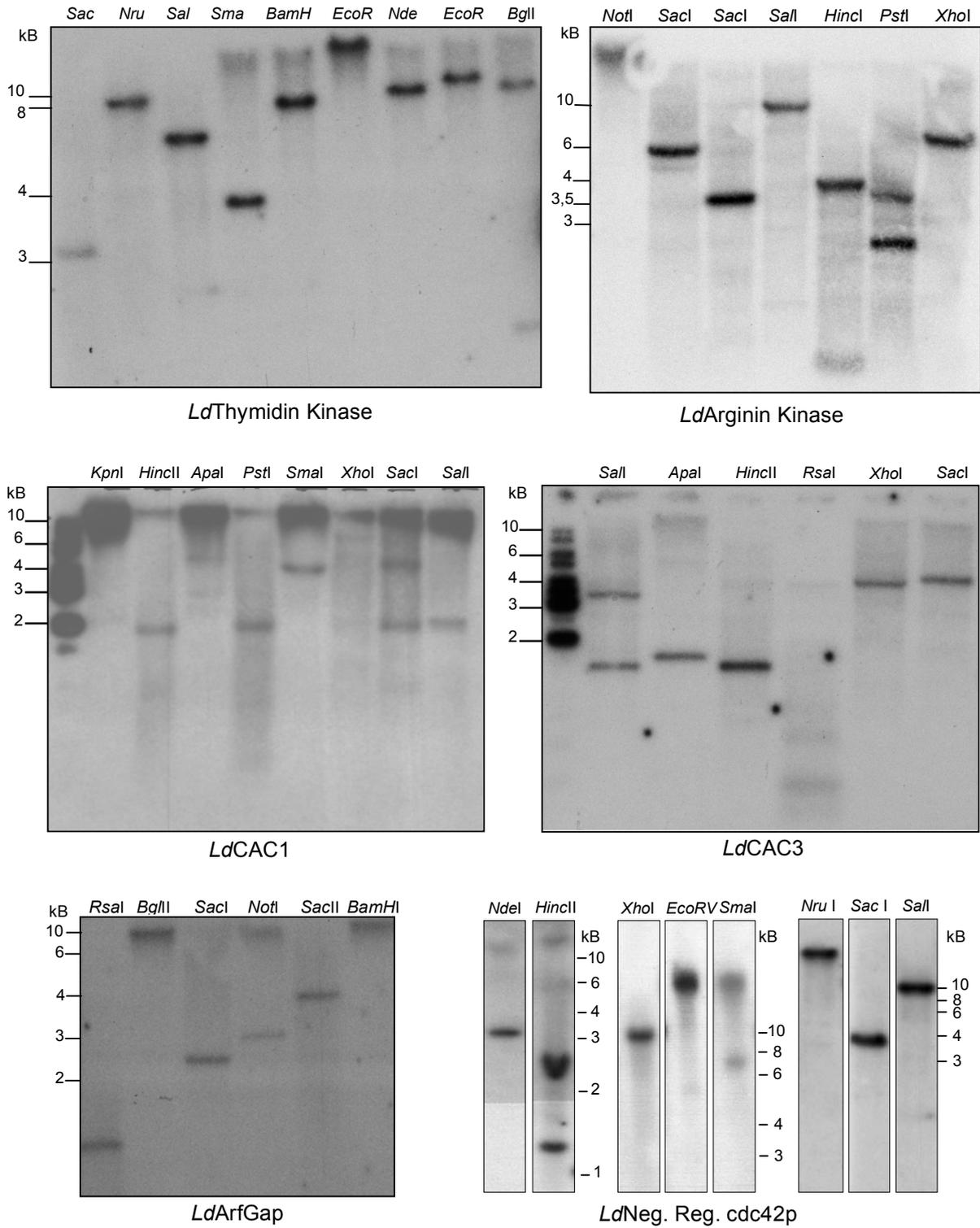


Abb. 4

Southern Blot-Analysen

Von oben nach unten: Southern Blot für *LdThymidin Kinase*, *LdArginin Kinase*, *LdArfGap*, *LdCAC1*, *LdCAC3*, *LdNeg. Reg. des cdc42p*. 20 µg genomische DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,7%-igen Agarosegel separiert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem jeweiligen Genamplifikat als Sonde hybridisiert. Seitlich ist der molekulare Standard angegeben.

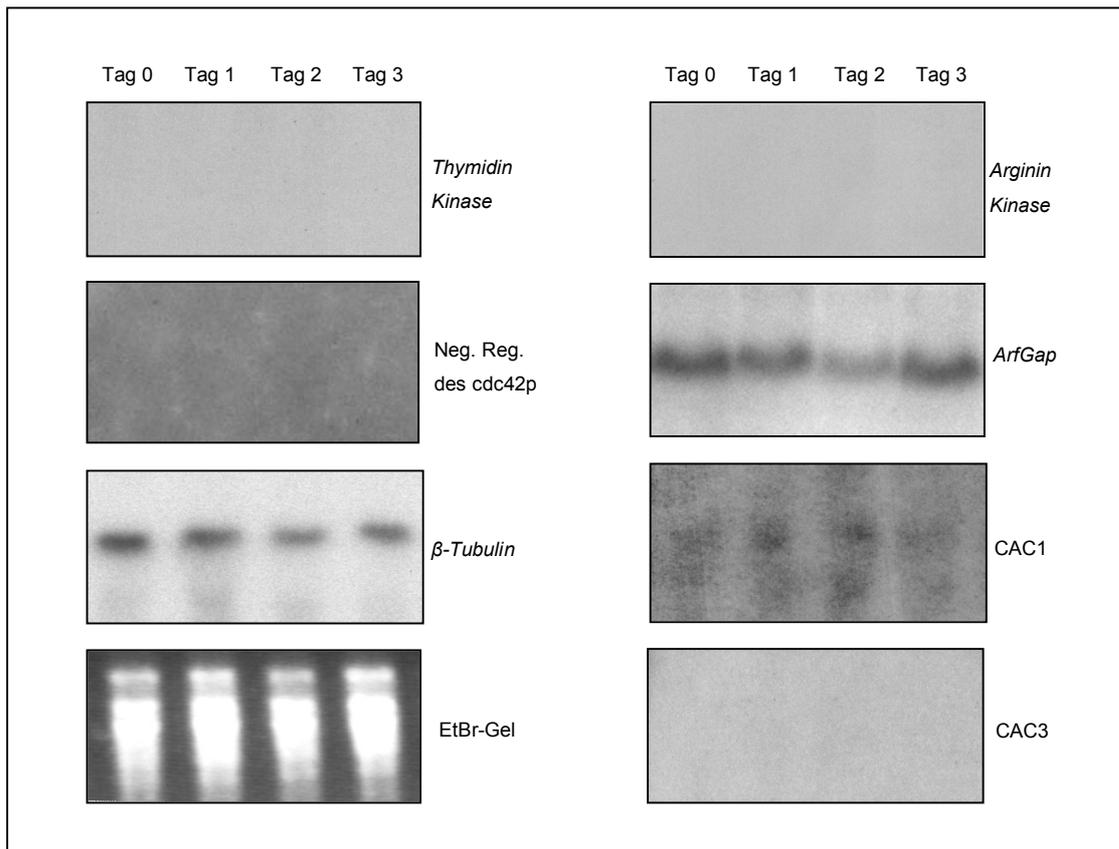


Abb. 5
Northern Blot-Analysen

Es wurden je 10 μ g isolierte RNA von T0-T3 in einem Formaldehydgel getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Blot wurde mit der entsprechenden Gen-Sonde und einer Tubulin-Sonde (als Mengenkontrolle) hybridisiert.

3.2.4 Weitere Charakterisierung Amastigoten-spezifischer Proteine

Bei fünf der sechs Amastigoten-spezifischen Proteine kam es während der zur Charakterisierung geplanten Analysen (s. 3.2) zu einem unerwarteten Verlauf. Unter 3.4 ist zusammengefasst, welche Arbeiten an diesen Proteinen durchgeführt wurden.

Für die Thymidin Kinase wurden alle unter 3.2 aufgeführten Arbeiten durchgeführt. Diese Ergebnisse werden im Abschnitt 3.3 ausführlich dargestellt.

3.3 Charakterisierung eines Amastigoten-spezifischen Proteins: Die putative Thymidin Kinase von *L. donovani*

3.3.1 Analyse der Aminosäuresequenz der *L. donovani* Thymidin Kinase

Im Verlauf der MALDI-Analyse wurde ein Amastigoten-spezifisches *L. donovani* Protein als Thymidin Kinase identifiziert. Die Gen-Sequenz liegt laut *L. major* GeneDB auf Chromosom 21. Das entsprechende Gen konnte mit von der *L. major* Sequenz abgeleiteten Oligonukleotiden, sowohl aus genomischer *L. major* DNA als auch aus *L. donovani* DNA, amplifiziert werden. Das 852 Bp große DNA-Fragment von *L. donovani* wurde sequenziert und es zeigte eine Identität von 94,9% zur *L. major* Gensequenz und eine 94,4%-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Das Gen kodiert für ein Produkt von 284 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31 kDa und einem errechneten pI von 8,2. Wie in Abb. 4 gezeigt, liegt das Gen für die Tymidin Kinase im *L. donovani* Genom nur in einer Kopie vor. Auf RNA-Ebene konnte keine Regulation nachgewiesen werden (siehe 3.2.3).

In Abb. 6 A ist der phylogenetische Vergleich der hier untersuchten *L. donovani* Thymidin Kinase mit Thymidin Kinasen anderer Organismen dargestellt (Programm: *ClustalW*). Es gibt zwei verschiedene Subfamilien von Thymidin Kinasen: einen sogenannten langen Typ I, wozu die Thymidin Kinase des *Herpes simplex* Virus und die humane mitochondriale *hTK2* gehört, sowie einen kurzen Typ II, zu dem u.a. die humane cytosolische *hTK1* und die *T. cruzi* TK gehören (Arner and Eriksson 1995; Birringer, Claus et al. 2005). Die *L. donovani* TK zeigt hierbei eine größere Ähnlichkeit zu den Typ II Thymidin Kinasen. Abb. 6 B zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der *LdTK* mit Typ II TK-Sequenzen anderer Organismen. Zur besseren Übersicht wurden dabei die Mitglieder der Typ I Subfamilie HSV-TK und die *hTK2* wegen ihrer großen Sequenzunterschiede zur Typ II Subfamilie nicht berücksichtigt.

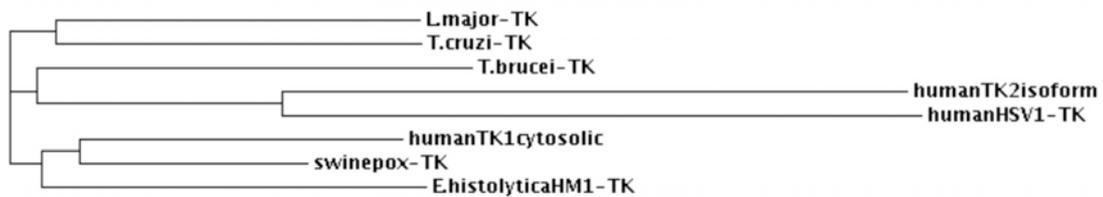


Abb. 6 A
Phylogramm von Thymidin Kinasen verschiedener Organismen

Dargestellt ist ein phylogenetischer Vergleich der klonierten *L. donovani* Thymidin Kinase (TK) mit Thymidin Kinasen verschiedener Organismen: der TK von *L. major* (Acc.Nr. AAH07872); *T. brucei* (Acc.Nr. AF395663.1); *T. cruzi* (Acc.Nr. XP 820583); *E. histolytica* (Acc.Nr. AAS47703); Pockenvirus (Schweine) (Acc.Nr. NP 570223); *H. sapiens humanTK1* (cytosolisch) (Acc.Nr. AAH07872); *H. sapiens humanTK2* (mitochondrial) (Acc.Nr. O00142); *Herpes simplex* Virus-TK (Acc.Nr. HEHSV1TK X03764).

Die *L. donovani* Thymidin Kinase ist mit 284 Aminosäuren genauso groß, wie die bereits im Genomprojekt von *L. major* identifizierte TK. Die Identität der AS-Sequenzen von *L. donovani* und *L. major* liegt bei 94%, wobei die funktionellen Motive exakt übereinstimmen. Im Vergleich zu *T. cruzi* liegt die Identität bei 68% und bei *T. brucei* und *L. donovani* ist die Sequenz zu 57% identisch. Die Identität der *LdTK* zu *hTK1*, *EhTK* und *SwpoxTK* liegt jeweils bei etwa 50%.

Die Sequenz der *LdTK* weist eine Zink-Bindungsdomäne auf, die von Aminosäure 138 bis 179 reicht. Dieses Zink-Bindungsmotiv wird durch vier Cysteine geformt, die bei *L. donovani* an Position 140, 143, 173 und 176 liegen. Das Cystein-Motiv -Cys-X-X-Cys-Z-Cys-X-X-Cys- ist für alle Enzyme der Typ II Subfamilie konserviert, wobei Z meist 28 Aminosäuren entspricht, aber bei *L. donovani* Z für 29 AS steht, wie auch bei *L. major* und *M. pneumoniae* (Birringer, Claus et al. 2005). Das Zink-Bindungsmotiv ähnelt dem der Adenylat Kinase Gram-positiver Bakterien (Gilles, Glaser et al. 1994; Birringer, Claus et al. 2005). Die Bindung des Zinks scheint für die Stabilisierung der Nukleosidbindungsstelle erforderlich zu sein (Birringer, Claus et al. 2005). Ein weiteres hoch konserviertes Sequenzmotiv -G-P-M-F-S-G-K-S- der Typ II Subfamilie liegt bei *L. donovani* an Position 11-18 der Aminosäure-Sequenz, wobei hier, wie auch bei *L. major*, *T. brucei* und *T. cruzi*, im Vergleich zur Sequenz der *hTK1* das erste Serin durch Alanin und das zweite Serin durch Threonin ersetzt wurde. An dieser in einem P-loop gelegenen Sequenz bindet die γ -phosphoryl-Gruppe des *feedback*-Inhibitors dTTP (Birringer, Claus et al. 2005). Der P-loop formt einen Raum, in dem das β -Phosphat des ATP gebunden wird, um in der katalytischen Reaktion die γ -phosphoryl-Gruppe auf dT zu transferieren (Abele and Schulz 1995). Die katalytischen Aminosäuren (K) Lysin32 (bei *hTK1*), die vermutlich für den Transfer der γ -phosphoryl-Gruppe verantwortlich ist, und (E) Glutaminsäure 98 (bei *hTK1*), die als Base das Proton der 5'OH-Gruppe des dT in der Ester bildenden Reaktion übernimmt, sind in allen Nukleosid/ Nukleotid Kinasen vorhanden (Eriksson, Munch-Petersen et al. 2002) und auch in *L. donovani* konserviert (K17 und E85). Das dritte konservierte Motiv der TK liegt in der Thymidin-bindenden Region (Wintersberger, Rotheneder et al. 1992). Bei der *hTK1* liegt das Motiv -F-Q-R-K-P-F-G-S-I- an Position 128 -136 der Aminosäuresequenz. Bei *L. donovani* und *L. major* liegt diese Region mit der Sequenz -Y-R-R-K-P-F-G-Q-I- bei AS 115-123.

Bei *Dictyostelium discoideum* wurde ein Calmodulin-bindendes (CaM) Protein als *DdTK1* identifiziert. Bei der CaM Bindungsregion handelt es sich um ein bei Säugern, Vögeln,

Evertebraten, Bakterien und Viren konserviertes 1-5-10-Motiv hydrophober Reste, welches an dem *P-loop* gelegen ist (O'Day, Chatterjee-Chakraborty et al. 2005). Ein Vergleich (Daten nicht gezeigt) mit 33 Organismen ergab, dass bei der *LdTK* Position 1, wie bei den anderen, Leucin (L) ist und Position 5, wie bei etwa 60% der Organismen auch, Valin (V) ist. An Position 10 des Motivs steht bei der *LdTK1*, abweichend von den verglichenen Organismen, Histidin (H). Allerdings ist die Varianz an dieser Position bei den verglichenen Organismen auch viel größer, als dies bei den Positionen 1 und 5 der Fall ist.

Die C-terminalen Sequenzen der Thymidin Kinasen sind nicht konserviert. Der C-Terminus der *Leishmania* TK ist länger als der der *hTK1*.

Tab. 3.4: Konservierte Motive der TK1-Familie

Organismus	Anzahl der AS	Position des Zink-Finger-Motivs	Position des Phosphatdonor-Bindungsmotivs	Position des Thymidin-Bindungsmotivs
<i>L. donovani</i>	284	138-179	11-18	115-123
<i>L. major</i>	284	138-179	11-18	115-123
<i>T. brucei</i>	455	339-380	212-219	316-324
<i>T. cruzi</i>	355	228-269	101-108	205-213
<i>E. histolytica</i>	218	158-195	31-38	135-143
Schweinepockenvirus	177	135-177	11-18	114-122
<i>humanTK1</i>	234	150-191	26-33	128-136

3.3.2 Rekombinante Expression von *Ldtk* und Generierung von Antikörpern

Durch die Synthese des rekombinanten Proteins sollte es ermöglicht werden, dieses näher zu charakterisieren.

Die Synthese erfolgte rekombinant in *E. coli* Zellen mit einem N-terminalen His-tag und die Isolierung des rekombinanten Proteins aus der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenats erfolgte über eine Nickel-Affinitätschromatographie. Abb. 7 A zeigt eine Coomassie Brilliant Blau Färbung von ca. 10 µg gereinigtem, rekombinantem *LdTK* (*rLdTK*). Für die Antikörperproduktion wurde das rekombinante Protein zur Immunisierung von Hühnern eingesetzt. Nach drei Injektionen im Abstand von je zwei Wochen konnte das spezifische Antiserum aus den Hühnereiern gewonnen werden.

3.3.3 Proteinsynthese des *LdTK* während der *in vitro* Stadiendifferenzierung

Es wurde mittels einer Western Blot Analyse, bei der das in 3.3.2 beschriebene spezifische Antiserum eingesetzt wurde, die Proteinmenge in Zellextrakten während der Transformation vom promastigoten zum amastigoten Stadium untersucht. Das Protein *LdTK* ist nur sehr schwach an T0, aber mit zunehmender Intensität an T1-T3 nachzuweisen. Es wurde so die Beobachtung der Proteomanalyse bestätigt. Der Blot ist in Abb. 7 B gezeigt.

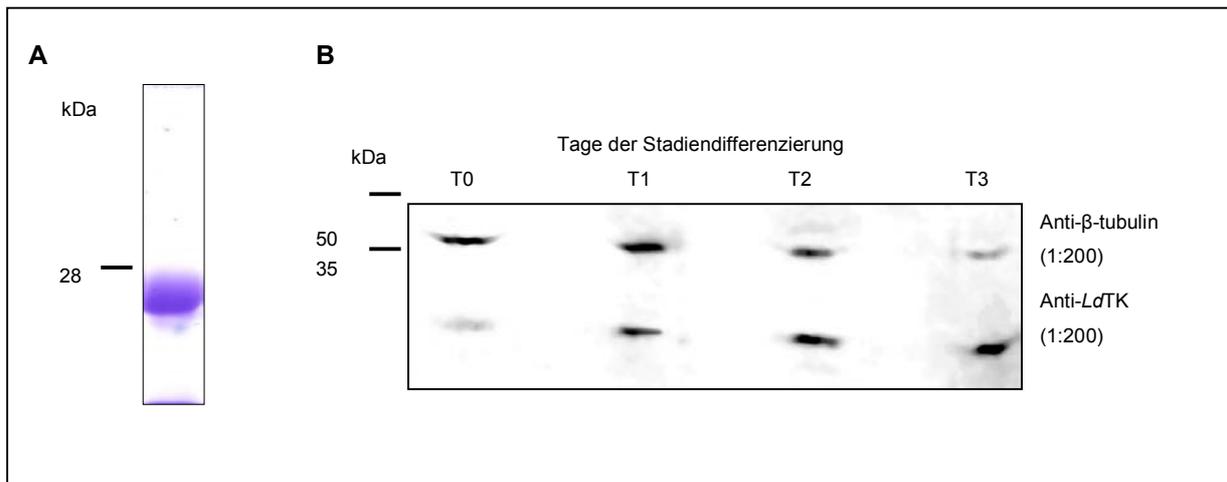


Abb. 7

Rekombinante Expression von *LdTK* und Proteinsynthesemuster des *LdTK*

A. 10 µg des rekombinanten *LdTK* wurden in einem 10%-igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen separiert und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. **B.** Western Blot-Analyse von *L. donovani* Zellextrakten von T0-T3 der *in vitro*-Stadiendifferenzierung. Es wurden 5×10^6 Zellen in heißem SDS-Probenpuffer lysiert, in einem 10%-igen SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immun-Reaktion erfolgte mit Antiseren gegen *LdTK* und β-Tubulin (als Mengenkontrolle). Es sind jeweils links die molekularen Standards angegeben.

3.3.4 Intrazelluläre Lokalisierung von *LdTK*

Die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit Hilfe der Elektronen-Mikroskopie überprüft. Es wurde eine Immunogold-Markierung mit dem spezifischen *LdTK*-Antiserum an Ultradünnschnitten von *L. donovani* Promastigoten und *in vitro* induzierten Amastigoten durchgeführt. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte eine etwa dreifach erhöhte Akkumulation des Proteins in den Amastigoten im Vergleich zu den Promastigoten. Dies bestätigt die in der Proteomanalyse und in der Western Blot-Analyse beobachtete Erhöhung der Proteinmenge. Es wurde jedoch keine Zuordnung zu einem spezifischen Zellkompartiment beobachtet, die hier identifizierte Thymidin Kinase von *L. donovani* scheint demnach im Cytosol vorzuliegen (siehe Abb. 8).

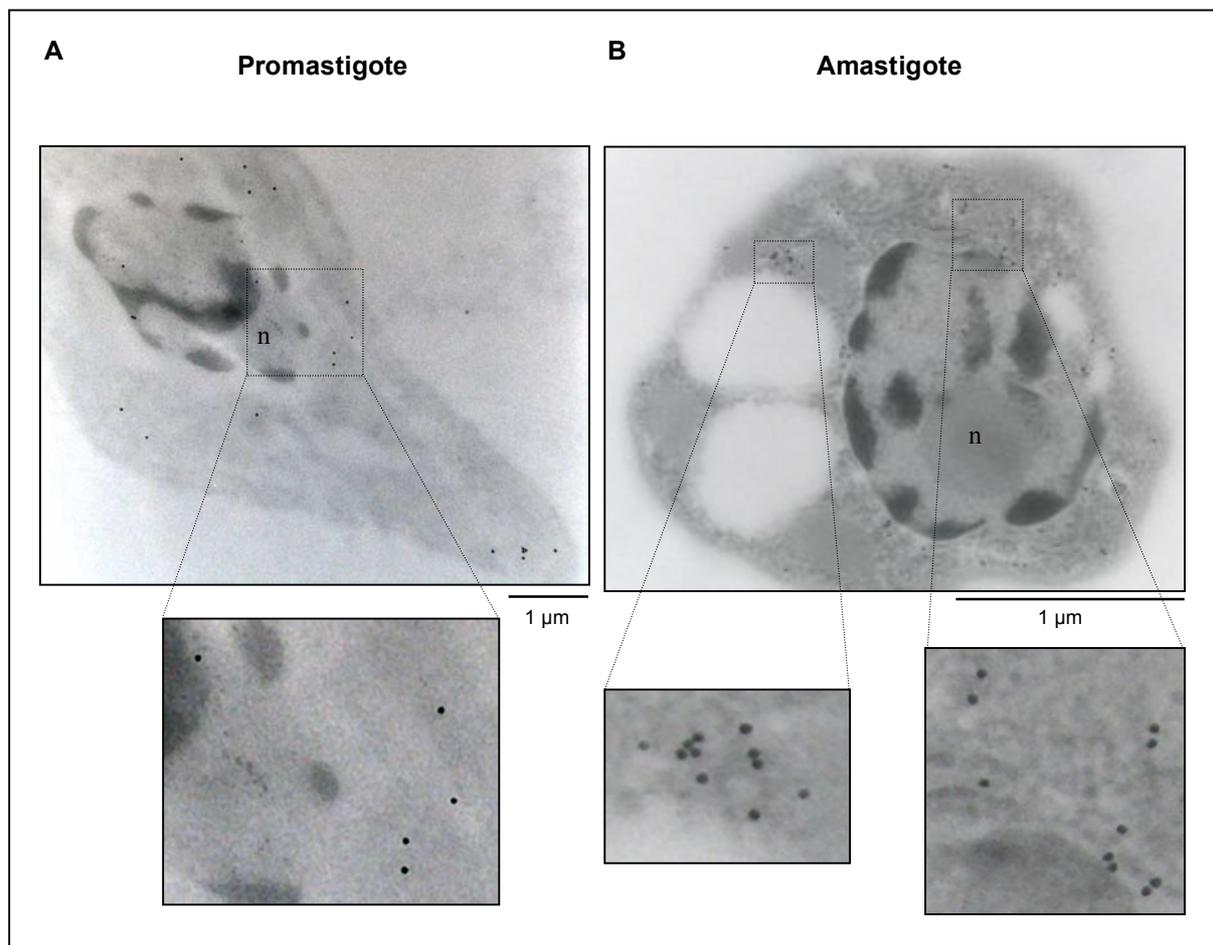


Abb. 8

Intrazelluläre Lokalisierung der *LdTK*

Die Thymidin Kinase wurde mittels Immun-Elektronenmikroskopie lokalisiert. Es wurden promastigote (A) und *in vitro* induzierte amastigote (B) *L. donovani* Zellen mit einem spezifischen *LdTK* Antiserum analysiert.

3.3.5 Generierung einer *Atk* Deletions-Mutante

3.3.5.1 DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination

Um die Funktion eines bestimmten Proteins in einem Organismus zu untersuchen, gibt es die Möglichkeit die Synthese dieses Proteins zu unterbinden, z. B. durch ein gezieltes Ausschalten des entsprechenden Gens - einen so genannten Gen *knock-out*. Dabei werden mittels homologer Rekombination beide Allele eines Gens nacheinander durch Selektionsmarker, die den transfizierten Zellen eine Antibiotika-Resistenz verleihen, ersetzt. Diese Technik wurde für Organismen der Ordnung Kinetoplastida erstmals 1990 beschrieben (Cruz and Beverley 1990). Wie bereits gezeigt (Abb. 4) liegt das Gen für die Thymidin Kinase nur in einer Kopie im *L. donovani* Genom vor und kann so theoretisch in zwei aufeinander folgenden Transfektionen durch Selektionsmarker ersetzt werden. Abb. 9 zeigt eine schematische Darstellung der DNA-Konstrukte und den Einsatz der Selektionsmarker.

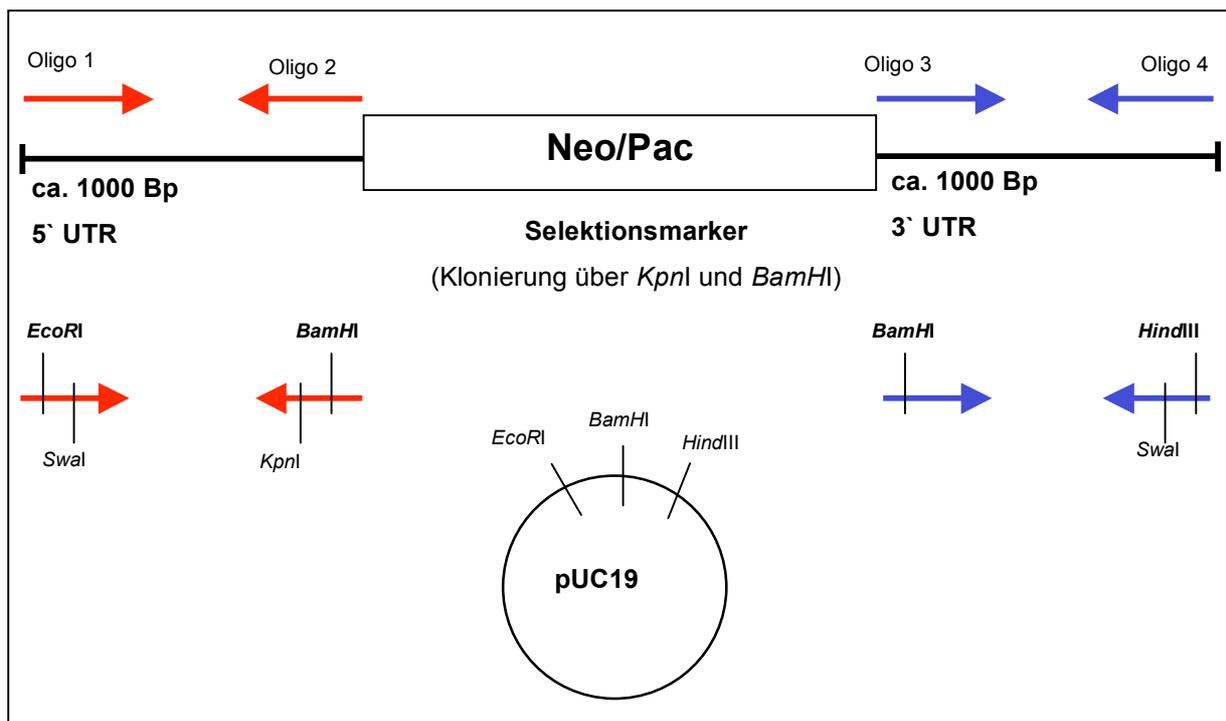


Abb. 9

Schematische Darstellung der Strategie für die homologe Rekombination

UTR - untranslatierte Region, Neo - Neomycinphosphotransferase, Pac - Puromycinacetyltransferase

Die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) des entsprechenden Gens wurden durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Die benötigten Oligonukleotide wurden mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen synthetisiert. Es wurden nacheinander die 5'-UTR über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* und die 3'-UTR über *BamHI* und

*Hind*III in den Konstruktionsvektor pUC19 ligiert. Schließlich wurde der Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase (Neo) bzw. Puromycinacetyltransferase (Pac) über die Schnittstellen *Kpn*I und *Bam*HI zwischen die UTR in das Plasmid ligiert. Nach enzymatischem Verdau mit *Swa*I entstand ein lineares DNA-Fragment, welches direkt für die Transfektion eingesetzt wurde.

3.3.5.2 Amplifikation der 5'- und 3'- UTR

Wie oben erwähnt, werden die UTR-Sequenzen der jeweiligen Gene benötigt. In den Datenbanken (NCBI und *L. major* GeneDB) sind jedoch nur die genomischen Sequenzen von *L. major* verzeichnet, weshalb versucht werden sollte, mit aus diesen Sequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden die flankierenden UTR aus *L. donovani* und aus *L. major* DNA zu amplifizieren. Krobitch und Clos (Krobitch and Clos 2000) zeigten bereits, dass es möglich ist, mit Sequenzen aus *L. major* ein Rekombinationsereignis in *L. donovani* auszulösen.

Mit den aus *L. major* abgeleiteten Oligonukleotiden konnte die 5'- und 3'-UTR aus *L. major* DNA amplifiziert werden, aus *L. donovani* DNA konnte nur der 5'-UTR, nicht aber der 3'-UTR amplifiziert werden. Es wurde ein Vektor, bestehend aus 5'- und 3'-UTR des *L. major tk*-Gens und den jeweiligen Selektionsmarkern (Neo bzw. Pac), konstruiert. Diese Vektoren werden als $\Delta lmtk$:Neo und $\Delta lmtk$:Pac bezeichnet.

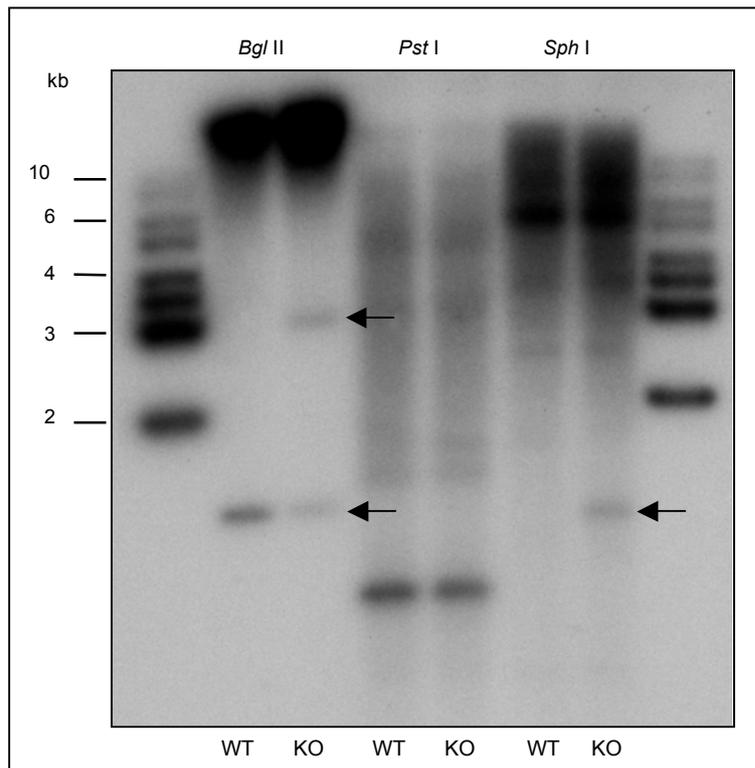
3.3.5.3 Transfektion und Selektion rekombinanter Klone

Es konnten nach Transfektion von promastigoten *L. donovani* Zellen mit den aus *L. major* amplifizierten Konstrukten trotz mehrfacher Versuche keine viablen Zellen erzeugt werden. Ob dies durch die Sequenzunterschiede der UTR zwischen *L. donovani* und *L. major* verursacht war oder ob für die *L. donovani* Zellen bereits der Austausch eines Allels des *tk*-Gens durch die Neomycinphosphotransferase zu Letalität geführt hatte, blieb ungeklärt. Es wurde deshalb versucht, einen *knock-out* des *tk*-Gens in *L. major* zu erzeugen.

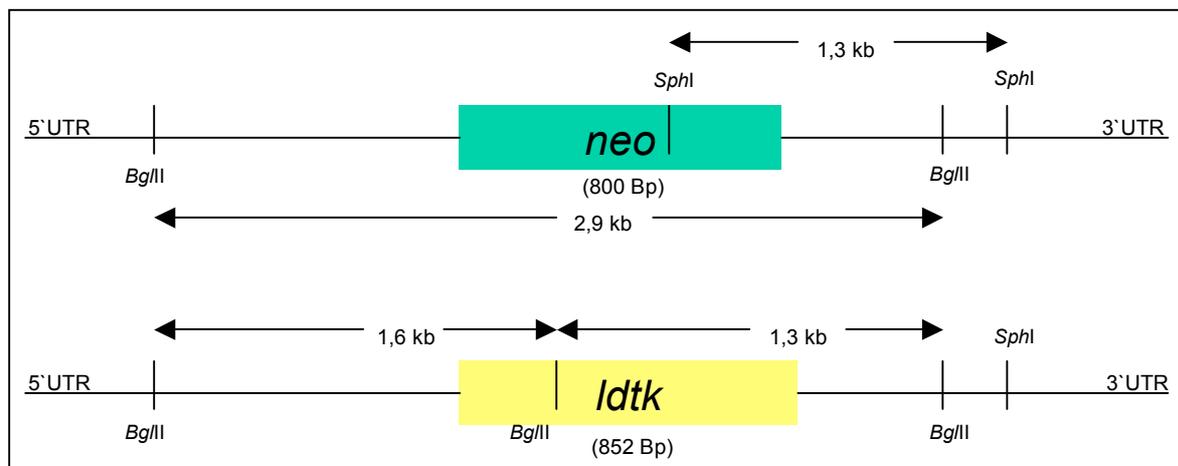
Nach der ersten Transfektionsrunde mit dem Konstrukt $\Delta lmtk$:Neo konnte nach Vereinzelung der Zellen nur ein Klon isoliert werden, der unter Antibiotika-Selektion ein konstantes Wachstum zeigte. Auch in mehreren weiteren Transfektionen unter Variation der Transfektionsbedingungen konnten keine weiteren Klone angezogen werden. In einer Southern Blot Analyse wurde der Klon *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -C8 auf eine erfolgreiche Transfektion hin

überprüft. Wie in Abb. 10 A dargestellt, bestätigte es sich, dass ein Allel der Thymidin Kinase im Genom durch die Neomycinphosphotransferase ersetzt wurde. In der Restriktionskarte sind die in diesem Locus vorkommenden Schnittstellen für *Bgl*II und *Sph*I und die Größen der aus einem Verdau mit diesen Enzymen resultierenden Fragmente dargestellt (siehe Abb. 10 B). Die Southern Blot Analyse der so verdauten DNA von *L. major* WT und *Lm* Δ *tk*^{+*n*}-Zellen zeigte nach Hybridisierung mit einer *tk*-3'-UTR-Sonde die erwarteten Signale für das WT-Allel (1,3 kB und 1,6 kB bei Verdau mit *Bgl*II, bzw. kein Fragment bei Verdau mit *Sph*I) und auch für die *Lm* Δ *tk*^{+*n*}-Mutante. Bei dieser entstand nach Verdau mit *Bgl*II ein Fragment von 1,3 kB und eines von 1,6 kB mit einem um die Hälfte verringerten Signal wie im Wildtyp, sowie ein zusätzliches Fragment von 2,9 kB, welches nur bei erfolgreicher Integration der Neo-Kassette entsteht. Beim Verdau mit *Sph*I zeigt die Mutante ein Fragment von 1,3 kB, welches ebenfalls auf die Integration der Neo-Kassette im *tk*-Gen-Lokus zurückzuführen ist (s. Abb. 10 A).

Der Klon *Lm* Δ *tk*^{+*n*}-C8 wurde für eine weitere Transfektionsrunde mit dem Konstrukt Δ *lmtk*:Pac verwendet. Nach erneuter Vereinzelung der Zellpopulationen wurden mehrere Klone isoliert, die sich unter Antibiotika-Selektion mit Neomycin und Puromycin vermehrten. Eine Southern Blot Analyse konnte für die *Lm* Δ *tk*^{*p/n*}-Mutanten nicht durchgeführt werden, da aufgrund ihrer extrem geringen Wachstumsrate nicht genügend Zellen generiert werden konnten, um die für diesen Versuch erforderliche Menge an DNA zu isolieren. Es wurden deshalb verschiedene *Lm* Δ *tk*^{*p/n*}-Klone mittels PCR auf das Vorhandensein des *lmtk*-Gens im Genom überprüft. Hierfür wurden die spezifischen Oligonukleotide TK-S27(*Nde*I) und TK-AS30(*Xho*I) (s. 2.1.4) eingesetzt. Abb. 11 zeigt das Ergebnis dieser PCR-Analyse. Außer bei der Kontrolle (*L. major* Wildtyp) konnte für keine der *Lm* Δ *tk*^{*p/n*}-Mutanten mehr ein spezifisches *lmtk*-Amplifikat (852 Bp) nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden in derselben PCR die spezifischen Oligonukleotide PRX-S26(*Nde*I) und PRX-AS27(*Xho*I) (Harder, Bente et al. 2006), abgeleitet von der Sequenz des *L. major* Peroxiredoxins, verwendet. Wie erwartet konnte das *lmp**rx*-Gen (679 Bp) amplifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die PCR einwandfrei funktionierte. Zusammenfassend ist festzustellen, dass erfolgreich eine *L. major* Δ *tk*-Deletions-Mutante generiert wurde.



10 A



10 B

Abb. 10
Southern Blot Analyse der *L. major* $Lm\Delta tk^{+/n}$ -Mutante

A. Genomische DNA von *L. major* und *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -Zellen wurde mit *Bgl*II, *Pst*I und *Sph*I verdaut, in einem 0,7%igen Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *tk*-3'-UTR-Sonde hybridisiert. Die Pfeile markieren die Banden, die nur bei Integration der Neo-Kassette entstehen. **B.** Restriktionskarte des *tk*-Genlokus: *neo* = Gen für Neomycinphosphotransferase, UTR = untranslatierte Region.

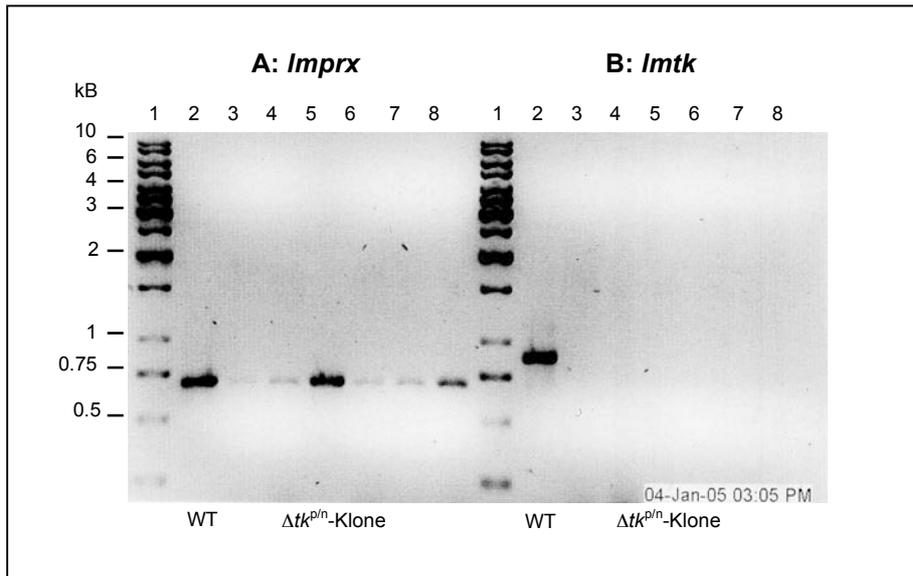


Abb. 11

PCR-Kontrolle verschiedener Klone der *Lm* $\Delta lmtk$ Deletions-Mutante

Es wurden ca. 1×10^2 Zellen der verschiedenen $\Delta lmtk^{p/n}$ -Klone in einem Volumen von 10 μ l für 3 min bei 95°C inkubiert. 1 μ l der lysierten Zellen wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden PRX-S26(*Nde*I) und PRX-AS27(*Xho*I) für **A**: *Imprx* bzw. TK-S27(*Nde*I) und TK-AS30(*Xho*I) für **B**: *lmtk* in eine PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel überprüft. In A und B wurden jeweils aufgetragen: 1. Spur: Größenstandard, 2. Spur: *Lm* Wildtyp, 3. bis 8. Spur *Lm* $\Delta lmtk^{p/n}$ Klon-G7, -G6, -H7, -F3, -G8, -G9. Es wurde die komplementäre Farbdarstellung des Fotos gewählt.

3.3.6 Überexpression von *ldtk* in *L. major* und Versuch der Rekonstitution der *LmΔtk* – Mutanten

Neben dem gezielten Gen-*knockout* stellt das Überexprimieren eine weitere Möglichkeit dar, die Funktion eines Proteins zu untersuchen. Hierfür wurde der Leishmanien-spezifische Expressionsvektor pX63polPHLEO eingesetzt. Wird der Vektor episomal in den Leishmanien etabliert, verleiht er den Zellen Resistenz gegen das Antibiotikum Bleocin und es wird so die konstitutive Synthese des klonierten Proteins ermöglicht. Es wurde das amplifizierte Gen *ldtk*, wie unter 3.2.1 beschrieben, zur Klonierung in diesen Vektor verwendet. Die in einem Verdau des Amplifikats mit *NdeI* und *XhoI* entstehenden 5'-Überhänge wurden in einer *fill-in*-Reaktion aufgefüllt und in einer *blunt-end*-Ligation in die *EcoRV* Schnittstelle der *multiple cloning site* des pX63polPHLEO Vektors ligiert. Durch eine DNA-Sequenzanalyse wurde die Orientierung des Gens im Vektor überprüft. Nach Transfektion promastigoter *L. major* und *L. donovani* Zellen mit dem Vektor pX63polPHLEO:*ldtk* wurden die Zellen vereinzelt und die Synthese des Proteins im Western Blot überprüft (s. Abb. 13). Zur Kontrolle wurden auch *Leishmania*-Zellen mit dem leeren Expressionsvektor pX63polPHLEO:solo transfiziert. Abb. 12 zeigt die Wachstumsraten der transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

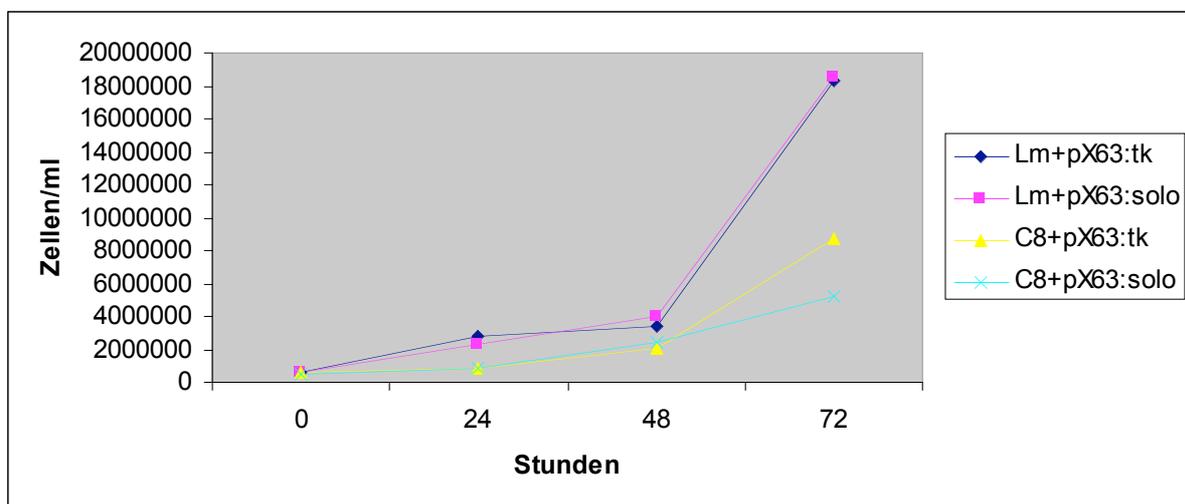
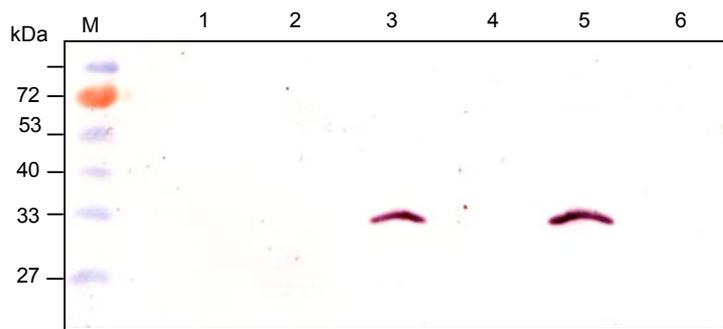


Abb. 12
Überexpression von *ldtk* in *L. major* WT und *LmΔtk*^{+/-}-C8

L. major WT mit pX63pol:*tk* (Raute), *L. major* WT mit pX63pol:solo (Viereck), *LmΔtk*^{+/-}-C8 mit pX63pol:*tk* (Dreieck) und *LmΔtk*^{+/-}-C8 mit pX63pol:solo (Kreuz) transfizierte promastigote Zellen wurden für 4 Tage kultiviert und die Zelldichte alle 24 h mittels des *Casy Cell Counters* bestimmt

13 A



13 B

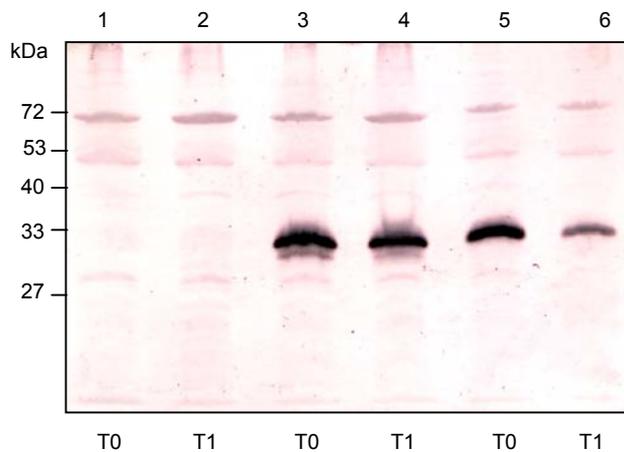


Abb. 13

Western Blot-Analyse der Überexpression von *ldtk* in *L. major*

Jeweils 5×10^6 Zellen wurden der Zellkultur entnommen, direkt in heißem SDS-Probenpuffer lysiert, in einem 12%-igen SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit einem spezifischen *LdTK* Antiserum entwickelt. Der molekulare Größenstandard ist jeweils an der linken Seite angegeben.

A. Spur 1: *L. major* WT, **Spur 2:** *LmΔtk⁺ⁿ* -Mutante (C8); **Spur 3:** pX63pol:*tk* transfizierte *L. major*; **Spur 4:** pX63pol:solo transfizierte *L. major*; **Spur 5:** pX63pol:*tk* transfizierte *LmΔtk⁺ⁿ* -C8; **Spur 6:** pX63pol:solo transfizierte *Δlmtk⁺ⁿ* -C8.

B. Spur 1: promastigote *LmΔtk⁺ⁿ* -C8; **Spur 2:** *LmΔtk⁺ⁿ* -C8 nach HS; **Spur 3:** promastigote pX63pol:*tk* transfizierte *LmΔtk⁺ⁿ* -C8; **Spur 4:** pX63pol:TK transfizierte *LmΔtk⁺ⁿ* -Mutante (C8) nach HS; **Spur 5:** promastigote pX63pol:TK transfizierte *L. major*; **Spur 6:** pX63pol:*tk* transfizierte *L. major* nach HS. (HS=nach 24 Std. Hitzeschock).

Die mit pX63polPHLEO:*ldtk* transfizierte *LmΔtk⁺ⁿ*-Mutante (Klon C8) zeigte in der spät-logarithmischen Wachstumsphase eine Steigerung im Vergleich zu der mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten *LmΔtk⁺ⁿ*-Mutante. Die Teilungsrate war aber nicht so hoch, wie bei der zur Kontrolle mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten WT-Zelllinie. Auf die Wachstumsrate des Wildtyps hatte die Transfektion mit dem Vektor pX63polPHLEO:*ldtk* keinen Einfluss.

Die Transfektion mit pX63polPHLEO:*ldtk* führte bei den WT-Zellen (Spur 3) und auch bei der transfizierten *LmΔtk⁺ⁿ*-Mutante (Klon C8) (Spur 5) zu einer gesteigerten Menge des Proteins (s. Abb. 13 A). In den promastigoten Zellen der nicht transfizierten Ein-Allel-Deletions-Mutante *LmΔtk⁺ⁿ* war gar kein Protein nachzuweisen. Da, wie unter 3.3.3 bereits gezeigt, eine Erhöhung des Thymidin Kinase-Vorkommens erst nach dem Hitzeschock (Tag 1 der Stadiendifferenzierung bei *L. donovani*) eintritt, wurde die *LmΔtk⁺ⁿ*-Mutante auch für 24 h einem Hitzeschock bei 34°C ausgesetzt (s. Abb. 13B). Das Ausschalten eines Allels reicht aber offenbar schon dazu aus, dass das TK-Protein kaum noch zu detektieren ist (Spur 2).

Die *LmΔtk^{p/n}*-Mutante wurde ebenfalls mit dem Vektor pX63polPHLEO:*ldtk* bzw. mit dem leeren Expressionsvektor pX63polPHLEO transfiziert. Auch nach mehreren unabhängigen Transfektionen wurden keine vitalen Zellen selektioniert.

Die Überexpression der *ldtk* in *L. donovani* hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der mit pX63polPHLEO:*ldtk* transfizierten Zellen. Diese konnten *in vitro* zu Amastigoten differenziert werden. Die Überexpression der *ldtk* hatte auch keinen Einfluss auf die Synthese der Amastigoten-spezifischen A2-Proteine und auch nicht auf die Synthese der Hitzeschockproteine HSP100, HSP90 und HSP70 in den *in vitro* differenzierten *L. donovani* Zellen.

3.3.7 Phänotypische Charakterisierung der *L. major* $\Delta tk^{+/n}$ - und *L. major* $\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten

3.3.7.1 Überprüfung der Thymidin Kinase-Aktivität durch Einbau von Bromid-Uridin in *Lm* Δtk -Mutanten

Die Aufnahme von Thymidin Kinase-Substraten in die Zelle ist sehr Substrat-spezifisch. Bromid-Uridin (BrdUrd) ist ein Substrat, welches von der Thymidin Kinase (TK) phosphoryliert wird. BrdUrd wird in einer TK-abhängigen Reaktion zu dTMP umgewandelt. Das dTMP wird zu dTDP und schließlich dTTP phosphoryliert und dieses während der S-Phase in die DNA eingebaut. Diese Art des Nachweises wurde bereits in verschiedenen Studien eingesetzt (Boccardo, Redoglio et al. 1986; Striepen, Pruijssers et al. 2004). Mittels eines spezifischen BrdUrd-Antikörpers kann die Aktivität der Thymidin Kinase in den Zellen nachgewiesen und auch lokalisiert werden. Dies sollte hier für verschiedene Zelllinien gezeigt werden. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 14 dargestellt.

Bei den Promastigoten des Wildtyps ist eine sehr starke Grünfärbung im Cytoplasma zu beobachten. Das Signal ist auch in Kern und Kinetoplast zu detektieren, allerdings ist dies nicht so gut zu erkennen, da das Signal in der gesamten Zelle sehr stark ist. Es scheint, dass der Kinetoplast weniger Signal anzeigt als der Kern. In der Ein-Allel-Deletions-Mutante *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ ist das Signal des BrdUrd-Antikörpers im Cytosol nur noch etwa halb so stark und bei der Doppel-Allel-Deletions-Mutante *Lm* $\Delta tk^{p/n}$ konnte keine spezifische Färbung mehr detektiert werden. Die sehr schwache Färbung des Cytoplasmas ist hier vermutlich auf eine unspezifische Reaktion zurückzuführen.

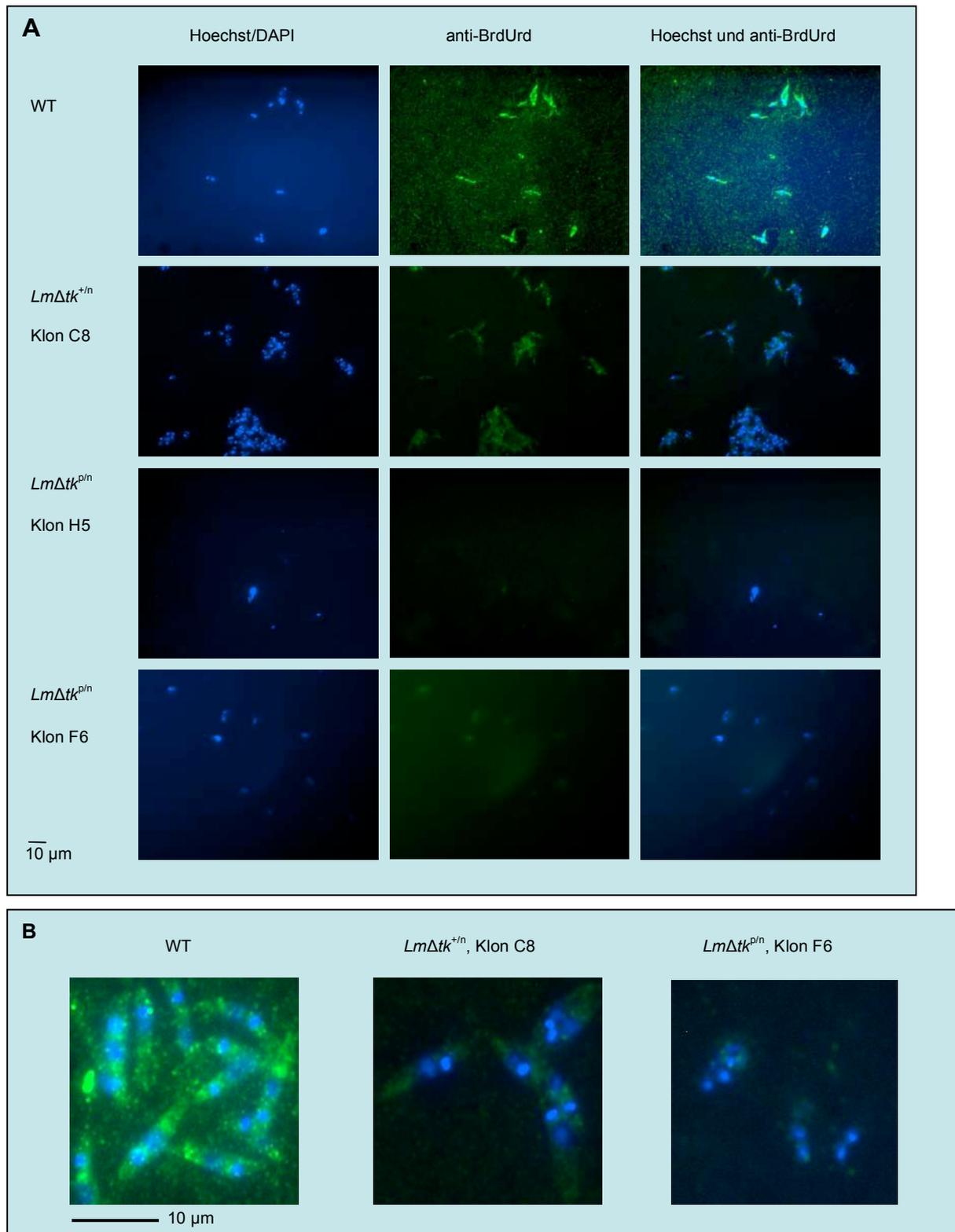


Abb. 14

Immunfluoreszenz-Analyse der *LmΔtk*-Deletions-Mutanten nach Inkubation mit Bromid-Uridin

A. Unterschiedliche *L. major* Zelllinien wurden zunächst für 4 h mit 10 μM Bromid-Uridin inkubiert, dann auf Objektträgern fixiert und mit dem spezifischen anti-BrdUrd Antiserum (Sigma) behandelt. Zusätzlich wurden die DNA enthaltenden Organellen mit Hoechst gefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung fotografiert. B. Gezeigt ist ein stark vergrößerter Ausschnitt von übereinandergelegten Fotos nach Färbung des spezifischen BrdUrd-Antiserums und Hoechst-Färbung für *Lm*WT, *LmΔtk*^{+/n}-Mutanten (Klon C8) und *LmΔtk*^{p/n}-Mutanten (Klon F6).

3.3.7.2 Immunfluoreszenz-Analyse und Vergleich der Flagellenlängen bei *LmΔtk^{+/n}*- und *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten

Bereits während der routinemäßigen Kontrolle der Zellkulturen mit einer relativ schwachen Vergrößerung am Durchlichtmikroskop, schienen die *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten insgesamt kleiner zu sein und kürzere Flagellen zu besitzen, als der WT und die *LmΔtk^{+/n}*-Mutante. Eine Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Tubulin-Antikörper (Abb. 15) und dem spezifischen *LdDC2*-Antiserum (Harder 2005) (Abb. 16 A-D) sollte morphologische Veränderungen verdeutlichen. Beim *LdDC2* handelt es sich um ein in den Flagellen lokalisiertes Protein, das eine Sequenzidentität von 96% zum *L. major* Homolog CAB55364 zeigt (vergl. Tab. 3.1, Protein Nr. 23). Durch die flagellare Lokalisation des *LdDC2*-Proteins schien das spezifische Antiserum geeignet, die Flagellen der *LmΔtk*-Deletions-Mutanten zu untersuchen. Eine zusätzliche unspezifische Reaktion mit anderen *Leishmania*-Proteinen, die auch zu Signalen im Cytoplasma führen, sind dabei bekannt (Harder 2005).

An den Fotos der Immunfluoreszenz-Analyse mit dem monoklonalen Tubulin-Antikörper und dem spezifischen *LdDC2*-Antiserum waren die morphologischen Unterschiede zwischen *LmΔtk*-Mutanten und WT deutlich zu erkennen. In der Tat waren die Zellen der *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten etwas kleiner als beim WT und die Flagellen auffallend kürzer (s. Abb. 15). Außerdem wurde beobachtet, dass die *LmΔtk^{p/n}*-Zellen teilweise in kleinen Gruppen aneinander gelagert waren (s. Abb. 15 D(a)), ähnlich wie es bei axenischen *L. donovani* Amastigoten in Kultur der Fall ist. Abb. 16 D zeigt zwei sich in Teilung befindende Zellen der *LmΔtk^{p/n}*-Mutante mit bereits je einem Kern und einem Kinetoplasten.

Erstaunlicherweise zeigte die *LmΔtk^{+/n}*-Mutante (Klon C8) dagegen längere Flagellen als der WT (s. Abb. 15 und 16). Einige Zellen der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante hatten Flagellen, die mehr als fünfmal so lang wie die Zelle selbst war (s. Abb. 15 B). Beim WT ist das Flagellum etwa 1-1,5 mal so lang wie der Zellkörper (Abb. 15 A). Um auszuschließen, dass es sich bei dem C8-Klon nicht um eine Mischpopulation von Mutanten mit unterschiedlichen Längen der Flagellen handelt, wurde der C8-Klon vereinzelt und die entstehenden Klone bezüglich dieses Merkmals mikroskopisch kontrolliert. In allen Klonen fanden sich wieder Zellen mit unterschiedlichen und, im Verhältnis zum WT, extremen Längen des Flagellums. Dieses Phänomen scheint demnach auf die Deletion des ersten *tk*-Allels zurückzuführen sein.

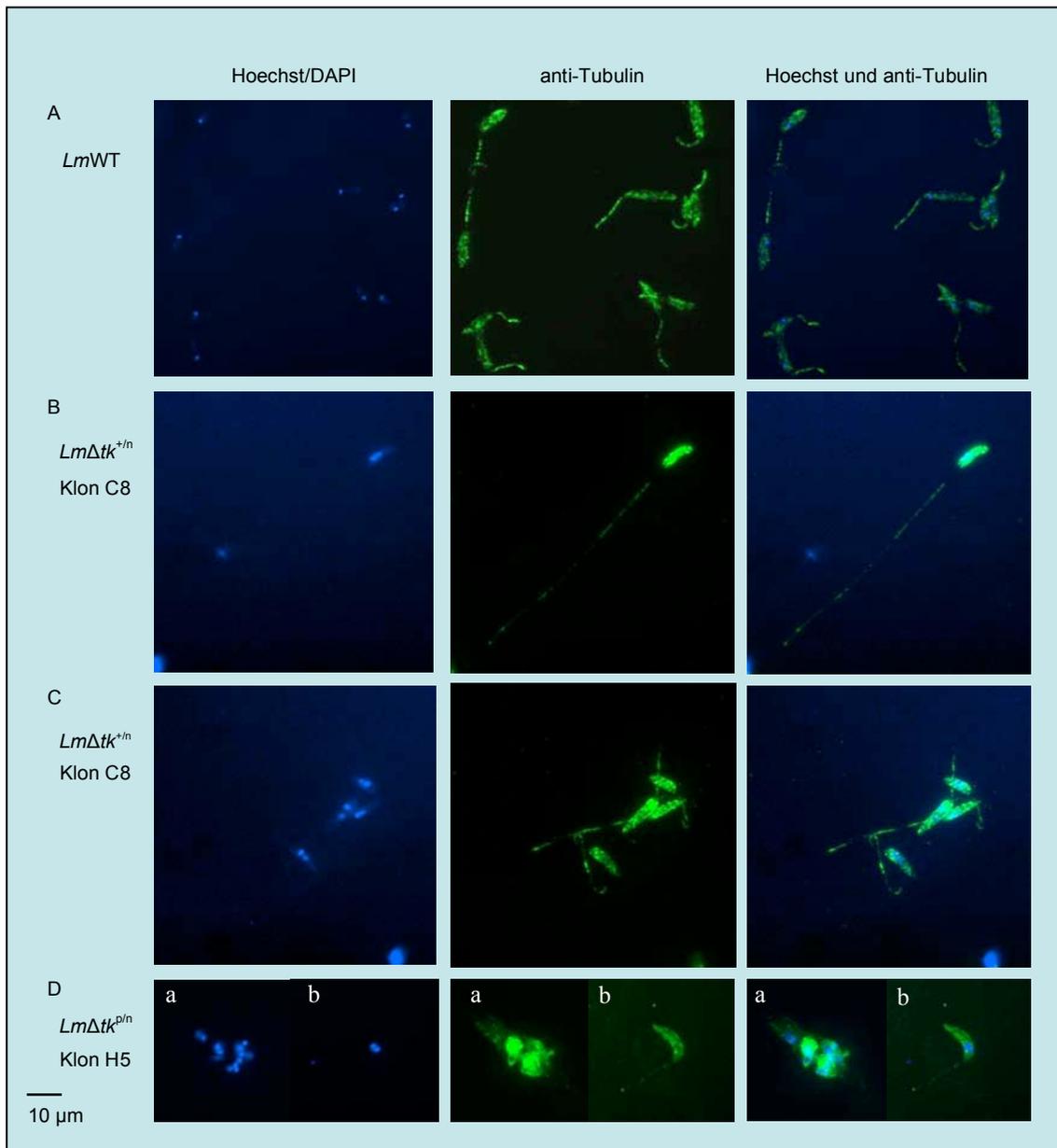


Abb. 15
Immunfluoreszenz-Analyse der *LmΔtk* Deletions -Mutanten I

Unterschiedliche *L. major* Zelllinien wurden auf Objektträgern fixiert und mit einem monoklonalen *Tubulin*-Antikörper behandelt. Zusätzlich wurden die DNA enthaltenden Organellen mit Hoechst gefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung fotografiert. Für die Mutante *LmΔtk^{p/n}* -Klon H5 sind nebeneinander zwei Ausschnitte (a) und (b) gezeigt.

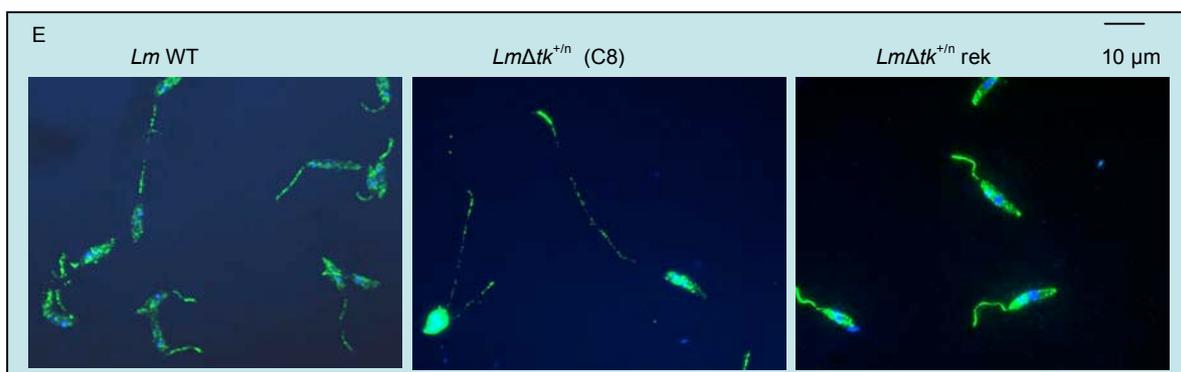
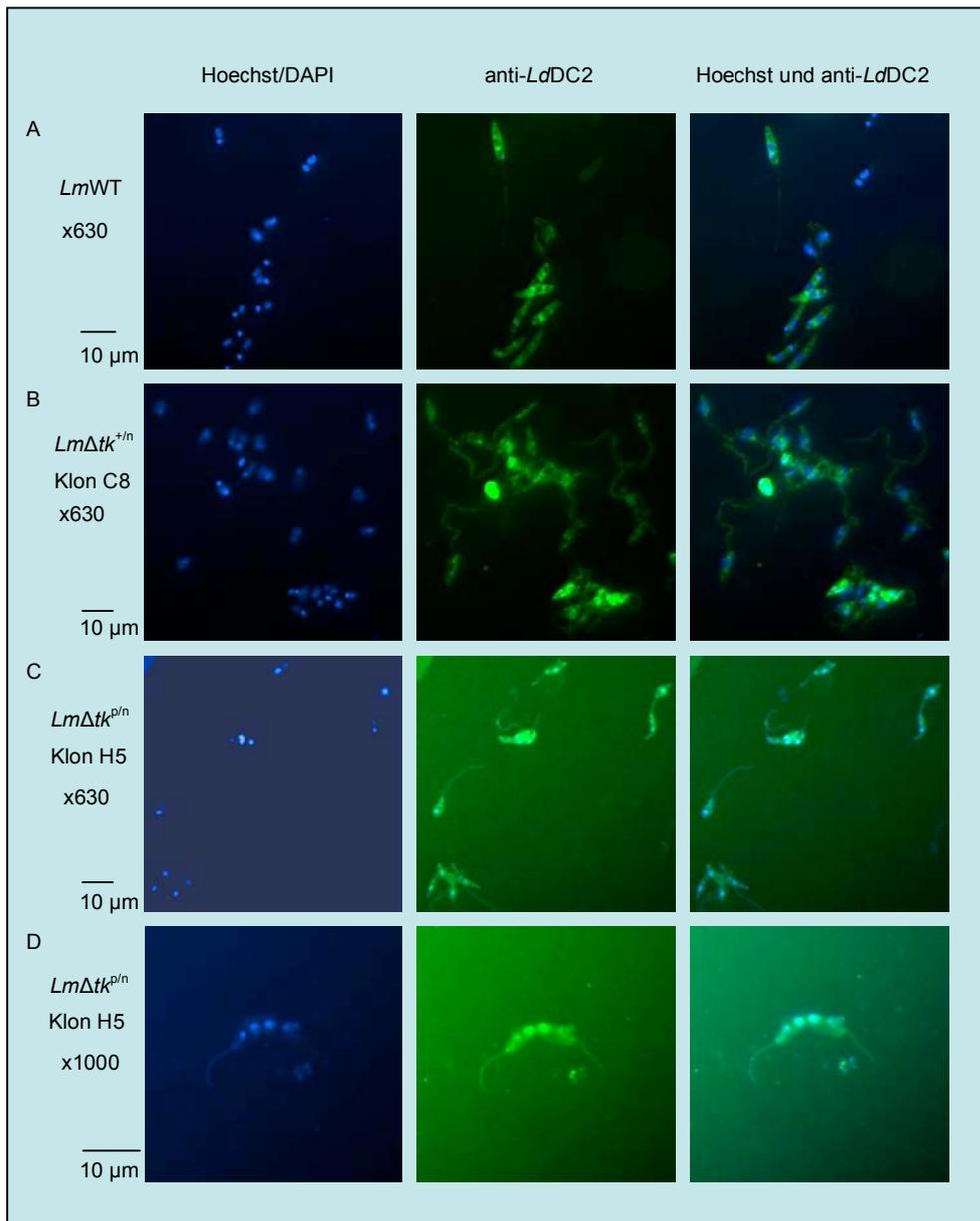


Abb. 16

Immunfluoreszenz-Analyse der *LmΔtk* Deletions -Mutanten II

A-D. Unterschiedliche *L. major* Zelllinien wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem spezifischen *LdDC2*-Antiserum behandelt. Zusätzlich wurden die DNA enthaltenden Organellen mit Hoechst gefärbt. Die Zellen wurden mit einer 630-fachen, bzw. 1000-fachen Vergrößerung fotografiert. E. Wie A-D, jedoch mit monoklonalem *Tubulin*-Antikörper behandelt. Gezeigt ist eine Darstellung zum Vergleich der Flagellenlängen von *LmWT*, *LmΔtk^{+/n}*-Mutante und rekonstituierter Mutante *LmΔtk^{+/n}* rek.

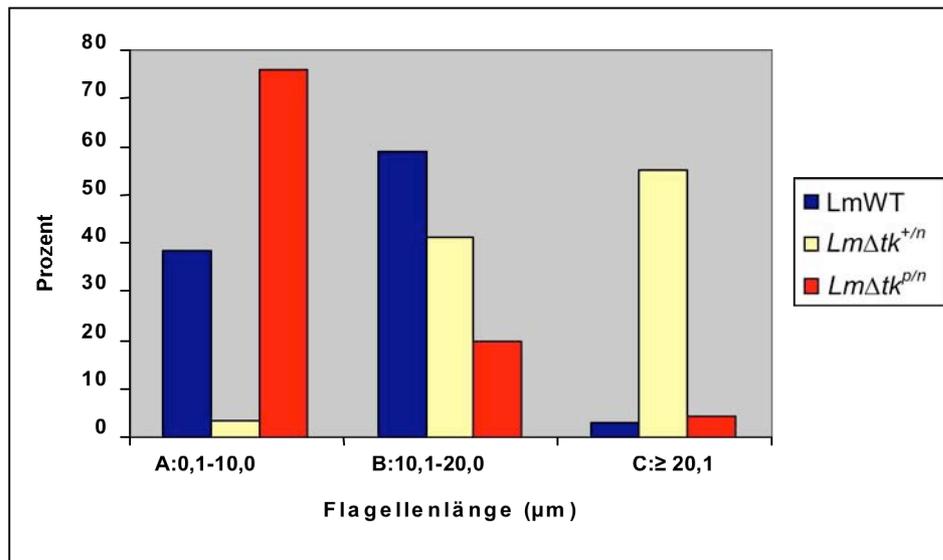


Abb. 17
Flagellenlängen der *LmΔtk*-Mutanten

Bei jeweils 50 Zellen der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante, der *LmΔtk^{p/n}*-Mutante und dem WT wurde die Länge der Flagellen bestimmt. Es wurden drei Kategorien von Flagellenlängen gebildet: A (0,1-10,0 µm), B (10,1-20,0 µm) und C (≥ 10,1 µm). Auf der X-Achse ist die Flagellenlänge in µm aufgetragen, auf der Y-Achse die prozentuale Verteilung der Flagellenlängen innerhalb der drei Zelllinien bezogen auf die drei genannten Kategorien.

Um die Flagellenlänge und deren Varianz innerhalb einer Population genau zu bestimmen, wurden deshalb die Flagellen von 50 Leishmanien der drei Zelllinien *LmWT*, *LmΔtk^{+/n}* und *LmΔtk^{p/n}* anhand der Fotos vermessen. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

Die durchschnittliche Flagellenlänge lag beim WT bei 12,36 µm, bei der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante bei 22,64 µm und bei der *LmΔtk^{p/n}*-Mutante bei 8,6 µm. In der Population der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante existierten nicht nur einige Zellen mit extrem langen Flagellen: 55% der Zellen hatten Flagellen, die deutlich länger als 20 µm waren (s.Abb. 17). Der Anteil von Zellen einer Flagellenlänge von mehr als 20 µm war im WT und bei der *LmΔtk^{p/n}*-Mutante dagegen sehr gering mit 3% bzw. 4%. Bei der *LmΔtk^{p/n}*-Mutante zeigten 76% der Zellen ein Flagellum, das kürzer als 10,1 µm war.

Die mit dem Vektor pX63polPHLEO:*ldtk* transfizierte *LmΔtk^{+/n}* Mutante zeigte nicht mehr die auffällig langen Flagellen der Ein-Allel-Deletions-Mutante (s. Abb. 16 E). Bei mikroskopischer Betrachtung entsprach die Flagellenlänge der rekonstituierten Mutante der des Wildtyps, weshalb die Flagellen dieser Zelllinie nicht extra vermessen wurden.

3.3.7.3 Elektronenmikroskopische Analyse

Mittels einer elektronenmikroskopischen Analyse konnte die TK sowohl in promastigoten, als auch in amastigoten *Ld*WT Zellen im Zytoplasma lokalisiert werden (s. Abb. 8). An Promastigoten der Ein-Allel-Deletions-Mutante *LmΔtk^{+/n}* sollte untersucht werden, ob das Fehlen eines Allels und damit die Herabsetzung der in der Zelle produzierten Menge der Thymidin Kinase möglicherweise zu einer veränderten Lokalisierung derselben führt. Ein Bild dieser elektronenmikroskopischen-Analyse ist in Abb. 18 gezeigt. Es zeigte sich, dass die Proteine in der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante sich in *clustern* zusammenlagern. Drei der Enzym-*cluster* sind nahe dem Kern gelegen. In promastigoten *Ld*WT- Zellen jedoch liegen die Proteine weit über die Zelle verteilt vor und nicht auffallend nahe am Nukleus (s. Abb. 8).

Eine elektronenmikroskopische-Analyse konnte für die Deletions-Mutante *LmΔtk^{p/n}* nicht gemacht werden, da aufgrund der sehr geringen Wachstumsrate nicht soviel Zellen kultiviert werden konnten, wie für die Herstellung der Ultradünnschnitte erforderlich gewesen wäre.

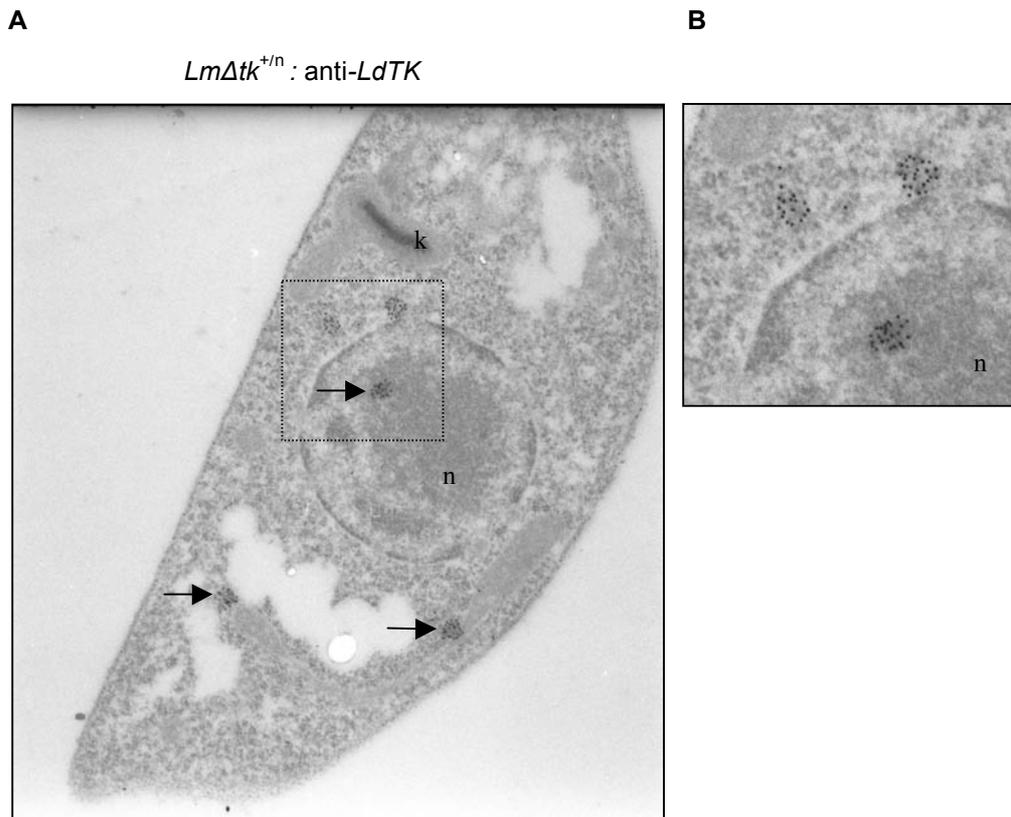


Abb. 18

Intrazelluläre Lokalisierung der TK in der Ein-Allel-Deletions-Mutante *LmΔtk^{+/n}*

Die Thymidin Kinase wurde mittels Immun-Elektronenmikroskopie lokalisiert. Promastigote *L. major Δtk^{+/n}* - Zellen wurden mit einem spezifischen *LdTK* Antiserum analysiert. Abb. 18 B stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus 18 A dar. k = Kinetoplast; n = Nukleus

3.3.7.4 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Es wurde eine rasterelektronenmikroskopische Analyse durchgeführt, um die Morphologie der *LmΔtk*-Mutanten zu verdeutlichen. Abb. 19 zeigt die daraus entstandenen Bilder. Die Ein-Allel-Deletions-Mutante *LmΔtk^{+/n}* hat die typische längliche, spindelförmige Zellform wie der WT und zeigt teilweise sehr lange Flagellen. In Abb. 19 BI ist noch einmal deutlich das im Vergleich zum WT längere Flagellum der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante zu erkennen. Bei Abb. 19 BII ist nicht eindeutig zu erkennen, ob es sich um zwei sich in Teilung befindende Zellen oder möglicherweise um eine Zelle mit zwei Flagellen handelt. Bei den *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten dagegen ist eine eher gedrungene, abgerundete Zellform zuerkennen (19 D), wodurch sie etwas kürzer erscheinen als Wildtyp und *LmΔtk^{+/n}*-Zellen, und es ist kein oder nur ein verkürztes Flagellum zu erkennen.

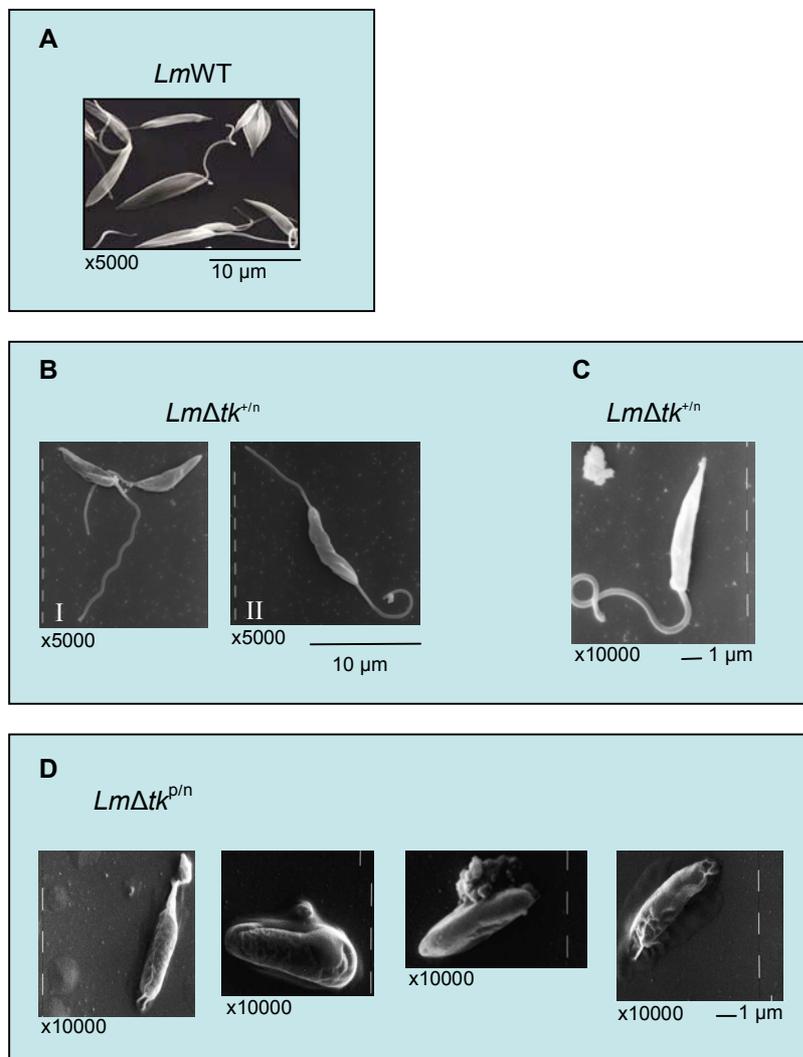


Abb. 19

REM-Analyse der *LmΔtk*-Deletions -Mutanten

Von verschiedenen Zelllinien wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mit 5000-facher bzw. 10000-facher Vergrößerung gemacht. **A:** *Lm* WT, **B** und **C:** *LmΔtk^{+/n}*, **D:** *LmΔtk^{p/n}*.

3.3.7.5 Bestimmung der Wachstumsraten

Neben den morphologischen Veränderungen war auch das Wachstumsverhalten der $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten auffällig. Die Doppel-Allel-Deletions-Mutanten $Lm\Delta tk^{p/n}$ wuchsen deutlich langsamer als die WT-Zellen und die Ein-Allel-Deletions-Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$, welche im Vergleich zum WT hierbei keine Auffälligkeit zeigte. Dies ist in Abb. 20 dargestellt. Die verschiedenen Zelllinien wurden für 5 Tage kultiviert und die Zelldichte alle 24 h bestimmt. Die Teilungsrate der $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten war so gering, dass diese Zellen nicht, wie alle anderen in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien, in Zellkulturflaschen kultiviert werden konnten. Der hohe Verdünnungsfaktor durch ein Volumen von über 2 Milliliter Kultur führte regelmäßig zum Absterben der Zellen. Sie wurden daher in 1-2 ml in 24 *well plates* kultiviert. War nach ca. 2 Wochen ein *Monolayer* im *well* erreicht, wurde der Klon um die Hälfte verdünnt. Auf diese Weise wurden die verschiedenen $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Klone über 6 Monate kultiviert. Bei einigen $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Klonen, die über mehrere Wochen ein für diese Zelllinie typisches Wachstumsverhalten gezeigt hatten, kam es zum plötzlichen Absterben der Zellpopulation. Es wurden in diesen Fällen keine anderen Anzeichen, wie z.B. Kontaminierung durch Bakterien oder Pilze, für das Absterben der Klone gefunden. Das Auftreten dieses Phänomens konnte nicht geklärt werden.

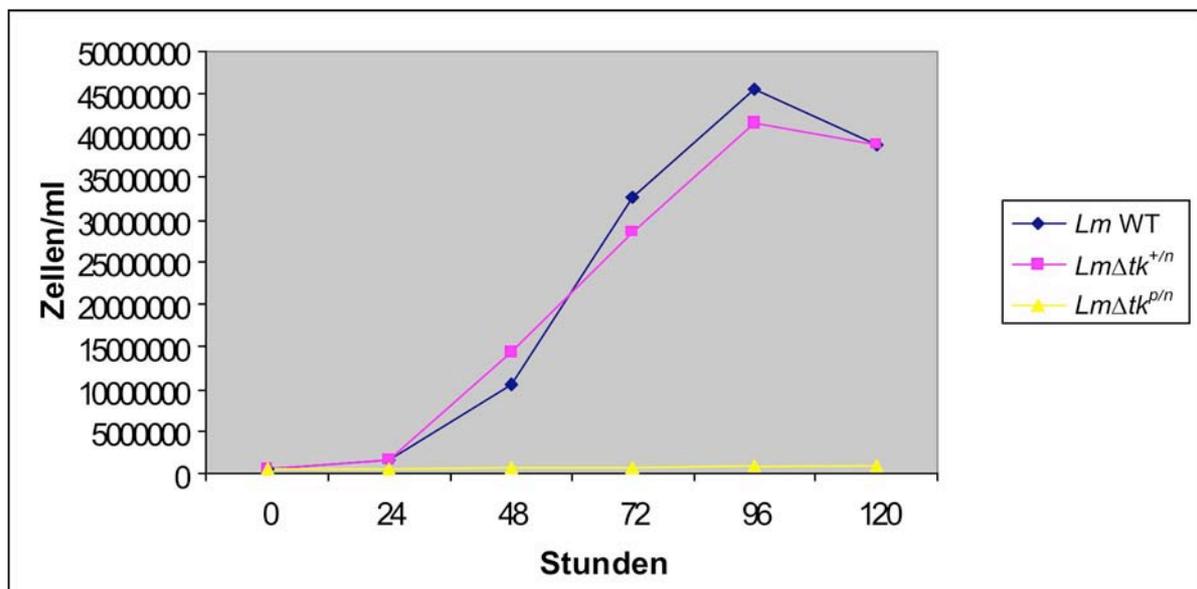


Abb. 20

Wachstumsraten der *L. major* Δtk -Mutanten im Vergleich mit *L. major* Wildtyp Zellen

L. major WT Zellen (Raute) und $Lm\Delta tk^{+/n}$ -Mutanten (Klon C8) (Viereck) wurden für 5 Tage kultiviert und die Zelldichte alle 24 h mittels des *Casy Cell Counters* bestimmt. Die $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten (Dreieck) wurden für 5 Tage in 1 ml Volumen in 24 *well plates* kultiviert und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

3.3.7.6 *In vitro*-Infektion peritonealer Exsudat Zellen

Um die *LmΔtk*-Mutanten auf eine veränderte Infektiosität im Vergleich zum Wildtyp zu überprüfen, wurde eine *in vitro*-Infektion an peritonealen Exsudat Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zelllinien *L. major* WT, *L. major LmΔtk^{+/n}*, *L. major LmΔtk^{p/n}* und die rekonstituierte Mutante *L. major LmΔtk^{+/n} rek.*, für 24, 48 und 72 Stunden mit peritonealen Exsudat Zellen inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt und mikroskopisch untersucht (s. Abb. 22 D). Es wurde die Anzahl der infizierten Makrophagen ermittelt, indem je Ansatz 250 Makrophagen gezählt wurden (siehe Abb. 21). Außerdem wurde die Anzahl der invadierten Leishmanien pro Makrophage festgestellt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 22 A-C graphisch dargestellt. Für *L. major LmΔtk^{p/n}* konnten diese Werte nicht bestimmt werden, da aufgrund der geringen Teilungsrate dieser Mutante nicht genug *Leishmania*-Zellen kultiviert und in den Versuch eingesetzt werden konnten, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen.

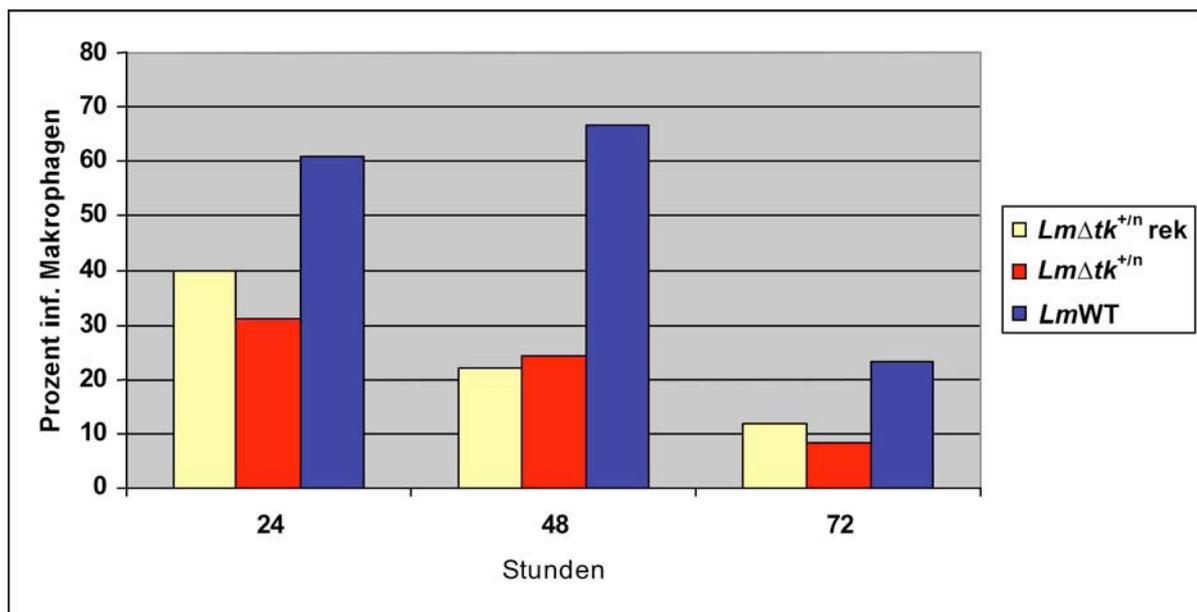


Abb. 21

Prozentualer Anteil infizierter Makrophagen

Adhärenente peritoneale Exsudat Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit *LmWT*, *LmΔtk^{+/n}* (Klon C8) und der rekonstituierten Mutante *LmΔtk^{+/n} rek.* inkubiert. Es wurde die Anzahl der infizierten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bestimmt. Dazu wurden jeweils 250 Makrophagen ausgezählt.

Bezogen auf die Anzahl infizierter Makrophagen (s. Abb. 21) zeigte die Ein-Allel-Deletions-Mutante *LmΔtk^{+/n}* im Vergleich zum *L. major* Wildtyp nach 24 Stunden Inkubationszeit eine um 30% verringerte Infektiösität, nach 48 Stunden ist sie um 45% geringer. Die rekonstituierte Mutante *LmΔtk^{+/n} rek.* zeigte gegenüber der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante eine um ca. 10% gesteigerte Infektiösität, nach 48 und 72 Stunden sind die Unterschiede hier jedoch zu vernachlässigen.

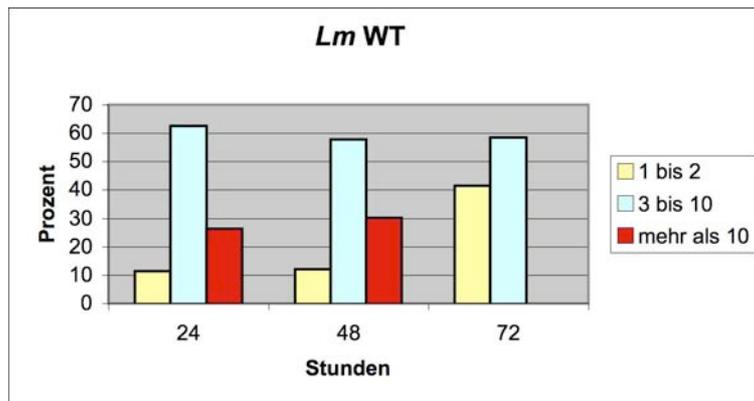


Abb. 22 A

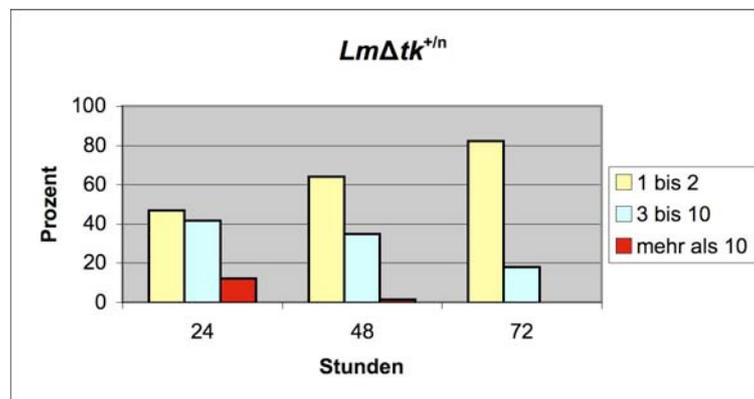


Abb. 22 B

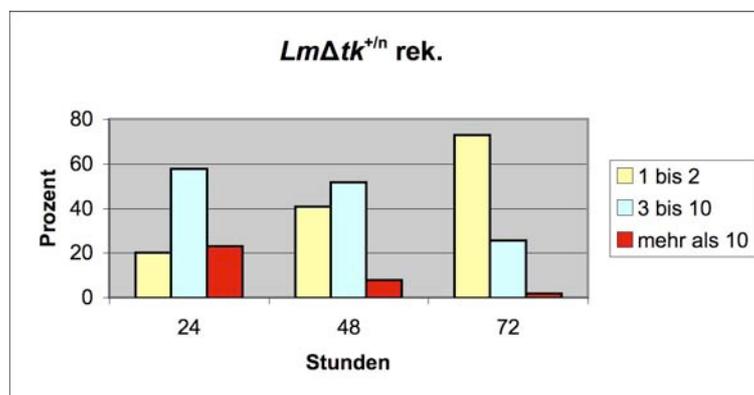


Abb. 22 C

D

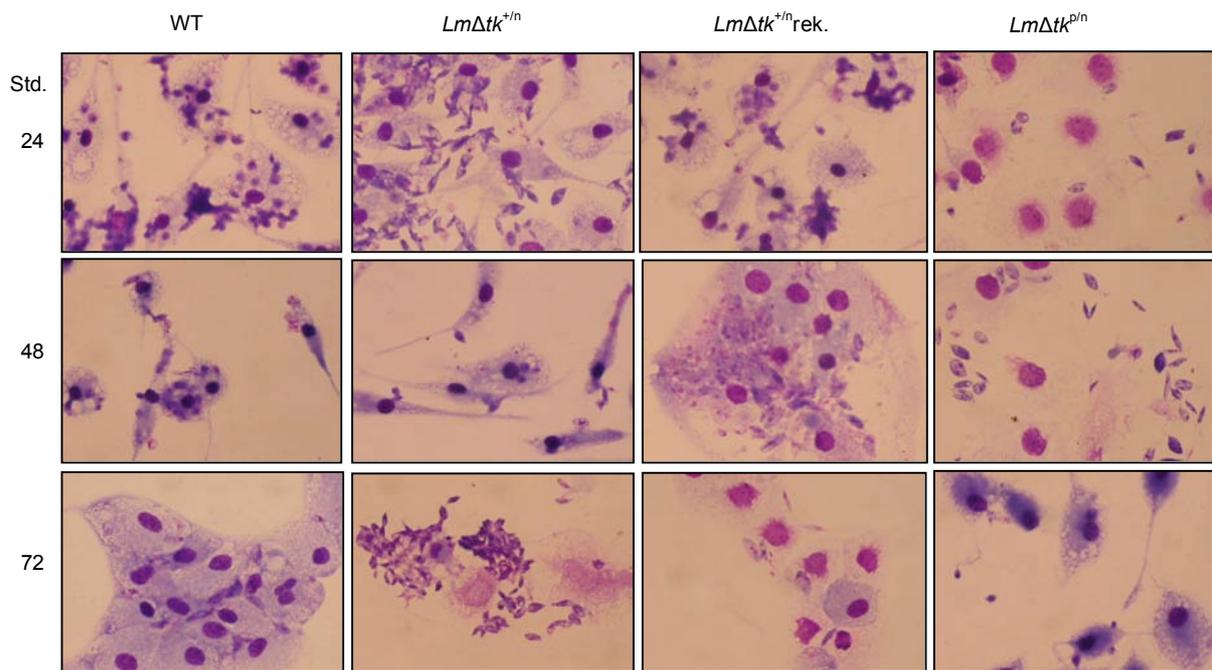


Abb. 22 In vitro Infektion peritonealer Exsudat Zellen mit *LmΔtk*-Mutanten

A,B,C. Anzahl invadierter Leishmanien pro Makrophage. Es wurde bei 100 Makrophagen die Anzahl invadierter Leishmanien (1-2; 3-10; >10) pro Makrophage bestimmt. **A:** *L. major* Wild Typ; **B:** *LmΔtk^{+/n}* = *L. major* Mutante mit *knock-out* eines *tk*-Allels; **C:** *LmΔtk^{+/n} rek.* = rekonstituierte Ein-Allel-Deletions-Mutante

D. Giemsa Färbung nach *in vitro* Inkubation. Nach 24 h, 48 h bzw. 72 h wurden die Zellen fixiert, mit Giemsa gefärbt und mikroskopisch kontrolliert. Es sind repräsentative Ausschnitte der mikroskopierten Proben gezeigt.

WT = *L. major* Wild Typ; *LmΔtk^{+/n}* = *L. major* Mutante mit *knock-out* eines *tk*-Allels; *LmΔtk^{+/n} rek.* = rekonstituierte Ein-Allel-Deletions-Mutante; *LmΔtk^{0/n}* = *L. major* Mutante mit *knock-out* beider *tk*-Allele

In der Anzahl der insgesamt infizierten Makrophagen unterschieden sich Ein-Allel-Deletions-Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$ und rekonstituierte Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$ rek. also nicht wesentlich. Doch in der mikroskopischen Analyse (s. Abb. 22 D) war sofort auffallend, dass bei der $Lm\Delta tk^{+/n}$ -Mutante nur wenige Leishmanien pro Makrophagen nachgewiesen werden konnte, im Gegensatz zur rekonstituierten Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$ rek. und dem *L. major* Wildtyp, bei denen weitaus mehr Makrophagen vollkommen mit Leishmanien ausgefüllt waren. Bei der $Lm\Delta tk^{+/n}$ -Mutante hafteten viele Zellen außen an den Makrophagen, ohne einzudringen. Dasselbe Bild zeigte sich auch bei der Deletions-Mutante $Lm\Delta tk^{p/n}$. Hier konnten nicht genug Leishmanien eingesetzt werden, um eine Auszählung vorzunehmen. Jedoch wurden in den Bereichen der Objektträger, die Anhäufungen von $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Leishmanien enthielten, kaum oder nur spärlich befallene Makrophagen gesehen (siehe Abb. 22 D). Deshalb wurde jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden bei 100 Makrophagen die Anzahl der invadierten Leishmanien pro Makrophage bestimmt. Zur Vereinfachung wurde dies in Kategorien eingeteilt mit 1-2 und 3-10 bzw. mehr als 10 *Leishmania*-Zellen je Makrophage. Nach dieser Auszählung war deutlich zu erkennen, dass das Ausschalten eines Allels im Vergleich zum Wildtyp zu einer geringeren Anzahl invadierter Leishmanien pro Makrophage führt (vergl. Abb. 22 A und B). Dagegen verhält sich die rekonstituierte Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$ rek. ähnlich dem Wildtyp (vergl. Abb. 22 A und C). Bei der $Lm\Delta tk^{+/n}$ -Mutante sind nach 24 Stunden Inkubationszeit 41% der Makrophagen mit 3-10 Leishmanien befallen und nur 11% der Makrophagen enthalten mehr als 10 Leishmanien. Beim Wildtyp sind nach 24 Stunden aber 62,5% der Makrophagen mit 3-10 Leishmanien infiziert und noch 26% der Makrophagen enthalten jeweils mehr als 10 Leishmanien. Die rekonstituierte Mutante $Lm\Delta tk^{n/+}$ rek. ist in der Lage, in derselben Zeit 57,7% der Makrophagen mit 3-10 Zellen und 22,9% der Makrophagen mit mehr als 10 Leishmanien zu befallen. Sie erreicht also knapp dasselbe Niveau wie der Wildtyp.

3.4 Zusammenfassung der durchgeführten Arbeiten an den Amastigoten-spezifischen Proteinen *LdArfGap*-ähnliches Zink-Finger Protein, *LdArginin Kinase*, *LdNeg. Regulator des cdc42p*, *LdCAC14613* und *LdCAC33984*

Zur Klonierung der Gene siehe 3.2.1.

Analyse der genomischen Organisation (Southern Blot) siehe 3.2.2.

Vergleich der Transkriptionsmuster (Northern Blot) siehe 3.2.3.

Mit Ausnahme der Southern Blot Analysen und Northern Blot Analysen (siehe 3.2.2, bzw. 3.2.3) sind die Daten der im Folgenden zusammengefassten Ergebnisse nicht gezeigt.

***LdArfGap*-ähnliches Zink-Finger Protein:**

Das Protein wurde erfolgreich in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit dem rekombinanten Protein wurden Antikörper in Hühnern generiert. Mit dem spezifischen Antiserum wurde zwar das rekombinante Protein im Western Blot erkannt, aber es konnte kein Protein in *L. donovani* Lysaten von T0 bis T5 der *in vitro* Stadiendifferenzierung detektiert werden (Verdünnung 1:200). Eine Southern Blot Analyse ergab einen *single copy* Status des Gens im Genom. Im Northern Blot wurde eine Bande detektiert. Die Menge der mRNA ist nicht reguliert. Der 5'UTR wurde aus genomischer *L. major* DNA erfolgreich amplifiziert. Der 3'UTR konnte unter Verwendung verschiedener *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide weder aus genomischer DNA von *L. major* noch von *L. donovani* amplifiziert werden, weshalb die Generierung von *Knockout*- und Überexpressions-Konstrukten nicht möglich war.

***LdArginin Kinase*:**

Das Protein wurde erfolgreich in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit dem rekombinanten Protein wurden Antikörper in Hühnern generiert. Mit dem spezifischen Antiserum wurde sowohl das rekombinante Protein als auch das Protein in *L. donovani* Lysaten von T1 bis T5 der *in vitro* Stadiendifferenzierung im Western Blot detektiert (Verdünnung 1:500) und die in der Proteom-Analyse festgestellte Amastigoten-spezifische Regulation bestätigt. Eine Southern Blot Analyse ergab einen *single copy* Status des Gens im Genom. Im Northern Blot wurde kein Signal detektiert. Die 3'UTR wurde aus genomischer *L. major* DNA erfolgreich amplifiziert. Der 5'UTR konnte unter Verwendung verschiedener *sense*- und *antisense*-

Oligonukleotide weder aus genomischer DNA von *L. major* noch von *L. donovani* amplifiziert werden, weshalb die Generierung von *Knockout*- und Überexpressions-Konstrukten nicht möglich war.

LdNegativer Regulator des cdc42p:

Das Protein konnte nicht erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Nach der Affinitätschromatographie wurden Banden aus verschiedenen Fraktionen im PA-Gel mit Coomassie gefärbt. Eine MALDI-Analyse verschiedener Banden ergab, dass es sich dabei nicht um *LdNegRegcdc42p* handelte. Dementsprechend konnte kein spezifischer Antikörper generiert werden. Folglich konnte die in den 2D-Gelen beobachtete stadienspezifische Regulation des Proteins nicht in einer Western Blot Analyse überprüft werden. Auch die Lokalisation des Proteins in Amastigoten oder Promastigoten durch elektronenmikroskopische Studien war deshalb nicht möglich.

Eine Southern Blot Analyse ergab einen *single copy* Status des Gens im Genom. Im Northern Blot wurde kein Signal detektiert. Es wurden erfolgreich 5'UTR und 3'UTR aus genomischer *L. major* DNA amplifiziert und mit dem Selektionsmarker-Gen für die Neomycinphosphotransferase (Neo) bzw. die Puromycinacetyltransferase (Pac) dazwischen in den pUC19 Vektor kloniert. Die linearisierten DNA-Fragmente wurden zur Transfektion promastigoter *L. donovani* Zellen eingesetzt. Ein Allel des *LdNegRegcdc42p* wurde erfolgreich gegen Puromycinacetyltransferase (Pac) ausgetauscht. Die resultierenden Mutanten zeigten einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Sie waren kleiner, hatten eine abgerundete Zellform und ihre Wachstumsrate war sehr gering. Diese Mutanten wurden mit dem *Lm5'UTR-Neo-Lm3'UTR*-Konstrukt mit dem Ziel transfiziert, das zweite Allel auszutauschen. Es konnten jedoch nach der zweiten Transfektionsrunde keine viablen Zellen selektioniert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es sich bei *LdNegRegcdc42p* um ein essentielles Protein der Leishmanien handelt.

Es wurde das amplifizierte *Ldnegregcdc42p* Gen in den Überexpressionsvektor *lmpkpX4* kloniert und dieser in *L. donovani* Promastigote transfiziert. Die Überexpression des *Ldnegregcdc42p* wurde in einer Northern Blot Analyse nachgewiesen. *Ldnegregcdc42p* überexprimierende *L. donovani* wurden *in vitro* zu axenischen Amastigoten differenziert. In einer Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Überexpression des *Ldnegregcdc42p* in *L. donovani* keine Auswirkung auf die stadienspezifische Expression der Proteine HSP70,

HSP90, HSP100 sowie der A2 Proteine hat.

LdCAC14613:

Das Protein wurde erfolgreich in *E. coli* rekombinant exprimiert und das rekombinante Protein zur Herstellung von Antikörpern in Hühnern verwendet. Mit dem spezifischen Antiserum konnte jedoch kein Protein in *Leishmania*-Lysaten nachgewiesen werden. Das gereinigte rekombinante Protein wurde mittels MALDI analysiert und das resultierende Peptidmassenspektrum zeigte, dass es sich um *LdCAC14613* handelt. Das rekombinante Protein wurde zur Herstellung von spezifischen Antikörpern in Kaninchen an die Firma Eurogentec gesandt. Doch auch dieses Antiserum konnte keine Bande der erwarteten Größe von 39 kDa in *Leishmania*-Lysaten detektieren. Folglich konnte die in den 2D-Gelen beobachtete stadienspezifische Regulation des Proteins nicht in einer Western Blot Analyse überprüft werden. Auch die Lokalisation des Proteins in Amastigoten oder Promastigoten durch elektronenmikroskopische Studien war deshalb nicht möglich.

Die 3'UTR konnte nur aus genomischer DNA von *L. donovani*, die 5'UTR dagegen nur von *L. major* amplifiziert werden. Es wurden *Lm5'UTR* und *Ld3'UTR* mit dem Selektionsmarker-Gen für die Neomycinphosphotransferase (Neo) bzw. die Puromycinacetyltransferase (Pac) dazwischen in den pUC19 Vektor ligiert. Promastigote *L. donovani* wurden mit dem *Lm5'UTR*-Neo-*Ld3'UTR*-Konstrukt transfiziert und nach Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden viable Zellen angezogen. Die *LdΔcac14613⁺ⁿ*-Mutanten zeigten einen unauffälligen Phänotyp. Es wurden mehrere unabhängige Klone der *LdΔcac14613⁺ⁿ*-Mutanten mit dem *Lm5'UTR*-Pac-*Ld3'UTR*-Konstrukt transfiziert. Das zweite Allel ließ sich jedoch nicht gegen den Selektionsmarker Pac austauschen. Die Zellen starben unter der Selektion mit Puromycin B.

Es wurde das amplifizierte *Ldcac14613* Gen (s. 3.2.1) in den Überexpressionsvektor *ImpkpX4* kloniert und dieser in *L. donovani* Promastigote transfiziert. Die Überexpression des *Ldcac14613* wurde in einer Northern Blot Analyse nachgewiesen. *Ldcac14613* überexprimierende *L. donovani* wurden *in vitro* zu axenischen Amastigoten differenziert. In einer Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Überexpression des *Ldcac14613* in *L. donovani* keine Auswirkung auf die stadienspezifische Expression der Proteine HSP70, HSP90, HSP100 sowie der A2 Proteine hat.

LdCAC33984:

Das Protein wurde erfolgreich in *E. coli* rekombinant exprimiert und das rekombinante Protein zur Herstellung von Antikörpern in Hühnern verwendet. Mit dem spezifischen Antiserum konnte jedoch kein Protein in *Leishmania*-Lysaten nachgewiesen werden. Das gereinigte rekombinante Protein wurde mittels MALDI analysiert und das resultierende Peptidmassenspektrum zeigte, dass es sich um LdCAC33984 handelt. Das rekombinante Protein wurde zur Herstellung von spezifischen Antikörpern in Kaninchen an die Firma Eurogentec gesandt. Doch auch dieses Antiserum konnte keine Bande der erwarteten Größe von 23 kDa in *Leishmania*-Lysaten detektieren. Folglich konnte die in den 2D-Gelen beobachtete stadienspezifische Regulation des Proteins nicht in einer Western Blot Analyse überprüft werden. Auch die Lokalisation des Proteins in Amastigoten oder Promastigoten durch elektronenmikroskopische Studien war deshalb nicht möglich.

Die 5'UTR wurde aus genomischer *L. major* DNA erfolgreich amplifiziert. Die 3'UTR konnte unter Verwendung verschiedener *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide weder aus genomischer DNA von *L. major* noch von *L. donovani* amplifiziert werden, weshalb die Generierung von *Knockout*- und Überexpressions-Konstrukten nicht möglich war.

Es wurde das amplifizierte *Ldcac33984* Gen (s. 3.2.1) in den Überexpressionsvektor *ImpkpX4* kloniert und dieser in *L. donovani* Promastigote transfiziert. Die Überexpression des *Ldcac33984* wurde in einer Northern Blot Analyse nachgewiesen. *Ldcac33984* überexprimierende *L. donovani* wurden *in vitro* zu axenischen Amastigoten differenziert. In einer Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Überexpression des *Ldcac33984* in *L. donovani* keine Auswirkung auf die stadienspezifische Expression der Proteine HSP70, HSP90, HSP100 sowie der A2 Proteine hat.

4 Diskussion

4.1 Proteomanalyse der *in vitro* Stadiendifferenzierung von *L. donovani*

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proteinmuster von *L. donovani* während der *in vitro* Differenzierung zu axenischen Amastigoten mittels hochauflösender 2D-Gel-Elektrophorese (2D-GE) mit dem Ziel untersucht, stadienspezifisch regulierte Proteine durch massenspektrometrische Analysen zu identifizieren. Da dieser Parasit während seines natürlichen Lebenszyklus den sehr unterschiedlichen Bedingungen in seiner Umgebung, d.h. im Insektenvektor und im Säugetierwirt, und auch den Abwehrmechanismen dieser Wirte ausgesetzt ist, wird zur Anpassung die kontrollierte Expression und Regulation verschiedener Gene erforderlich. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, bei denen die Genexpression im wesentlichen transkriptionell reguliert wird, ist für die Trypanosomatiden das Vorkommen von Multigeneinheiten charakteristisch, welche als Einheit transkribiert werden (so genannte polycistronische Transkription). Daraus folgt, dass bei diesen Protozoen die Genexpression post-transkriptionell, also über mRNA-Stabilität und -Degradation reguliert wird (Stiles, Hicock et al. 1999). Die Menge der in der Zelle vorhandenen mRNA korreliert deshalb nicht zwingend mit der Menge des entsprechenden Genprodukts. Die Unterschiede sollten daher direkt auf Proteinebene untersucht werden. Neben den unterschiedlichen Proteinmengen zu bestimmten Zeitpunkten der Zelldifferenzierung können auch Modifikationen eines Proteins, wie z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung, zu einer veränderten Wirkung desselben im Zellstoffwechsel führen. Das Vorkommen eines Proteins in seiner ursprünglichen und in der modifizierten Form kann ebenfalls mit Hilfe der 2D-GE untersucht werden.

Vergleichende Proteomanalysen wurden mittlerweile auch für andere *Leishmania*-Spezies, wie *L. infantum* (El Fakhry, Ouellette et al. 2002) und *L. mexicana* (Nugent, Karsani et al. 2004) durchgeführt.

4.1.1 Analyse der Proteinmuster und die massenspektrometrische Identifizierung stadienspezifischer Proteine

Insgesamt konnten aus dem Gesamtproteinextrakt und dem löslichem Proteinextrakt der untersuchten Zellstadien T0 bis T5 unter Verwendung verschiedener pH-Gradienten in der 1. Dimension etwa 2000 verschiedene, mit Silber färbbare Proteine mittels der 2D-GE getrennt

werden. Dies entspricht knapp 25% der ca. 8200 im *L. major* Genomprojekt identifizierten Gene (<http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp>). In den mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gelen (pH 4-7) wurden durchschnittlich 500 verschiedene Protein-*spots* detektiert. Alle identifizierten Proteine aus den mit Coomassie gefärbten 2D-Gelen, deren Abundanz während der Stadiendifferenzierung reguliert war, wurden mittels MALDI-TOF analysiert. Es wurden insgesamt 94 verschiedene Protein-*spots* untersucht.

Für 91,5 % der hier untersuchten Proteine wurden durch die MALDI-TOF-Analyse auswertbare Peptidmassenspektren erhalten. Dabei stammten 65 Proteine aus den 2D-Gelen von Gesamtzellextrakten und 21 Proteine aus denen der löslichen Fraktion (s. Tab. 3.1). Es wurde eine Korrelation zwischen der Intensität eines Protein-*spots* und der Spektrumqualität beobachtet, obgleich die MALDI-Analyse einiger intensiver *spots* nur wenige *peaks* (=Peptidmassen) lieferte. Dieselbe Erfahrung machten Drummel-Smith und Mitarbeiter bei ihrer Proteomanalyse von *L. major* (Drummel-Smith, Brochu et al. 2003). Es gibt bei MALDI-Analysen natürlich eine Limitation bezüglich der Peptid-Konzentration des untersuchten Proteins. Ein Protein-*spot*, der sich mit kolloidalem Coomassie färben lässt, enthält jedoch eine ausreichende Peptid-Konzentration (mündliche Kommunikation mit E. Krause, FMP, Berlin). Die mit kolloidalem Coomassie gefärbten *spots* enthalten ca. 0,2 bis 1 ng Protein. Das Problem bei sehr geringen Proteinkonzentrationen und dementsprechend sehr kleinen *spots* besteht meist darin, dass beim Ausstechen aus dem Gel im Verhältnis zu viel Gelmatrix mit aufgenommen wird, was eine Verunreinigung der Probe zur Folge hat. Diese Kontaminierungen, z.B. mit Alkalisalzen, resultieren in verminderter Signalintensität und vermehrten unspezifischen Hintergrund-Signalen (Smirnov, Zhu et al. 2004). Mittlerweile wurden verschiedene Methoden in der Probenaufbereitung erfolgreich getestet, die diese Phänomene nahezu eliminieren (Smirnov, Zhu et al. 2004). Für eine optimale Qualität der Peptidmassenspektren muss außerdem während der Ionisierung die Laser-Fluenz ständig justiert werden, um möglichst das Level der höchsten Inonenproduktion zu erreichen, was einen erfahrenen Operator erfordert (Jensen, Mortensen et al. 1997). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit über 90% auswertbarer Spektren eine hohe Qualität in der MALDI- Analyse erreicht wurde.

In 71 Fällen wurde eine eindeutige Zuordnung zu den Einträgen in den Datenbanken erreicht. Es wurden also 75,5 % der insgesamt 94 als stadienspezifisch reguliert beobachteten Proteine identifiziert (s. Tab. 3.1). Da die Aminosäuresequenzen zwischen *L. major* und *L. donovani* in

hohem Maße konserviert sind (92-96%) wurde neben der NCBI-Datenbank auch die Protein-Datenbank des *L. major* Genomprojektes durchsucht, so dass für die Mehrzahl der Proteine eine Identifizierung erwartet werden konnte. Das 17,5% der Proteine nicht anhand des für sie ermittelten Peptidmassen-*fingerprints* identifiziert werden konnten, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten unvollständige Peptidmassenspektren aus der MALDI-TOF-Analyse ursächlich sein. Denkbar ist auch, dass sich einige funktionsgleiche Proteine in der Aminosäuresequenz zwischen *L. major* und *L. donovani* so stark unterscheiden, dass sie sich nicht anhand ihrer Peptidmassenspektren identifizieren lassen. Einige der Peptidmassenspektren konnten anhand der Einträge von homologen Proteinen anderer Trypanosomatiden (*T. brucei*, *T. cruzi*, *T. equiperdium*) in der NCBI-Datenbank identifiziert werden, da die Aminosäuresequenzen auch hier stark konserviert sind.

In einer anderen Proteomanalyse von *L. donovani infantum* wurden ebenfalls etwa 2000 Proteine separiert, wovon 62 als Amastigoten-spezifisch identifiziert wurden (El Fakhry, Ouellette et al. 2002). Für *L. mexicana* wurden drei Stadien (prozyklische Promastigote, metazyklische Promastigote und Amastigote) in einer Proteomanalyse verglichen, wobei auch etwa 2000 Proteine dargestellt werden konnten, von denen 47 als rein stadienspezifisch identifiziert wurden und weitere 100 Proteine, die während der Differenzierung in unterschiedlichen Mengen synthetisiert wurden (Nugent, Karsani et al. 2004). Je mehr Zustände verglichen werden, umso mehr Unterschiede im Proteinmuster werden identifiziert. Nugent und Mitarbeiter konnten 47 der 147 reguliert synthetisierten Proteine nach massenspektrometrischen Analysen als Proteine mit bekannter Funktion identifizieren (Nugent, Karsani et al. 2004). Eine vergleichende Analyse des Proteoms der *Plasmodium falciparum* Stadien erbrachte die Identifizierung 1300 verschiedener Proteine, was einer Abdeckung von 23% der offenen Leserahmen des Genoms entspricht (Lasonder, Ishihama et al. 2002).

Die Gesamtanzahl der in der vorliegenden Studie mittels der 2D-GE dargestellten Proteine und auch die Anzahl differenziell detektierter Proteine ist also vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien. Im Bereich der Identifizierung nach MALDI-TOF MS wurde hier mit 75,5% identifizierten Proteinen im Vergleich zu 32% bei *L. mexicana* (Nugent, Karsani et al. 2004) ein wesentlich besseres Ergebnis erzielt. Die Ursache dafür ist vermutlich zum einen in der hohen Messgenauigkeit der Massenspektrometrie und zum anderen in der manuellen Nachbearbeitung der Spektren begründet, die genauere Werte für die

Peptidmassenlisten lieferte.

Die 72 identifizierten Proteine repräsentieren 56 verschiedene Proteinspezies, wie der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist. Zum Beispiel wurden HSP70, HSP83 und HSP70-verwandte Proteine mehrfach identifiziert. Für HSP70 sind mehrere Formen im *Leishmania*-Genom bekannt. Die Beobachtung kleinerer, als HSP70 bzw. HSP83 identifizierter Proteine (*spots* Nr. 13, 15 und 16, Tab. 3.1), könnte auch ein Hinweis auf im regulären Zellstoffwechsel ständig anfallende Degradationsprodukte dieser sehr abundanten Proteine sein. Es wurden je zwei Proteine als α -Tubulin bzw. β -Tubulin mit jeweils ähnlichem pI aber abweichenden Massen identifiziert, wobei *spot* Nr.59G bezüglich der Größe mit 48 kDa dem *full-length* α -Tubulin am ähnlichsten war. Die drei anderen als Tubulin identifizierten Proteine waren kleiner (34-36 kDa).

Auch in der *L. mexicana*-Proteomanalyse wurden Amastigoten-spezifische Tubulin-Fragmente gefunden (Nugent, Karsani et al. 2004). Drummel-Smith und Mitarbeiter identifizierten in 2D-Gelen von *L. major*-Extrakten zahlreiche *spots* als Tubuline, deren Größe im Gel kleiner war als die erwartete Protein-Größe von ca. 50 kDa. Sie stellten in einer Western Blot Analyse von *L. major* Gesamtextrakten mit einem anti- α -Tubulin Antikörper fest, dass in der Tat kleinere α -Tubulin-Fragmente in den *L. major* Zellen vorhanden sind. Kleinere Mengen dieser 20-37 kDa großen Fragmente wurden in Zellen aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase detektiert und die Intensität einiger Banden nahm bei Zellen aus der frühen stationären Phase stark zu (Drummel-Smith, Brochu et al. 2003).

Es wäre möglich, dass es sich bei den hier identifizierten kleineren Tubulinen um Fragmente handelt, die durch (ungerichtete) Proteolyse während der Probenaufbereitung entstanden. Es gibt jedoch mehrere Anhaltspunkte, die gegen diese These sprechen. Erstens wurden den Proben zu Beginn der Proteinextraktion Protease-Inhibitoren zugesetzt (s. 2.2.18). Zweitens wurden diese Fragmente nicht bei den Extrakten von Promastigoten beobachtet. Drittens, wie andere Studien zeigen, werden diese Fragmente auch in schnell aufbereiteten Proben für 1D-Polyacrylamidgelen detektiert (Drummel-Smith, Brochu et al. 2003) (Nugent, Karsani et al. 2004). Viertens, die Fragmente sind von Gel zu Gel reproduzierbar. Außerdem sind für Tubuline bereits post-translationale Modifikationen bekannt (durch Polyglutamylierung, Acetylierung, Phosphorylierung etc.) (McKean, Vaughan et al. 2001). Tubuline sind abundante strukturelle Proteine in Leishmanien und ein Beispiel für stark exprimierte Gene, die in mehreren Kopien in sogenannten *tandem repeats* angeordnet sind (Curotto de Lafaille

and Wirth 1992). Bei Trypanosomen machen die Tubuline etwa 10% des Gesamtproteins aus. Die Gene sind innerhalb der *Trypanosomatidae* konserviert, unterscheiden sich aber von denen der Säugetierwirte (Chan and Fong 1994). Sechs Familien gehören zu der Tubulin-Superfamilie, wobei die Zeta-Tubuline bisher nur in Kinetoplastiden gefunden wurden (Oakley 2000). Curotto de Lafaille und Mitarbeiter charakterisierten die Tubulin-mRNA-Expression an *Leishmania enriettii* Null/+ Mutanten, bei denen einer der beiden Tubulin-cluster deletiert wurde und an Null-Mutanten, denen α -Tubulin Gene episomal ersetzt wurden. Bei den Null/+ Mutanten, die nur ein Drittel der normalen Anzahl an α -Tubulin Genen besaßen, zeigte sich eine post-transkriptionell regulierte Steigerung der α -Tubulin mRNA-Stabilität. Die parallel dazu ansteigende β -Tubulin mRNA-Menge lässt eine koordinierte Regulation der Tubulin-mRNA vermuten (Curotto de Lafaille and Wirth 1992).

Zum Teil führte die Analyse verschiedener *spots* aus Gelen von Promastigoten und Amastigoten zu derselben Proteinspezies. Dies war der Fall für die Protein-*spots* Nr.1, Gruppe A und Nr. 64, Gruppe D in Tab. 3.1 (=Adenosylhomocysteinase) und Nr. 34, Gruppe B und Nr. 71, Gruppe D in Tab. 3.1 (=Eukaryotischer Initiations Faktor 5a). Dies könnte bedeuten, dass das jeweilige Protein in einer Basis-Version in beiden Stadien synthetisiert wird und die anschließende Modifikation oder Prozessierung aber stadienspezifisch unterschiedlich geschieht. Eine stadienspezifische post-transkriptionell regulierte Expression wird auch für die Metalloproteinase GP63 bei *L. chagasi* angenommen. Die Menge des GP63 nimmt im Verlauf des Wachstums von der logarithmischen zur stationären Phase um das 14-fache zu. Während das GP63 zunächst als 66 kDa Bande erscheint, wird diese später durch ein nur 63 kDa großes Protein ersetzt (Yao, Leidal et al. 2002). Für den EIF5a ist eine post-translationale Modifikation bei verschiedenen Organismen (Hefen, verschiedene humane Zelllinien) bekannt (Caraglia, Marra et al. 2001; Schlee, Krug et al. 2004). EIF5a ist das einzige bekannte Protein, welches die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin trägt. Das Protein kann in hypusinilierter und dehypusinierter Form vorliegen (Caraglia, Marra et al. 2001). Versuche mit Hypusin-Inhibitoren zeigten, dass diese Aminosäure von entscheidender Bedeutung für die Proliferation und Transformation eukaryotischer Zellen ist (Caraglia, Marra et al. 2001). Die Aktivität des EIF5a wird durch die post-translationale Modifizierung des Hypusins moduliert (Caraglia, Marra et al. 2003). In HeLa-Zellen wurden vier Isoformen des EIF5a gefunden, wobei für eine die Modifizierung durch Hypusinilierung und für drei die Acetylierung eines Lysinrestes gezeigt wurde (Klier, Csonga et al. 1995). Ob es sich bei dem in *L. donovani* identifizierten EIF5a um unterschiedlich hypusinilierte oder andersartig

modifizierte Formen in Amastigoten und Promastigoten handelt, kann allein aus der Lokalisierung der Proteine im 2D-Gel nicht beantwortet werden. Nach den Erkenntnissen über die Funktion des EIF5a in anderen eukaryotischen Zellen bezüglich der kontrollierten Proliferation ist es wahrscheinlich, dass dieses Protein in ähnlicher Weise bedeutsam für die Stadiendifferenzierung der Leishmanien ist.

4.1.1.1 Promastigoten-spezifische Proteine

23 der 71 identifizierten Proteine zeigten eine Promastigoten-spezifische Regulation, von denen alle mit Hilfe der MALDI-Analyse identifiziert werden konnten. Bei neun der Promastigoten-spezifischen Proteine handelte es sich um hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion, die übrigen konnten bereits bekannten Proteinen zugeordnet werden. Von diesen ließen sich drei einer funktionellen Kategorie „Energiestoffwechsel und Phosphorylierung“ zuordnen (LACK Protein, Aldolase-Epimerase, Vorläufer einer Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase). Vier weitere Proteine sind vermutlich an Vorgängen der Zellzykluskontrolle und Proliferation beteiligt (Adenosintransporter, EIF5a, EIF4a, Untereinheit des Replikationsfaktor A). Bezüglich des EIF4a ergaben jüngst die vergleichenden Analysen der sogenannten Tritryp-Genome (*L. major*, *T. brucei*, *T. cruzi*) eine ungewöhnlich hohe Kopienzahl dieses Gens. Es wurden 15 Kopien mit einer 30-57% Identität und mehr als 100 Kopien mit einer etwa 30% Identität zum *S. cerevisiae* Gen identifiziert. Die meisten enthielten ATP-abhängige DEAD-box RNA-Helikase Domänen, die, möglicherweise für transkriptionelle oder translationelle Prozesse, eine Bindung an Nukleinsäuren implizieren (Ivens, Peacock et al. 2005).

Es wurden außerdem drei Promastigoten-spezifische Proteine gefunden, die ihrer vorhergesagten Funktion nach im Aminosäurestoffwechsel involviert sind: Die S-Adenosylmethioninsynthase, die Adenosylhomocysteinase und ein Vorläufer einer mitochondrialen prozessierenden Peptidase. Für die S-Adenosylmethioninsynthase wurde jedoch in anderen Studien gezeigt, dass das Protein hauptsächlich in Amastigoten bzw. metazyklischen *L. major* Zellen synthetisiert wird (Akopyants, Matlib et al. 2004; Almeida, Gilmartin et al. 2004).

4.1.1.2 Amastigoten-spezifische Proteine

Die überwiegende Anzahl, nämlich 48 der 71 identifizierten Proteine, zeigten sich Amastigoten-spezifisch reguliert. Sechs davon waren hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion und 42 der Amastigoten-spezifischen Proteine ließen sich mit Hilfe der Datenbanken Proteinen mit bekannter Funktion zuordnen.

10 dieser Proteine sind funktionell der zellulären Stressantwort zuzuordnen (Tab. 3.3). Die Regulation wurde in diesen Fällen schon bei anderen Organismen im Zusammenhang mit der Wirkung verschiedener Stressoren auf die Zelle beschrieben. Bei Leishmanien wurde bereits eine erhöhte Synthese des HSP90 (Synonym für HSP83) nach Hitzeschock nachgewiesen (Brandau, Dresel et al. 1995). Die Homöostase des HSP90 wirkt offenbar kontrollierend auf die Stadiendifferenzierung bei *L. donovani* (Wiesgigl and Clos 2001).

Wie bei der hier beobachteten erhöhten Proteinsynthese einer ATPase β -Untereinheit nach Ansäuerung des Mediums (T2), wurde auch für die ATPase von *Streptococcus mutans* eine erhöhte Proteinmenge nach Erniedrigung des pH-Wertes gezeigt (Quivey, Faustoferri et al. 2000).

Peroxiredoxine sind in Kinetoplastiden die hauptsächlichen Peroxid-entgiftenden Enzyme und gelten als Schlüsselenzyme bei der Abwehr von oxidativem Stress (Nogoceke, Gommel et al. 1997). Verschiedene Peroxiredoxine (Prx) wurden bereits als reguliert synthetisiert beschrieben, z.B. bei *L. chagasi* (Barr and Gedamu 2001), bei *P. falciparum* (Kawazu, Tsuji et al. 2000) und *O. volvulus* (Lu, Egerton et al. 1998). Das PfPrx wird im Verlauf der Differenzierung des Trophozoiten-Stadiums der Plasmodien vermehrt synthetisiert und bei *O. volvulus* nimmt während der Metamorphose zum infektiösen L3-Larven-Stadium die Menge der Thioredoxin-Peroxidase zu.

Für Cyclophiline gibt es bereits zahlreiche Hinweise auf ihre Beteiligung an der zellulären Stressantwort (Andreeva, Heads et al. 1999). Bei dieser in nahezu allen Organismen vorkommenden Proteinspezies handelt es sich um eine Familie, deren Mitglieder sehr stark konserviert sind. Sie übernehmen Funktionen bei der Faltung von Proteinen und gehören zu den molekularen Chaperonen. Alle Proteine dieser Familie verfügen über Peptidyl-Prolyl

Isomerase Aktivität, welche für die Proteinfaltung erforderlich ist. Es wird vermutet, dass sie an der Translation und an Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Für einige Cyclophiline wurde eine erhöhte Expression unter verschiedenen Stressoren gezeigt (Andreeva, Heads et al. 1999). Für *L. donovani* wurde bereits ein Cyclophilin mit Chaperon-Funktion beschrieben (Chakraborty, Das et al. 2002).

Auch die Enolase, ein Enzym der Glycolyse, scheint in der zellulären Stressantwort involviert zu sein. Bei *T. brucei* wurde durch das Ausschalten der Enolase mittels RNAi gezeigt, dass sie spezifische regulatorische Effekte, je nach Art der Stressfaktoren, auf andere Enzyme des Glycolyse-Stoffwechsel ausübt, die sich in einer verminderten enzymatischen Aktivität der betroffenen Enzyme zeigen (Albert, Haanstra et al. 2005). Im Umkehrschluss ist es wahrscheinlich, dass auch eine verstärkte Expression der Enolase, wie sie hier in Amastigoten beobachtet wurde, regulatorisch auf andere Enzyme einwirkt. Bei *S. cerevisiae* wird für die Enolase zudem eine Rolle als Hitzeschock-Protein diskutiert (Iida and Yahara 1984; Iida and Yahara 1985).

Weitere 10 der Amastigoten-spezifischen Proteine stehen in Verbindung mit dem Zytoskelett oder der Zellmembran. Für α - und β -Tubuline sowie Aktin sind die Funktion und ihre Beteiligung am Zytoskelett weithin bekannt.

ArfGap und der Negative Regulator des cdc42p sind in die Reorganisation des Zytoskeletts und Membranen involviert. ARF (ADP ribosylation factor) sind kleine GTP-bindende Proteine, welche über einen GTP-Zyklus die reversible Bindung cytosolischer coat-Proteine an Golgi-Membranen regulieren, wodurch sie die Produktion und Lebensdauer der Membranen bestimmen (Donaldson and Klausner 1994). Die ARF-spezifische GTPase aktivierende Protein (ArfGap)-Domäne von Multidomän-Proteinen, wie bei dem hier identifizierten ArfGap-ähnlichen Zink-Finger-Protein, weist auf eine Beteiligung an der Koordination von Membranaufbau und -Abbau und die der Reorganisation des Aktins bei der Zell-Lokomotion hin (de Curtis 2001).

Unlängst wurden in *T. cruzi* und *T. brucei* neun und in *L. major* zehn Arf bzw. Arl (Arf-like) Proteine identifiziert (Price, Panethymitaki et al. 2005). Durch das Ausschalten des ARL1-Gens mittels RNAi wurde demonstriert, dass ARL1 essentiell für die *T. brucei* Blutstromform ist. Suppression führte vor dem Zelltod u.a. zu Vervielfältigung von Flagellen und Nuklei.

Dagegen hatte das Ausschalten des ARL1 in prozyklischen Formen keinen Effekt auf Wachstum oder Morphologie des Parasiten (Price, Panethymitaki et al. 2005).

Für die cdc42p GTPase sind mehrere Regulator-Proteine bekannt. Bei *S. pombe* wurden 32 verschiedene Gene gefunden, die für negative Regulatoren kodieren. In eukaryotischen Zellen kontrollieren sie die Signal-Transduktionswege, welche für die Aktin-Reorganisation verantwortlich sind (Murray and Johnson 2000). *S. pombe cdc42p-knockout*-Mutanten sind nicht viabel und verharren als kleine abgerundete Zellen (Miller and Johnson 1994). Auch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) fungieren als negative Regulatoren für Cdc42p, wie z.B. Bem3p und Rga1p von *S. cerevisiae* (Johnson 1999). Der hier als Amastigoten-spezifisch identifizierte Negative Regulator des cdc42p von *L. donovani* zeigt die größte Ähnlichkeit zu CAB57926 (Neg. Reg. des cdc42p) von *Schizosaccharomyces pombe*. Dieser ist in die Endocytose involviert und möglicherweise auch in der Akkumulation vakuolarer Polyphosphate, sowie an der Verteilung von V-ATPasen und anderen Membranproteinen beteiligt (Wood, Gwilliam et al. 2002).

Da die Arginin Kinase, wie in *T. cruzi* identifiziert, eine putative Aktin-Bindungsdomäne in ihrer Sequenz aufweist (Pereira, Alonso et al. 2000), ist auch für das hier als Amastigoten-spezifisch synthetisiert identifizierte Protein eine Verbindung zum Zytoskelett wahrscheinlich. Aufgrund der Aktin-Bindungsstelle in der Arginin-Kinase wird vermutet, dass dieses Enzym an der Bewegung der Zelle bzw. der Flagellenbewegung und anderen Prozessen, die viel Energie erfordern, beteiligt ist (Alonso, Pereira et al. 2001).

Dreizehn der Amastigoten-spezifischen Proteine sind nachweislich oder putativ am Energiestoffwechsel und an Phosphorylierungsprozessen beteiligt.

Es wurden drei Amastigoten-spezifische Kinasen identifiziert, die putativ in Phosphorylierungsprozessen involviert sind: Arginin Kinase, Thymidin Kinase und Nukleosiddiphosphat Kinase B. Die Arginin Kinase (AK) wurde als erste Guanidin Kinase eines einzelligen, begeißelten Parasiten in *T. cruzi* (Pereira, Alonso et al. 2000), und wenig später auch in *T. brucei* (Pereira, Alonso et al. 2002) beschrieben. Das Enzym phosphoryliert L-Arginin, wobei für die Reaktion ATP und ein divalentes Kation benötigt wird. Beim Vergleich der Enzyme von *T. cruzi* und *T. brucei* zeigte sich in der Aminosäuresequenz eine Identität von 82%. Die höchsten Identitäten (etwa 70%) beider AK-Sequenzen der

Trypanosomen zeigten sich im Vergleich zu AK-Sequenzen von Vertretern des Phylums *Arthropoda* (Pereira, Alonso et al. 2002). In *T. cruzi* Epimastigoten nimmt die AK Aktivität während der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich zu. Auf mRNA-Ebene wurden dagegen kaum Unterschiede beobachtet, was eine post-transkriptionelle Regulation des Enzyms vermuten lässt (Alonso, Pereira et al. 2001). Die Überexpression der AK in *T. cruzi* führte in den Transfektanten zu einer gesteigerten Wachstumsrate unter Nahrungs- und pH-Stress Bedingungen, weshalb eine Beteiligung der AK bei der Adaption des Parasiten an Veränderungen der Wirtsumgebung postuliert wird (Pereira, Alonso et al. 2003).

Die Thymidin Kinase wird im 2. Teil der Diskussion ausführlich beschrieben.

Auch das Rieske-Fe-S-Protein wurde als Amastigoten-spezifisch identifiziert. Es handelt sich bei diesem Protein um eine Untereinheit des stadienspezifisch regulierten mitochondrialen Proteinkomplex der Cytochrom C Reduktase (Priest and Hajduk 1992; Priest, Wood et al. 1993; Priest and Hajduk 1995). In den zwei verschiedenen Lebensformen von *T. brucei* sind Cytochrome und andere, im Energiestoffwechsel involvierte mitochondriale Proteine, stadienspezifisch reguliert (Priest and Hajduk 1994). Die prozyklische *T. brucei* Form generiert ihre Energie durch die Cytochrom-vermittelte Respiration. Dagegen bezieht die Blutstromform ihre Energie aus der Glycolyse (Parsons, Furuya et al. 2001). Dementsprechend sind die Proteinmengen glycolytischer Enzyme in der Blutstromform sehr viel größer als in der prozyklischen Form (Hart, Misset et al. 1984). Auch die promastigoten Leishmanien sind, wie prozyklische *T. brucei* Formen, in der Lage, Aminosäuren als Carbon- und Energie-Ressourcen durch mitochondriale oxidative Phosphorylierung zu nutzen. Sie sind deshalb weniger auf die Glycolyse angewiesen als die Amastigoten. Diese sind im Säugerwirt zur Energiegewinnung in Form von ATP hauptsächlich von der Glucose und Fettsäuren abhängig. In der hier vorliegenden Studie wurden verschiedene Enzyme des Kohlenhydrat-Stoffwechsels wie Alkohol-Dehydrogenase und Ribulosephosphat-Epimerase (Hannaert, Bringaud et al. 2003) bzw. der Glycolyse (Enolase, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase = TIM) als Amastigoten-spezifisch identifiziert. Die beiden letzteren sind in den Glycosomen lokalisiert, die Enolase ist dagegen nur im Cytosol zu finden (Opperdoes and Borst 1977; Hannaert, Bringaud et al. 2003). TIM wurde auch bei *L. infantum* als Amastigoten-spezifisches Protein identifiziert. Die spezifische Aktivität der TIM ist in *L. infantum* Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten zweifach erhöht (El Fakhry, Ouellette et al. 2002). Der erhöhte Bedarf für die TIM in Amastigoten zeigt, wie wichtig das Enzym für die

Glycolyse ist, und demonstriert die Abhängigkeit der intrazellulär lebenden Form von diesem Stoffwechsel zur Generierung des ATP (El Fakhry, Ouellette et al. 2002). Im gleichen Zusammenhang ist sehr wahrscheinlich auch die verstärkte Synthese der anderen, am Kohlenhydrat-Stoffwechsel beteiligten Amastigoten-spezifischen Enzyme, zu betrachten.

Sieben der Amastigoten-spezifischen Proteine könnten an Prozessen beteiligt sein, die Zellzyklus und Proliferation betreffen. Die Enolase kann auch dieser Gruppe zugeordnet werden. Die beta-Enolase, eine Muskel-spezifische Isoform höherer Vertebraten, wurde als frühester Marker der Differenzierung myogener Zellen in Embryonen identifiziert (Fougerousse, Edom-Vovard et al. 2001). Das Poly-Zink-Finger Protein ist an genregulatorischen Prozessen beteiligt, wie bereits für *T. cruzi* und *C. fasciculata* gezeigt werden konnte. Es wird vermutet, dass es eine Funktion bei der Prozessierung von prä-mRNA übernimmt (Abeliovich, Tzfati et al. 1993; Espinosa, Portal et al. 2003).

Drei der als Amastigoten-spezifisch identifizierten Proteine sind am Aminosäurestoffwechsel beteiligt: Die Alanintransaminase, eine putative thermostabile Carboxypeptidase und die Adenosylhomocysteinase. Letztere katalysiert die Hydrolyse von S-Adenosyl-L-Homocystein zu Adenosin und L-Homocystein, aus dem anschließend die Aminosäuren Methionin oder Cystein generiert werden können. Weil die Alanintransaminase den Transfer der Aminogruppe von Alanin zu Ketoglutarat katalysiert, ist sie ebenfalls für die Bereitstellung von Aminosäuren wichtig. Die Carboxypeptidase, ein Metalloprotein, fungiert als Exopeptidase beim Abbau von Peptiden. Dass das hier als Amastigoten-spezifisch identifizierte Enzym putativ thermostabil ist, erscheint sinnvoll für die Anpassung an die erhöhte Temperatur im Säugerwirt. Das erhöhte Vorkommen dieser drei Enzyme in den Amastigoten kann derart interpretiert werden, dass zum einen ein gesteigerter Abbau von Proteinen existiert, die in der neuen Umgebung nicht mehr benötigt werden und zum anderen gleichzeitig neue Proteine synthetisiert werden müssen, wofür umgehend die Vorstufen bereitgestellt werden. Gleichzeitig könnte die gesteigerte Enzymproduktion einen Wettbewerbsvorteil in der Konkurrenz mit den Wirtsenzymen um die vom Wirt bereitgestellten Nährstoffe darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch eine vergleichende Proteomanalyse die Unterschiede im Proteinsynthesemuster verschiedener Stadien des *in vitro* Differenzierungsprozesses von *L. donovani* dargestellt. Obwohl für diese Spezies kein Genomprojekt existiert, konnten die meisten der als stadienspezifisch reguliert beobachteten Proteine identifiziert werden. Durch Verwendung von Gesamtextrakten und zusätzlich der löslichen Fraktion von *L. donovani* Lysaten in Verbindung mit der Kombination verschiedener pH-Gradienten in der 1. Dimension der 2D-Gel-Elektrophorese, konnte eine hohe Auflösung der stadienspezifischen Proteome erreicht werden; vergleichbar oder auch höher als bei Arbeiten an verwandten Spezies. Im aktuellen Vergleich stellt diese Arbeit die umfangreichste Proteomanalyse bei *L. donovani* dar. Die stadienspezifischen Proteine ließen sich, je nach ihrer nachgewiesenen oder postulierten Funktion, in fünf Kategorien einteilen.

Ausblick:

Ein Problem bei den vergleichenden Proteomanalysen sind die großen Konzentrationsunterschiede, mit der die Proteine in der Zelle vorkommen. Dies führt leicht dazu, dass hauptsächlich die sehr abundanten Proteine identifiziert werden und schwach konzentrierte Proteine oft maskiert bleiben. Folglich wird die Abdeckung des Proteoms dadurch verringert. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken, bestünde in der Reduktion der Komplexität der Proben durch Vorfraktionierung der Proteinextrakte. Eine neue Proteom-Studie bei *L. infantum* zeigte, dass dadurch viele neue, weniger abundante, differentielle Proteine identifiziert werden können (McNicoll F).

4.1.2 Kriterien zur Auswahl Amastigoten-spezifischer Proteine zur näheren Charakterisierung

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten einige der stadienspezifischen Proteine näher charakterisiert werden. Hierbei sollten ausschließlich die Amastigoten-spezifischen Proteine im Fokus stehen, da die Amastigoten als Säugetierstadium für die Pathogenese der Leishmaniose verantwortlich sind. Insgesamt wurden 48 Amastigoten-spezifische Proteine identifiziert, wobei es sich in 6 Fällen um hypothetische Proteine aus der *L. major* GeneDB Datenbank handelt.

Bei Proteinen des Glukose-Stoffwechsels, den Strukturproteinen Aktin und Tubulin und den Hitzeschock Proteinen, sowie den HSP-verwandten Proteinen handelt es sich um bereits sehr gut untersuchte und beschriebene Proteine (Gallo and Precigout 1988; Brandau, Dresel et al. 1995; Hubel, Krobitch et al. 1997; Krobitch, Brandau et al. 1998; Ngo, Tschudi et al. 1998; Bakker, Westerhoff et al. 2000; Pellegrini and Budman 2005). Proteine, die eindeutig essentiell für das Überleben der Leishmanien sind, schieden aus, da sie für bestimmte Methoden wie z.B. *Gen-knockout* ungeeignet sind. Auch Proteine, deren Gen in mehreren Kopien im Genom vorliegt, sind für diese Art der Analyse minder geeignet.

Nachdem so die Mehrzahl der identifizierten Amastigoten-spezifischen Proteine von weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen wurde, blieben einige Proteine übrig, bei denen eine Beteiligung an den veränderten Stoffwechselfvorgängen und der Zell-Differenzierung sehr wahrscheinlich ist. Dies ergibt sich aus der vorhergesagten theoretischen Funktion und z.T. auch aus dem Vergleich äquivalenter oder homologer Proteine anderer Organismen und ihrer Wirkung in diesen. Da auch die hypothetischen Proteine ein großes Potential bezüglich ihrer Charakterisierungsmöglichkeiten bieten, wurden aus dieser Gruppe zunächst zwei Proteine mit in die Untersuchungen aufgenommen (CAC14613 und CAC33984, in Kurzform CAC1 und CAC3 genannt).

Insgesamt wurden sechs verschiedene Proteine (ArfGap-ähnliches Zink-Finger-Protein, Arginin Kinase, Negativer Regulator des *cdc42p*, putative Thymidin Kinase, CAC1 und CAC3) für die Charakterisierungsstudien in Betracht gezogen, nachdem die Southern Blot Analyse der genomischen Organisation für alle sechs Genorte einen *single copy* Locus

ergeben hatte (siehe Abb. 4). Es wäre in diesen Fällen somit grundsätzlich möglich gewesen, die Funktion der Gene bzw. der Genprodukte mit Hilfe von Deletions-Mutanten zu untersuchen.

Wie bereits in 1.5 beschrieben, findet bei Kinetoplastiden die Genregulation auf post-transkriptioneller Ebene statt. Die Menge an vorhandener mRNA stimmt deshalb nicht zwingend mit der Menge des entsprechenden Genprodukts überein. In Northern Blot Analysen (siehe Abb. 5) konnte für keines der sechs untersuchten Gene eine Steigerung der mRNA-Transkriptmenge im Verlauf der Stadiendifferenzierung entsprechend der beobachteten Regulation auf Protein-Ebene verzeichnet werden. Das schwächere Signal an Tag 2 beim ArfGap-ZFP-Protein ist auf unterschiedliche RNA-Mengen in den Spuren zurückzuführen, wie am Vergleich mit den Signalen der Kontrolle mit der Tubulin-Sonde und im Ethidium-Bromid-Gel zu erkennen ist. Bei der putativen Thymidin Kinase, der Arginin Kinase, dem Negativen Regulator des *cdc42p* und CAC3 wurde kein Signal detektiert. Auch mehrfache Wiederholung und veränderte Bedingungen durch unterschiedliche Hybridisierungszeiten und -temperaturen brachten kein anderes Ergebnis. Auch für andere Organismen wie *L. infantum* (Hanke, Ramiro et al. 2003), *S. cerevisiae* (Gygi, Rochon et al. 1999) und *Bacillus subtilis* (Mader, Antelmann et al. 2002) wurde beschrieben, dass häufig keine Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Menge besteht. Eine Regulation auf translationaler und post-translationaler Ebene ist für viele der Gene im Leishmanien-Genom wahrscheinlich (Duncan, Salotra et al. 2004). Die Ergebnisse der Hybridisierungen in *gene arrays* von Trypanosomen und *Leishmania* zeigen, dass etwa 1% der (zu detektierenden) mRNAs Unterschiede von mindestens zweifacher Menge zwischen den Stadien der Lebenszyklen aufweisen. Die korrespondierende Analyse der 1000 meist abundanten Proteine zeigte dagegen, dass etwa 3% stadienspezifisch reguliert sind (Clayton 2002).

Bei fünf der sechs ausgewählten Proteine kam es während der angestrebten Studien zu einem unerwartetem Verlauf, weshalb die teilweise erhaltenen Ergebnisse (s. 3.4) nicht näher diskutiert werden. Die Thymidin Kinase wurde umfassend charakterisiert und die daraus resultierenden Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.2 Thymidin Kinase: Vorkommen und Funktion

Für Thymidin-5'-Triphosphat (dTTP), eines der vier für die Polymerisierung der DNA erforderlichen Deoxyribonukleotide, existieren zwei Stoffwechselwege, die dTMP als Vorstufe des dTTP liefern. Im ersten und hauptsächlich *de novo* Syntheseweg katalysiert die Thymidylat Synthase die Methylierung des Deoxyuridin-5'-Monophosphats (dUMP) zu dTMP. Im zweiten Pfad, dem so genannten *salvage* Stoffwechsel, übernimmt die Thymidin Kinase die direkte Phosphorylierung des Thymidins in Gegenwart von ATP zu Thymidinmonophosphat (dTMP) (siehe Abb. 22). Im *salvage* Stoffwechsel werden Desoxyribonukleotide wiederverwertet, die aus dem extra- oder intrazellulären Abbau von DNA stammen. Während der *de novo* Syntheseweg in allen teilungsfähigen Zellen vorkommt, ist der *salvage* Mechanismus nicht universell verbreitet. Er fehlt z.B. bei *Plasmodium falciparum*, *Theileria annulata* und *Toxoplasma gondii* (Gutteridge and Trigg 1970; Walter, Muhlplfordt et al. 1970; Striepen, Pruijssers et al. 2004).

In *Trypanosoma mega* wurde die Thymidin Kinase erstmals 1958 indirekt durch den Einbau von [³H]-markiertem d-Thymidin nachgewiesen (Steinert, Firket et al. 1958). Später wurde die Thymidin Kinase aus *T. brucei rhodiense* isoliert (Chello and Jaffe 1972). Für *Leishmania donovani* demonstrierten LaFon und Mitarbeiter mit ¹⁴C-markierten Isotopen anhand des Metabolismus von Orotsäure und Thymidin, dass ein Pyrimidin *salvage* Stoffwechsel existiert (LaFon, Nelson et al. 1982). Diese Versuche wurden mit Promastigoten durchgeführt. Es zeigte sich, dass Thymidin primär zu Thymin umgewandelt wurde, was auf die Existenz einer Thymidin Phosphorylase hindeutete. Ein kleiner Anteil des Thymidin wurde zu dTMP umgewandelt, was auf die direkte Phosphorylierung durch eine Thymidin Kinase zurückgeführt wurde (LaFon, Nelson et al. 1982). Bei Leishmanien wurde eine Thymidin Kinase bis jetzt nicht isoliert oder näher charakterisiert.

Die Nomenklatur für die Thymidin Kinasen ist bis zur gegenwärtigen Literatur sehr uneinheitlich. Es soll deshalb im Folgenden eine Übersicht dazu gegeben werden. Die Thymidin Kinasen wurden nach Sequenzanalysen in die zwei Subfamilien Typ I (lang) und Typ II (kurz) unterteilt (Gentry 1992; Birringer, Claus et al. 2005). Die hier identifizierte *L. donovani* TK und auch die *L. major* TK gehören zum Typ II. In diese Kategorie gehören auch die humane cytosolische *hTK1* sowie die TK einiger Eukaryoten (*Trypanosoma spec.*, *E. histolytica*, *D. discoideum*), die TK verschiedener Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bacillus anthracis*) und einiger Viren (*Vaccinia*, *Variola*, Schweinepocken). Die *Mammalia* besitzen noch eine zweite Thymidin Kinase, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die TK des *Herpes simplex* Virus (HSV-TK) und die humane mitochondriale *hTK2* werden der Typ I Subfamilie zugeordnet. Die Typ I und Typ II Thymidin Kinasen zeigen nur eine sehr geringe Sequenzübereinstimmung und unterscheiden sich auch bezüglich der Substratspezifität. Die *Mammalia* TK1 (Typ II) benutzt Thymidin (Thd) und Deoxyuridin (dUrd) als Phosphatakzeptoren, ATP und dATP als Phosphatdonoren und dTTP wirkt als *feedback* Inhibitor. Die *Mammalia* TK2 (Typ I) phosphoryliert dThd, dUrd und Deoxycytidin (dCyd), ATP und CTP sind hier die Phosphatdonoren und dTTP und dCTP wirken als *feedback* Inhibitoren (Arner and Eriksson 1995). Auf diesem Unterschied in der Substratspezifität beruht die Selektivität der etablierten antiviralen Therapie mit Aziclovir und seinen Derivaten (Elion, Furman et al. 1977). Leishmanien sind normalerweise nicht Aziclovir-sensitiv, da sie offenbar keine Typ I TK besitzen. Deshalb konnte das HSV-TK Gen (Typ I-Subfamilie) in transfizierten *Leishmania*-Zellen als Negativ-Marker verwendet werden (LeBowitz, Cruz et al. 1992; Denise, Coombs et al. 2004).

Die Struktur der *hTK1* als Vertreter der Typ II Subfamilie, zu der auch die TK der Leishmanien gehört, konnte mittels Kristallisation aufgeklärt werden (Birringer, Claus et al. 2005). Die Wildtyp *hTK1* ist 234 Aminosäuren lang. Das native Protein liegt in Lösung als Tetramer vor (Arner and Eriksson 1995). Wie es sich diesbezüglich mit dem Enzym der Leishmanien verhält ist nicht bekannt. Für Typ II Thymidin Kinasen ist die Fähigkeit zur Aktivierung von Medikamenten-Vorstufen, so genannten *prodrugs* im Rahmen der HIV-Therapie bereits dokumentiert: *hTK1* aktiviert 3'-Azido-2',3'-Dideoxy-Thymidin (AZT), welches dann in der triphosphorylierten Form als Inhibitor der HIV Reversen Transkriptase wirkt (Herzyk, Beveridge et al. 1987; Olivero 2006).

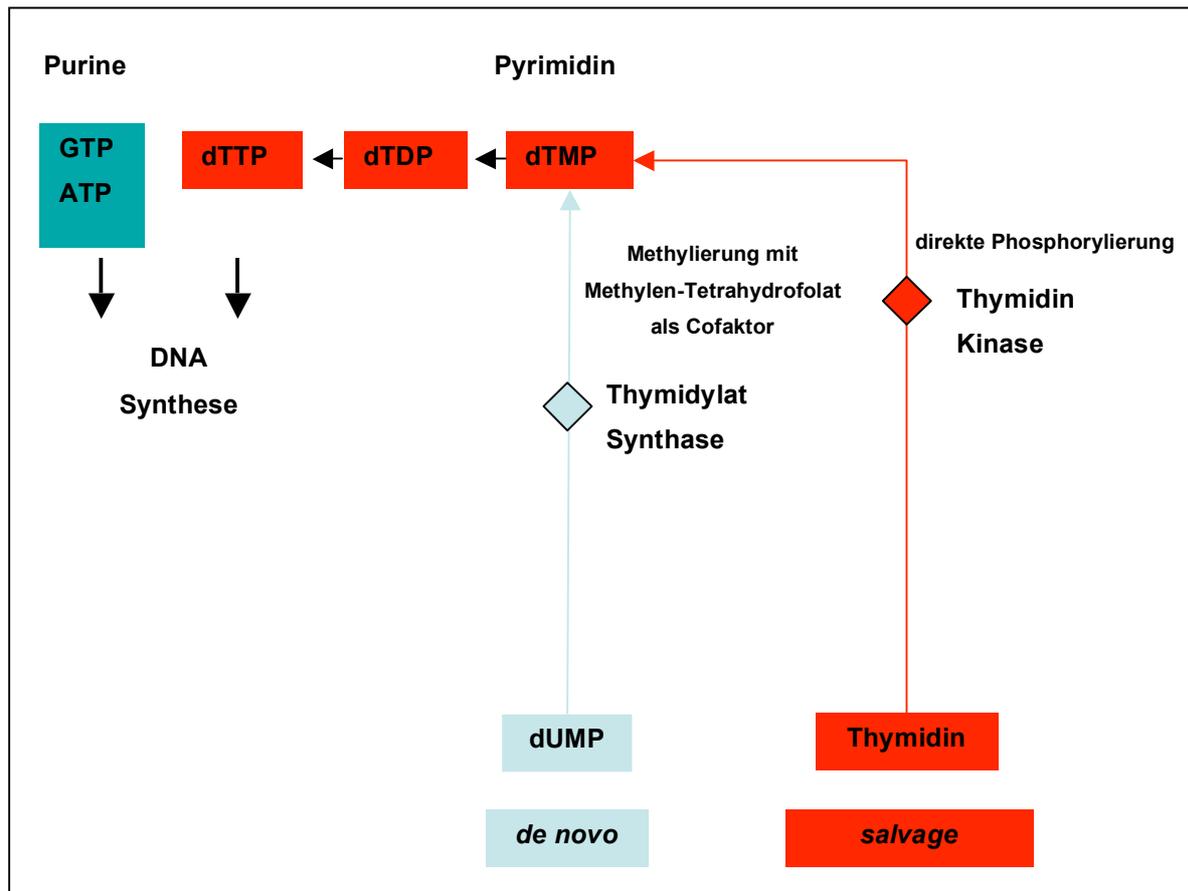


Abb. 22
Pyrimidinsynthese im *salvage* Stoffwechsel

Eine phylogenetische Analyse der Nukleotid-Biosynthese bei den *Apicomplexa* demonstrierte, dass die Thymidin Kinase hier nur in *Cryptosporidium parvum* vorkommt, aber nicht in Theilerien (*T. annulata*), *T. gondii* und *P. falciparum* (Strieppen, Pruijssers et al. 2004). Im Gegensatz zu *C. parvum* wurden für verwandte Mitglieder der Apicomplexa (*T. annulata*, *T. gondii*, *P. falciparum*) alle Gene für die *de novo* Pyrimidin Synthese gefunden. Es wird deshalb vermutet, dass der Verlust der Pyrimidin *de novo* Synthese bei *C. parvum* durch die drei Enzyme des Pyrimidin *salvage* Stoffwechsels Thymidin Kinase, UPRT und UK-UPRT (Uridin Kinase-Uracil-Phosphotransferase) kompensiert wird (Strieppen, Pruijssers et al. 2004).

Desweiteren wurde, wie bereits unter 3.3.1 erwähnt, bei *D. discoideum* eine TK1 identifiziert, die eine Calmodulin-Bindungsstelle enthält (O'Day, Chatterjee-Chakraborty et al. 2005). Auch bei *Ureaplasma urealyticum* wurde eine TK1 identifiziert und die Funktionalität des Enzyms nachgewiesen (Carnrot, Wehelie et al. 2003).

4.2.1 Analyse der Aminosäuresequenz von *LdTK*

Nach dem Vergleich der Aminosäuresequenzen muss die hier beschriebene Thymidin Kinase der Leishmanien den Typ II Thymidin Kinasen zugeordnet werden. In Anlehnung an die in der Literatur verwendete Nomenklatur für Thymidin Kinasen (Gentry 1992; Arner and Eriksson 1995; Birringer, Claus et al. 2005), wird deshalb der Name *Leishmania* Thymidin Kinase 1 vorgeschlagen; daraus folgen die Bezeichnungen *LdTK1* und *LmTK1*.

Die *LdTK1* weist alle für die Typ II Kinasen bekannten konservierten Motive auf. Bei *LdTK1* und *LmTK1* sind die Sequenzen dieser Motive identisch.

Bei der Analyse der AS-Sequenz der *LdTK* im Vergleich mit anderen Typ II Thymidin Kinasen (Abb. 6 B) ist aufgefallen, dass in der konservierten Sequenz, welche die Bindung der γ -phosphoryl-Gruppe des Phosphatdonors vermittelt (Biringner, Claus et al. 2005), an zwei Positionen Serin durch Alanin bzw. Threonin ausgetauscht wurde. Serin ist bei vielen Enzymen Teil des katalytischen Zentrums und kann mit Phosphat eine Esterbindung ausbilden. Die ausgetauschten Aminosäuren ähneln sich insofern, als dass Serin formal einem hydroxylierten Alanin entspricht. Alanin ist allerdings hydrophob und nicht hydrophil. Threonin ist ähnlich wie Serin hydroxyliert und dadurch ebenfalls hydrophil. Alle drei Aminosäuren sind ungeladen. Bei der TK des Protozoen *E. histolytica* ist nur das zweite Serin durch Threonin ersetzt. Die *Ureaplasma urealyticum* TK (Carnrot, Wehelie et al. 2003) ist in diesem Motiv identisch zur Leishmanien und Trypanosomen TK (Daten nicht gezeigt). An Studien der rekombinant exprimierten *UuTK* wurde gezeigt, dass das rekombinante Enzym sowohl Thymidin (dThd) als auch Desoxy-Uridin (dUrd) sowie eine Reihe von Pyrimidin-Nukleosid-Analoga phosphorylieren kann und dass alle Nukleosidtriphosphate außer dTTP als Phosphatdonoren dienen (Carnrot, Wehelie et al. 2003). Der Austausch dieser zwei Aminosäuren hat also sehr wahrscheinlich keine Auswirkung auf die Fähigkeit der *Leishmania* TK, die Bindung der γ -phosphoryl-Gruppe des Phosphatdonors zu vermitteln.

Für die TK von *T. brucei* wurde gezeigt, dass für das Enzym neben Thymidin 5-Iod-2'-deoxyuridin (IUrd), 5-trifluorothymidin (F3-Thd), 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FUrd), 2'-deoxyuridin (dUrd) und Uridin (UR) als kompetitive Substrate dienen und das dTTP als *feedback* Inhibitor wirkt (Chello and Jaffe 1972). Die TK1 verschiedener Organismen (siehe

auch 4.2) haben also die gleichen Eigenschaften. Aufgrund der Sequenz-Homologie insbesondere bei den funktionellen Motiven, der *Leishmania* TK1 im Vergleich zu den anderen Thymidin Kinasen (s. Abb. 6 B) ist anzunehmen, dass dieses Enzym ebenfalls annähernd die gleichen Eigenschaften hat, wie die anderen Mitglieder derselben Subfamilie. Veränderungen in der Sequenz könnten dennoch Auswirkungen haben; beispielsweise auf die Effizienz, mit der das Enzym verschiedene Substrate (Thymidin-Analoga) umsetzen kann, auch auf das pH-Optimum oder die Hitze-Stabilität. Die TK verschiedener Organismen unterscheiden sich in diesen Parametern (Grobner 1979; Jaffe, Comley et al. 1982; Terent'ev, Terent'eva et al. 1990).

Im Gegensatz zur hohen Konservierung der in 3.3.1 beschriebenen Sequenzmotive, unterscheiden sich die Typ II Kinasen verschiedener Organismen im C-Terminus erheblich (s. Abb. 6 B). An Mutanten einer Maus-Zelllinie, die mit verschiedenen Varianten der am C-terminus gekürzten *hTK1* transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die letzten 40 C-terminalen Aminosäuren essentiell sind für die Degradation des Enzyms während der Mitose (Kauffman and Kelly 1991). Es wurde auch gezeigt, dass weder Introns noch die 3'-UTR eine Rolle spielen bei der Regulation der *hTK1* im Zellzyklus (Kauffman and Kelly 1991). Diese Region ist bei der *LmTK1* und *LdTK1* nicht konserviert, der C-Terminus ist länger als bei der *hTK1*. Auch der C-Terminus der Trypanosomen TK ist länger als bei der *hTK1*. Die Differenzen im C-Terminus der Thymidin Kinasen könnten ein Indiz dafür sein, dass sie auf unterschiedliche Weise während des Zellzyklus reguliert werden (Carnrot, Wehelie et al. 2003).

4.2.2 Expressionsmuster der *LdTK* und Lokalisierung des Proteins im Cytosol

Im Western Blot ist eine Zunahme der Proteinmenge während der Stadiendifferenzierung von Promastigoten zu Amastigoten zu verzeichnen. Auch in den EM-Aufnahmen war ein etwa dreifach erhöhtes Signal mit dem Thymidin Kinase-Antikörper in den Amastigoten gegenüber den Promastigoten zu detektieren. Wie erwartet, wurde die *L. donovani* TK1 im Cytoplasma detektiert, da es sich bei den Typ II Thymidin Kinasen um cytosolische Proteine handelt (Arner and Eriksson 1995; Birringer, Claus et al. 2005).

Bei *Mammalia* Zellen sind mRNA-Menge, Protein-Menge und Enzym-Aktivität der TK1 während des Zellzyklus reguliert. Die Aktivität der TK1 bleibt aus oder ist sehr gering in

ruhenden Zellen; sie tritt in der späten G1-Phase auf und steigt an in der S-Phase (zusammen mit dem Anstieg der DNA-Synthese) und verschwindet wieder während der Mitose (Bello 1974; Munch-Petersen and Tyrsted 1977; Ke and Chang 2004). Studien an der humanen TK1 zeigten, dass die Veränderung der Aktivität während des Zellzyklus auf unterschiedliche Mengen des TK Proteins zurückzuführen ist. Die *hTK1* ist post-transkriptionell durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert (Kauffman and Kelly 1991). Erstens ist die Syntheserate der *hTK1* während der S-Phase 10mal höher als in der G1-Phase (Sherley and Kelly 1988). Der Anstieg der *hTK1*-Synthese während der S-Phase ist nicht begleitet von einer proportionalen Zunahme der mRNA. Während die Proteinmenge zwischen G1- und M-Phase um das 15- bis 25-fache ansteigt, erhöht sich die mRNA-Menge nur um weniger als das 2-fache (Sherley and Kelly 1988; Kauffman, Noga et al. 1990). Zweitens kommt es in der frühen G1-Phase zu einer schnellen Degradation der *hTK1* (Kauffman and Kelly 1991).

Dass auch für die *L. donovani* TK1 im Northern Blot keine Veränderung der mRNA-Menge, während der Stadiendifferenzierung, jedoch eine Proteinzunahme im Western Blot detektiert wurde, könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch die *LdTK1* post-transkriptionell reguliert wird.

Eine differentielle Expression der Thymidin Kinase wurde bei dem Myxomyceten *Physarum polycephalum* beschrieben (Grobner 1979; Grobner and Loidl 1982; Grobner and Loidl 1983). In allen proliferierenden Stadien (Microplasmodia, Macroplasmodia, germinierende Microsclerotia und germinierende Sporen) ist bezüglich der Aktivität die Thymidin Kinase das dominierende Enzym, wohingegen in den ruhenden Stadien (Microsclerotia, Sporangia, Sporen) die Thymidylate Synthase (TS) das dominante Enzym ist (Grobner and Loidl 1983). Die Ergebnisse der Studien an *Physarum polycephalum* zeigten, dass die TS das Basis-Enzym für die dTMP Produktion während aller Differenzierungsstadien ist, wohingegen die TK involviert wird, sofern sie benötigt wird, und so ein zusätzliches Potential für die dTMP Synthese während der schnellen Proliferation gewährt (Grobner and Loidl 1983).

In *L. major* wurde die Thymidylat Synthase (TS) als bifunktionales Enzym TS-DHFR (DHFR=Dihydrofolat-Reduktase) umfassend beschrieben, wie auch bei den Protozoen *Plasmodium* und *Crithidia* (Ivanetich and Santi 1990). Dass die Leishmanien auch die TS-DHFR besitzen und so Pyrimidine *de novo* synthetisieren können, steht also nicht im Widerspruch zur Präsenz einer Thymidin Kinase. Da die Thymidin Kinase in den

Promastigoten nur sehr schwach exprimiert wird, ist anzunehmen, dass in diesem Stadium der Pyrimidin-Bedarf hauptsächlich über den *de novo*-Syntheseweg gedeckt wird. Die in dieser Arbeit gezeigte Zunahme der TK in den Amastigoten ist ein Hinweis dafür, dass die Leishmanien beim Wirtswechsel, möglicherweise als Anpassung an die neue Umgebung, bei der Pyrimidin-Synthese eine Verlagerung vom *de novo*- zum *salvage*-Weg vornehmen. Dies ist vorstellbar durch das beim Wirtswechsel sich verändernde Angebot der Substrate. Die intrazellulär lebenden Amastigoten können auf die beim Abbau der DNA ihrer Wirtszelle anfallenden Nukleoside (u.a. Thymidin) zurückgreifen, die über Transporter ins Cytosol gelangen (Burchmore and Barrett 2001; Nyalwidhe, Maier et al. 2003).

Aufgrund ihrer entscheidenden Funktion im alternativen *salvage*-Stoffwechsel der Pyrimidin-Synthese bei akutem oder pathologischem Zell-/Gewebe-Stress wird die TK1 als Marker in der Krebs-Diagnostik eingesetzt (Foekens, Romain et al. 2001). Da die TK1 in die DNA-Synthese involviert ist, ist sie ein Proliferations-abhängiges Enzym. Bei verschiedenen Krebs-Arten korreliert die TK1-Serumkonzentration (STK1) mit der Ausprägung der Symptome. Beim Blasen-Karzinom steigt die STK1 signifikant mit dem Tumor-Stadium (I-III) und der Metastasierung an (Zhang, Jia et al. 2006). Bei Brust-Krebs wird die Expression der cytosolischen Thymidin Kinase TK1 und deren Aktivität als Proliferations-Marker ermittelt (Romain, Christensen et al. 1995; Foekens, Romain et al. 2001).

Für das *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), das Shrimps befällt, wurde ein Gen identifiziert, das für ein 388 AS großes Protein kodiert, welches die funktionellen Motive einer Thymidin (TK) Kinase und einer Thymidylat Kinase (TMK) aufweist. Bereits 4 Stunden nach Infektion adulter *Penaeus monodon* Shrimps mit dem WSS Virus konnten die *tk-tmk*-Transkripte mittels RT-PCR nachgewiesen werden und die Transkriptmenge war 18 Stunden nach der Infektion kontinuierlich zunehmend (Tsai, Yu et al. 2000).

Das im Vergleich zu den Promastigoten etwa 3fach verstärkte Signal der *LdTK* im Western Blot nach dem Hitzschock und im weiteren Verlauf der Umwandlung zu Amastigoten kann als Marker bei der *in vitro* Stadiendifferenzierung gesehen werden.

4.2.3 Generierung einer Δtk -Mutante

Bisher wurde der *knockout* einer Thymidin Kinase in Trypanosomen nicht beschrieben. Nach dem derzeitigen Stand der Literatur wurde ein *knockout* einer Typ II Thymidin Kinase (TK1) lediglich an Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen mit *tk*^{-/-} *knockout* Mäusen zeigten, wie essentiell die Funktion der cytosolischen TK1 ist. Mäuse, denen das *tk*-Gen fehlte, waren zwar lebensfähig, hatten aber ein abnormes Immunsystem, entwickelten schwere Nieren-Komplikationen und zeigten erhöhte Mutationsraten. Keines der Tiere lebte länger als ein Jahr (Dobrovolsky, Bucci et al. 2003).

Der in 3.3.5 beschriebene Versuch, einen *knockout* des *tk*-Gens in *L. donovani* zu erzeugen, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es war nicht möglich, mit den aus *L. major* abgeleiteten Oligonukleotiden das entsprechende Fragment der 3'-UTR von *L. donovani* zu amplifizieren. Vermutlich waren die gewählten Sequenzen zu unterschiedlich, so dass die Anlagerung an die DNA nicht erfolgen konnte. Krobitch und Clos zeigten, dass es grundsätzlich möglich ist, mit Sequenzen aus *L. major* ein Rekombinationsereignis in *L. donovani* auszulösen (Krobitch and Clos 2000). Nach Transfektion von promastigoten *L. donovani* Zellen mit den aus *L. major* amplifizierten Konstrukten, konnten trotz mehrfacher Versuche keine viablen Zellen erzeugt werden. Ob in diesem Fall die Sequenzunterschiede zwischen *L. donovani* und *L. major* zu groß waren oder ob für die *L. donovani* Zellen bereits der Austausch eines Allels des *tk*-Gens durch die Neomycinphosphotransferase zu Letalität geführt hatte, blieb ungeklärt.

Um die Funktion der Thymidin Kinase in Leishmanien trotzdem untersuchen zu können, wurden deshalb alternativ *L. major* Promastigote mit den aus *L. major* amplifizierten Konstrukten transfiziert und es gelang hierbei, ein Rekombinationsereignis in dem entsprechenden Genlokus hervorzurufen. Nach fünf unabhängigen Transfektionsexperimenten konnte nur ein Klon (C8) selektiert werden, für den eine Southern-Blot-Analyse den Austausch eines der beiden *tk*-Allele bestätigte. In einer weiteren Transfektionsrunde wurde das zweite *tk*-Allel durch einen weiteren Selektionsmarker ausgetauscht. In einer PCR-Analyse wurde das Fehlen des *tk*-Gens demonstriert. Der Austausch des zweiten *tk*-Allels wurde in drei unabhängigen Transfektionsexperimenten wiederholt, wobei 15 unabhängige *Lm* Δtk -Klone generiert wurden, die alle denselben

Phänotyp zeigten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp der *LmΔtk*-Mutanten auf den Verlust des *tk*-Gens zurückzuführen ist.

4.2.4 Phänotypische Veränderungen der *Δtk*-Mutanten

4.2.4.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die nach der ersten Transfektionsrunde selektierten $\Delta LmTK^{+/n}$ Zellen (C8-Klon) waren im Wachstumsverhalten unauffällig, jedoch konnte kein Protein mehr nachgewiesen werden. Die in Promastigoten ohnehin schwache Expression des *tk*-Gens war offenbar bereits durch Ausschalten eines Allels so weit herabgesetzt, dass im Western Blot die Nachweisgrenze unterschritten wurde. Der C8-Klon zeigte jedoch eine Auffälligkeit bezüglich der Flagellenlänge. Mehr als die Hälfte (55%) der Population hatte wesentlich längere Flagellen als der WT. Unlängst wurde bei *L. mexicana* das MAP Kinase Homolog *LmxMPK9* identifiziert (Bengs, Scholz et al. 2005). Die aus der Deletion des *LmxMPK9* Gens resultierende Mutante zeigte signifikant längere Flagellen. Deshalb wird vermutet, dass diese Kinase eine Rolle bei der Flagellen-Morphogenese spielt (Bengs, Scholz et al. 2005). Nach den hier beschriebenen Ergebnissen scheint auch die Thymidin Kinase an der Morphogenese der Flagellen beteiligt zu sein. Die Beantwortung der Frage, in welcher Weise die TK darin direkt oder indirekt involviert sein könnte, sollte das Ziel weiterer Studien sein.

Nachdem auch das zweite *tk*-Allel des C8-Klons gegen einen weiteren Selektionsmarker ausgetauscht worden war, veränderte sich der Phänotyp der Transfektanten drastisch. Die *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten waren nicht spindelförmig, wie der Wildtyp und die Ein-Allel-Deletions-Mutante, sondern zeigten eher abgerundete Zellen. Sie hatten die Tendenz, sich in Kultur aneinander zu lagern, wie axenische Amastigote. Die *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten besaßen in der Regel ein Flagellum, wobei die Flagellen-Länge der Null-Mutante im Gegensatz zur Ein-Allel-Deletions-Mutante durchschnittlich geringer war als beim WT ($Lm\Delta tk^{p/n} = 8,6 \mu\text{m}$ im Vergleich zu WT = 12,36 μm). Es wurden jedoch auch Zellen ohne Flagellum beobachtet (ca. 10% der Population). Diese untypische Zellform der *LmΔtk^{p/n}*-Zellen konnte in der rasterelektronischen Analyse dargestellt werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Kohl und Mitarbeiter bei *T. brucei* Mutanten, bei denen die Expression von Genen zweier am IFT beteiligter Proteine durch RNA-Interferenz (RNAi) ausgeschaltet wurde (Kohl, Robinson et al. 2003). Beim *TbDHC1b* handelt es sich um ein Motor-Protein und beim *TbIFT88* um ein

im IFT involvierten Cargo-Protein. Aufbau und Erhaltung eukaryotischer Flagellen sind abhängig von einem als *intraflagellar transport* (IFT) bezeichneten Transportsystem. Einige dieser RNAi-Mutanten zeigten verkürzte Flagellen, was den Einfluss des IFT auf die Flagellenlänge demonstrierte. Interessanterweise ging bei den *T. brucei* Mutanten die Verkürzung der Flagellen mit weiteren morphologischen Veränderungen einher. Zellen mit kürzerem Flagellum waren kleiner als der Wildtyp und es wurde eine lineare Beziehung zwischen Flagellenlänge und Zellgröße aufgezeigt. Außerdem entstanden Mutanten ohne Flagellen, die gleichzeitig kürzer als der WT waren, zudem Form und Polarität verloren hatten und nicht teilungsfähig waren (Kohl, Robinson et al. 2003).

Bei *Chlamydomonas* wurde gezeigt, dass die Stabilität des Axonems und die Erhaltung der Flagellenlänge vom IFT abhängig sind (Silflow and Lefebvre 2001). In wiefern sich der Verlust des *tk*-Gens bei *L. major* auf den IFT auswirkt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

Wiese und Mitarbeiter zeigten, dass bei *L. mexicana* eine MAP-Kinase-Kinase (MKK) an der Regulation der Flagellenlänge promastigoter Zellen beteiligt ist (Wiese, Kuhn et al. 2003). Die MKK wird Promastigoten-spezifisch exprimiert und die Deletion des Gens resultierte in einer verminderten Flagellenlänge (Wiese, Kuhn et al. 2003). Wie zuvor erwähnt, hat auch das MAP Kinase Homolog *LmxMPK9* einen Einfluss auf die Morphogenese des Flagellums bei *L. mexicana*: Die Deletion dieses Gens, das für ein Promastigoten-spezifisches Protein kodiert, führte zur Ausbildung längerer Flagellen, wohingegen die Überexpression des Gens Mutanten hervorbrachte, die ein sehr kurzes oder kein Flagellum hatten (Bengs, Scholz et al. 2005).

Dafür, dass die Deletion eines *tk*-Allels zu längeren Flagellen, aber die Deletion beider Allele des *tk*-Gens zu kürzeren Flagellen im Verhältnis zu WT-Flagellen führt, gibt es bis jetzt keine Erklärung. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der *Leishmania* TK um ein Amastigoten-spezifisches Protein handelt, ist bisher nicht nachvollziehbar, weshalb die Deletion des Gens in Promastigoten solche gravierenden Auswirkungen auf den Phänotyp hat. Es gibt bisher keine gesicherten Erkenntnisse darüber, wie die Länge der Flagellen in begeißelten Organismen reguliert wird. Aus Studien an *Chlamydomonas* ergaben sich Hinweise auf die Präsenz klassischer Signaltransduktionswege und es wurden mehr als 80 phosphorylierte Proteine in den Flagellen von *Chlamydomonas* identifiziert (Piperno, Huang

et al. 1981; Tuxhorn, Daise et al. 1998). Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass Kinasen an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt sind.

Im Wachstumsverhalten unterschieden sich die $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Mutanten maßgeblich vom WT und von der Ein-Allel-Deletions-Mutante $Lm\Delta tk^{+/n}$. Die $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Zellen waren offenbar nur zu einer extrem eingeschränkten Vermehrung in der Lage. Es scheint also ein Zusammenhang zwischen Zellform, Flagellenlänge und Teilungsvermögen zu bestehen. Wie bereits erwähnt, wurde auch bei *T. brucei*-Mutanten ein Zusammenhang zwischen verkürzten, bzw. fehlenden Flagellen und eingeschränkter Teilungsfähigkeit festgestellt (Kohl, Robinson et al. 2003). Wie zuvor in 3.3.7.5 beschrieben, kam es bei einigen $Lm\Delta tk^{p/n}$ -Klonen zum plötzlichen Absterben der gesamten Zellpopulation, nachdem sie mehrere Wochen unter Antibiotikaselektion vital waren. Dies ist möglicherweise auf eine zusätzliche Veränderung durch eine sekundäre Mutation im Genom zurückzuführen. In dem einzigen dokumentierten Versuch eines (Typ II) TK-*knockouts* in Mäusen (Dobrovolsky, Bucci et al. 2003) wurden erhöhte Mutationsraten unter Deletion des *tk*-Gens beschrieben.

Nishino und Mitarbeiter stellten fest, dass so genannte *loss-of-function* Mutationen der Thymidin Phosphorylase, die den Verlust der Enzym-Funktion bedeuten, für einen Gendefekt verantwortlich sind, der mit Veränderungen mitochondrialer DNA einhergeht (Nishino, Spinazzola et al. 2001). Die Thymidin Phosphorylase ist für die Spaltung von Thymidin zu Thymin verantwortlich. Da die Patienten im Vergleich zu Kontrollen 20-fach erhöhte Thymidin-Plasma-Werte aufwiesen, postulierten sie, dass die Zunahme des Thymidins einen unbalancierten mitochondrialen Nukleotid-*Pool* verursacht, was zu Veränderungen der mitochondrialen DNA führt (Nishino, Spinazzola et al. 2001). Es wäre denkbar, dass auch die Deletion der Thymidin Kinase in den Leishmanien zur intrazellulären Akkumulation von Thymidin führt, da es nicht mehr zu dTMP phosphoryliert werden kann. Dies hätte dann vermutlich auch eine Disbalance der dTTP-*Pools* in Cytosol und Mitochondrium und so möglicherweise Veränderungen der DNA zur Folge.

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob die Expression einer episomalen *tk*-Genkopie in den Δtk -Zellen den ursprünglichen Phänotyp der Mutanten wiederherstellen könnte. Mit Hilfe des in 3.3.6 beschriebenen Vektors pX63polPHLEO:*ldtk* wurde sowohl in den *Lm*WT-Zellen, als auch in der Ein-Allel-Deletions-Mutante *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ eine Überexpression der Thymidin Kinase hervorgerufen. In der *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -Mutante konnte das Protein nun wieder nachgewiesen werden.

Die Transfektion des Wildtyps mit dem Vektor pX63polPHLEO:*ldtk* hatte keinen Einfluss auf die Wachstumsrate. Die mit pX63polPHLEO:*ldtk* transfizierte *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -Mutante (Klon C8) zeigte in der spät-logarithmischen Wachstumsphase eine Steigerung des Wachstums im Vergleich zu der mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -Mutante (siehe Abb.11). Der Verlust des einen *tk*-Allels im Genom wurde offenbar durch die Überexpression der episomalen *tk*-Genkopie kompensiert. Die Teilungsrate erreichte jedoch nicht dasselbe Niveau, wie bei der zur Kontrolle mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten WT-Zelllinie. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die TK, wenn sie im Genom exprimiert wird, noch post-translationellen Modifikationen unterliegt, die bei episomaler Expression ausbleiben oder unvollständig sind.

Die mit pX63polPHLEO:*ldtk* transfizierte *Lm* $\Delta tk^{+/n}$ -Mutante zeigte nicht mehr die auffällig langen Flagellen der Ein-Allel-Deletions-Mutante. Bei mikroskopischer Betrachtung entsprach die Flagellenlänge der rekonstituierten Mutante der des Wildtyps. Weder in *L. major* WT- noch in *L. donovani* WT-Zellen hatte die Überexpression des *tk*-Gens mittels des Vektors pX63polPHLEO:*ldtk* einen Einfluss auf die Flagellenlänge (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits angeführt, brachte bei *L. mexicana* die Deletion des Gens *LmxMPK9* Mutanten mit längeren Flagellen hervor (Bengs, Scholz et al. 2005). Die episomale Komplementation mit *LmxMPK9* führte zu verschiedenen Populationen von Promastigoten: Einer mit WT Phänotyp mit normalen Flagellen und einer zweiten Population, deren Zellen ein sehr kurzes oder gar kein Flagellum hatten (Bengs, Scholz et al. 2005). Es stellte sich durch Western Blot Analysen heraus, dass in Zellen mit kurzen Flagellen *LmxMPK9* überexprimiert wurde. Dieses Ergebnis wurde derart interpretiert, dass *LmxMPK9* die Flagellenlängen-Kontrolle durch Induzierung der Flagellen-Verkürzung beeinflusst (Bengs, Scholz et al. 2005).

Auch die *LmΔtk^{p/n}*-Mutante wurde mit dem Vektor pX63pol:TK transfiziert. 2-3 Tage nach der Transfektion waren jedoch alle Zellen eines Ansatzes abgestorben. Es ist unwahrscheinlich, dass dies auf technische Ursachen im Transfektionsexperiment zurückzuführen ist, da alle anderen beschriebenen Transfektionen erfolgreich waren. Es ist eher zu vermuten, dass die *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten durch die Deletion des *tk*-Gens bereits derart gestresst waren, dass sie weitere Stressfaktoren, wie Kälteschock und Elektroporation nicht kompensieren konnten.

Um herauszufinden, ob die Thymidin Kinase, bzw. das Fehlen derselben, einen Einfluss auf die Stadiendifferenzierung hat, sollte ursprünglich eine *in vitro* Stadiendifferenzierung mit *L. donovani* Δtk -Deletions-Mutanten durchgeführt werden. Im Unterschied zu *L. donovani* kann *L. major* jedoch nicht *in vitro* zu Amastigoten differenziert werden. Mit den *L. major* Δtk -Zellen hätte lediglich *in vivo* im Mausmodell untersucht werden können, ob die promastigoten *LmΔtk*-Zellen zur Infektion und zur Differenzierung zu Amastigoten in der Lage gewesen wären. Aus ethischen Gründen wurde auf diesen Versuch verzichtet. Das Infektionsvermögen der Δtk -Deletions-Mutanten bei einer *in vitro* Infektion an peritonealen Exsudatzellen wird unter 4.2.4.4 diskutiert.

Die Überexpression des *ldtk*-Gens mittels des Vektors pX63polPHLEO:*ldtk* hatte bei *in vitro* differenzierten *L. donovani* Zellen keinen Einfluss auf die Synthese der Amastigotenspezifischen A2-Proteine und das Hitzeschockprotein HSP100 (Daten nicht gezeigt).

4.2.4.2 Die Aktivität der Thymidin Kinase in *LmΔtk*-Mutanten:

- Der Bromid-Uridin-Assay -

Bromid-Uridin (BrdUrd) wird als Thymidin-Analogon in einer Thymidin Kinase-abhängigen Reaktion zum Nukleotid phosphoryliert und während der S-Phase der Zellen in die DNA eingebaut. Der Einbau kann *in situ* mittels eines BrdUrd-spezifischen monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden (Boccardo, Redoglio et al. 1986). Striepen und Mitarbeiter demonstrierten anhand des TK-BrdUrd-Assays die Präsenz der Thymidin Kinase bei *Cryptosporidium parvum* (Striepen, Pruijssers et al. 2004).

Das deutliche Signal des BrdUrd-spezifischen Antikörpers im *L. major* Wildtyp zeigt, dass diese Zellen eine enzymatisch aktive Typ II Thymidin Kinase besitzen. Wie nach den EM-Bildern der Lokalisierungs-Analyse zu erwarten war (Abb. 7), ist die Färbung im gesamten Cytoplasma zu detektieren. Im Cytoplasma wird das BrdUrd durch die Thymidin Kinase zunächst zum Nukleosidmonophosphat phosphoryliert. Durch weitere Phosphorylierung im Cytosol entstehen BrdUDP und BrdUTP für den cytosolischen dTTP-Pool, welches schließlich statt des dTTP im Kern in die DNA eingebaut werden kann. Bei den *Lm*WT Promastigoten ist das Signal im Kern, im Verhältnis zum Signal im Cytoplasma, sehr schwach. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von LaFon und Mitarbeitern, die mit radiomarkierten Isotopen bei promastigoten Leishmanien zeigten, dass nur 0,4% des metabolisierten ¹⁴C-Thymidins in die DNA inkorporiert wurde (LaFon, Nelson et al. 1982). Dies zeigt, dass die Promastigoten zwar den *salvage* Weg bestreiten können, aber vermutlich hauptsächlich den *de novo* Weg nutzen.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits durch das Fehlen eines Allels des *tk*-Gens in *L. major* im Vergleich zum Wildtyp wesentlich weniger Moleküle des Bromid-Uridins im Cytoplasma phosphoryliert werden, was ein dementsprechend schwächeres Antikörper-Signal zur Folge hat. Bei den *LmΔtk*-Null-Mutanten konnte erwartungsgemäß kein spezifisches Signal des BrdUrd-Antikörpers mehr detektiert werden. Durch den Verlust des Thymidin Kinase-Gens waren die *LmΔtk^{p/n}*-Mutanten offensichtlich nicht mehr in der Lage, das Bromid-Uridin zu phosphorylieren.

Für *Mammalia* Zellen gilt, dass Nukleoside, die durch die im Cytosol lokalisierte TK1 phosphoryliert werden, hauptsächlich Vorstufen für die nukleäre DNA bilden. Die mittels der mitochondrialen TK2 phosphorylierten Nukleoside werden dagegen fast ausschließlich in die mitochondriale mtDNA eingebaut (Arner and Eriksson 1995). Dies erklärt möglicherweise, dass zwar im Kern der promastigoten Leishmanien ein Signal detektiert wurde, jedoch kaum im Kinetoplasten. Es ist bis jetzt weder für Leishmanien, noch für Trypanosomen eine mitochondriale TK2 bekannt. An Maus-Zellen, denen die cytosolische TK fehlt, wurde gezeigt, dass sie exogenes Thymidin, bzw. BrdUrd in ihre mtDNA, jedoch nicht in die nukleäre DNA inkorporieren können (Clayton and Teplitz 1972). In einer Elektronenmikroskopische Analyse ist das Signal für den BrdUrd-Antikörper nur in den Mitochondrien zu detektieren (Clayton and Teplitz 1972). Da in den *LmΔtk*-Null-Mutanten (*LmΔtk^{p/n}*) kein Signal im Mitochondrium, bzw. Kinetoplasten detektiert wurde, ist anzunehmen, dass *L. major* keine zweite Thymidin Kinase besitzt. Für *Mammalia* Zellen wurde gezeigt, dass ein schneller Austausch zwischen cytosolischem und mitochondrialem dTTP-Pool stattfinden kann (Pontarin, Gallinaro et al. 2003). Bei Trypanosomatiden wurde dies bisher nicht untersucht.

4.2.4.3 Intrazelluläre Lokalisierung der TK in *LmΔtk*-Mutanten

Die Thymidin Kinase wurde erwartungsgemäß im Cytoplasma lokalisiert. Wie die Elektronenmikroskopische Analyse zeigte, führt das Fehlen eines Allels der TK dazu, dass die TK-Proteine im Cytoplasma der *LmΔtk^{+/n}*-Mutanten zu distinkten Gruppen akkumulieren, wohingegen die TK-Proteine in den WT-Promastigoten diffus im gesamten Cytoplasma verteilt vorlagen. Auch in WT-Amastigoten lagen die Proteine eher näher beieinander, allerdings nicht in so scharf abgegrenzten Gruppen, wie bei der *LmΔtk^{+/n}*-Mutante. Ein solches Verteilungsmuster im Cytosol wurde für eine Thymidin Kinase bisher nicht beschrieben.

4.2.4.4 *In vitro* Infektion peritonealer Exsudat Zellen

Die Infektiosität der Ein-Allel-*knockout*-Mutante war gegenüber dem Wildtyp bereits nach 24 Stunden um die Hälfte geringer und 48 Stunden nach der Infektion noch deutlicher vermindert: Nur 22% der Makrophagen wurden von den Mutanten befallen, wohingegen beim WT 78% der Makrophagen infiziert waren. Die mit dem Überexpressionsvektor transfizierte Ein-Allel-Deletions-Mutante zeigte gegenüber der untransfizierten Mutante $Lm\Delta tk^{n/+}$ eine um 17% gesteigerte Infektiosität. Auffallend war, dass bei der $Lm\Delta tk^{n/+}$ -Mutante die Anzahl der invadierten Zellen pro Makrophage wesentlich geringer war als beim WT. Dieses Ergebnis zeigte sich an allen untersuchten Zeitpunkten (24, 48, 72 Stunden), wobei es sich jeweils um unabhängige Ansätze handelte. Damit ist die Ansicht begründet, dass die Deletions-Mutante $Lm\Delta tk^{n/+}$ in der Tat in geringerem Umfang in der Lage ist, Makrophagen zu infizieren. Viele der $Lm\Delta tk^{n/+}$ -Mutanten hafteten an den Zielzellen, waren aber offenbar nicht in der Lage, zu invadieren. Die rekonstituierten Mutanten zeigten wiederum ein Verhalten ähnlich dem des Wildtyps. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die TK einen Einfluss auf das Infektionsvermögen der Leishmanien hat. Auch die $Lm\Delta tk^{n/p}$ -Deletions-Mutante wurde in dem Infektionsexperiment eingesetzt und die mikroskopische Untersuchung ergab, dass diese Mutanten kaum in der Lage waren, die Wirtszellen zu invadieren.

Es wird vermutet, dass die verschiedenen *Leishmania* Spezies unterschiedliche Moleküle und Strategien einsetzen, um den Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu entgehen (Turco, Spath et al. 2001). Bei *L. mexicana* hatte die Deletion der MKK verkürzte Flagellen in der Null-Mutante zur Folge. Eine Infektion mit diesen Mutanten in BALB/c Mäusen verursachte Läsionen, aber erst mit großer zeitlicher Verzögerung (Wiese, Kuhn et al. 2003). Es wurde also auch ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen eines am Flagellenaufbau beteiligten Gens und einer veränderten Infektiosität des Parasiten gezeigt.

Die Metalloproteinase GP63 und verschiedene Phosphoglykane sind die Hauptoberflächenmoleküle, welche in die Makrophagen-Bindung der Promastigoten involviert sind (Alexander and Russell 1992). Die *L. major* und *L. donovani* Lipophosphoglykane (LPG) spielen vermutlich eine Rolle bei der Inhibierung der Fusion von Phagosom und Lysosom (Beverley and Turco 1998; Alexander, Satoskar et al. 1999). Entsprechend seiner biologischen Rolle sind LPG eher in Promastigoten als in Amastigoten

vorherrschend (Nyalwidhe, Maier et al. 2003). Die LPG sind Virulenzfaktoren, die sowohl im Insektenvektor als auch im Säugerwirt für das Überleben des Parasiten essentiell sind (Handman and Goding 1985; Beverley and Turco 1998). Es wurde gezeigt, dass LPG-defiziente Parasiten avirulent sind (McNeely and Turco 1990). Auch bei den Proteinen der A2-Familie handelt es sich um Virulenzfaktoren. Parasiten, bei denen mittels RNAi die Synthese der A2-Proteine ausgeschaltet wurde, zeigten *in vitro* und *in vivo* eine verringerte Infektiosität (Zhang and Matlashewski 1997). Bei *L. donovani* wurde gezeigt, dass die Deletion des *lddc2* Gens, welches ein am Flagellenaufbau beteiligtes Protein kodiert, das Synthesemuster der A-2 Proteine während der Stadiendifferenzierung verändert (Harder 2005). Die Überexpression der *ldtk* in *L. donovani* veränderte das Synthesemuster der A2-Proteine während der Stadiendifferenzierung nicht. (Daten nicht gezeigt.) Der Einfluss auf andere Virulenzfaktoren und Wirtszellen-Interaktionsmoleküle wie LPG und GP63 wurde nicht untersucht. In Anbetracht der phänotypischen Veränderungen der *LmΔtk*-Mutanten wäre vorstellbar, dass sich, insbesondere beim LPG, welches sich auf der gesamten Zelloberfläche sowie dem Flagellum befindet, Veränderungen im Expressionsmuster finden.

Ausblick - Thymidin Kinase:

Die in diesem Teil diskutierten Ergebnisse demonstrieren den großen Einfluss der *Leishmania* Thymidin Kinase 1 auf Morphologie und Teilungsverhalten des Parasiten sowie seine Fähigkeit, Wirtszellen zu invadieren.

Bezüglich der erwähnten Calmodulin (CaM)-Bindungsregion bei der *Dictyostelium* TK1 (O'Day, Chatterjee-Chakraborty et al. 2005), wäre es interessant herauszufinden, ob auch die *LdTK* ein CaM bindendes Enzym ist. Aufgrund der Lage der CaM-Bindungsstelle ist anzunehmen, dass CaM einen Einfluss auf die Struktur der TK1 haben könnte und somit auch die Effizienz der ATP/Thymidin-Bindung beeinflusst (O'Day, Chatterjee-Chakraborty et al. 2005).

Da pH-Optimum, sowie Hitze-Stabilität des Enzyms eine wichtige Rolle bei einer eventuell unterschiedlichen Aktivität in Promastigoten und Amastigoten spielen könnten, sollten diese Parameter für die *Leishmania* TK untersucht werden.

Es wurde bereits in vielen Studien gezeigt, dass die TK in der Lage ist, verschiedene anti-virale Nukleosid-Analoga zu phosphorylieren und diese damit für den Einbau in neu synthetisierte DNA aktiviert. Deshalb sollte unbedingt die Substratspezifität der *LdTK* im Hinblick auf mögliche derartige *drug targets/ pro drugs* untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das parasitische Protozoon *Leishmania donovani*, Erreger der viszeralen Leishmaniose, zeichnet sich durch einen biphasischen Lebenszyklus aus. Das begeißelte promastigote Stadium im Insekten-Vektor (Sandmücke: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*) und das unbegeißelte amastigote Stadium in den Makrophagen des Säugetierwirtes werden durch das Blutmahl des Vektors abgegeben bzw. aufgenommen. Daraufhin erfolgt die Differenzierung in die jeweils andere Form. Für *L. donovani* ist eine *in vitro* Stadiendifferenzierung von Promastigoten zu Amastigoten möglich. Für die Differenzierung, bei der es neben morphologischen zu diversen biochemischen Veränderungen kommt, bedarf es einer fein abgestimmten Regulierung der zahlreichen beteiligten Proteine.

Bei den Leishmanien, als Mitglieder der Ordnung *Kinetoplastida*, findet Genregulation hauptsächlich auf post-transkriptioneller Ebene statt. Es ist deshalb sinnvoll und notwendig, die Veränderungen im Expressionsmuster während der Stadiendifferenzierung auf Protein-Ebene und nicht auf RNA-Ebene zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Proteomanalyse des Parasiten *L. donovani* während der Differenzierung vom promastigoten zum amastigoten Stadium durchgeführt. Dazu wurden die Proteinverteilungsmuster von *L. donovani* zu sechs verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Stadiendifferenzierung mittels 2D-Gelelektrophorese miteinander verglichen und differentiell synthetisierte Proteine identifiziert. Diese Proteine wurden mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert und die erhaltenen Peptid-Massen-*fingerprints* über Datenbanken identifiziert.

Unter Einbeziehung verschiedener pH-Gradienten in der 2D-Gelelektrophorese konnten etwa 2000 Proteine in den 2D-Gelen dargestellt werden. Bei 94 Protein-*spots* wurde im Verlauf der Stadiendifferenzierung eine Regulation beobachtet. Für 86 dieser differentiellen Proteine wurden auswertbare Peptidmassenspektren erhalten, die in 71 Fällen zu einer Identifizierung anhand von Datenbankeinträgen führten. Die identifizierten Protein-*spots* werden durch 56 verschiedene Proteinspezies repräsentiert. Ein Drittel der Proteine zeigte eine Promastigoten-spezifische und zwei Drittel zeigten eine Amastigoten-spezifische Regulation.

Anschließend wurde ein Amastigoten-spezifisches Protein näher charakterisiert. Der Peptid-Massen-fingerprint dieses Proteins zeigte eine hohe Homologie zum Genprodukt des im Zuge des *L. major* Genomprojektes identifizierten Gens einer putativen *L. major* Thymidin Kinase (TK). Aufgrund der Homologie zu *L. major* konnte das *tk*-Gen für *L. donovani* kloniert und sequenziert werden. Rekombinant exprimiertes *rLdTK* wurde zur Generierung spezifischer α -*LdTK*-Antikörper in Hühnern eingesetzt. Im Western Blot konnte die in der Proteomanalyse beobachtete Amastigoten-spezifische Regulation der hier untersuchten *L. donovani* Thymidin Kinase bestätigt werden. Es wurde eine Zunahme der Proteinmenge während der Stadiendifferenzierung von promastigoter zur amastigoter Form nachgewiesen. Die für diese Klasse der Thymidin Kinasen in anderen Organismen beschriebene Lokalisierung im Cytosol wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie Immunfluoreszenzanalysen für die *LdTK* bestätigt. Es zeigte sich, dass das Protein in Promastigoten, in deutlich geringerer Menge als bei Amastigoten, im gesamten Cytosol verteilt vorkommt und es dagegen in den Amastigoten in Gruppen akkumuliert, jedoch ohne Bezug zu einem bestimmten Zellkompartiment.

Mittels homologer Rekombination wurden *Lm Δ tk*-Deletions-Mutanten generiert, denen ein bzw. beide Allele des *tk*-Gens fehlten. Die Ein-Allel-Deletions-Mutante *Lm Δ tk^{+/n}* hatte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen durchschnittlich längere Flagellen. Im Gegensatz dazu zeigte die Null-Mutante jedoch kürzere Flagellen als der WT und zusätzlich eine abgerundete Zellform. Außerdem war hier die Zellteilungsrate stark herabgesetzt. Bei der *in vitro* Infektion peritonealer Exsudat Zellen konnte bei Inkubation mit der *Lm Δ tk^{+/n}*-Mutante eine nach 24 Stunden um 30% und nach 48 Stunden um 45% gegenüber dem Wildtyp verringerte Infektiösität gezeigt werden. Die rekonstituierte Mutante *Lm Δ tk^{+/n}rek* zeigte hinsichtlich der Anzahl der infizierten Makrophagen im Vergleich zur *Lm Δ tk^{+/n}*-Mutante keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Infektiösität. Die Auszählung der invadierten Leishmanien pro Makrophage nach 24, 48 und 72 Stunden ergab jedoch, dass das Ausschalten eines *tk*-Allels im Vergleich zum Wildtyp zu einer deutlich geringeren Anzahl invadierter Leishmanien pro Makrophage führte. Dagegen verhielt sich die rekonstituierte Mutante *Lm Δ tk^{+/n}rek* ähnlich dem Wildtyp. Für die *Lm Δ tk^{n/p}*-Mutante konnte wegen der geringen Wachstumsrate nicht genügend Zellen generiert werden, um eine repräsentative Auszählung vorzunehmen. Es wurden nur Makrophagen mit 1-2 invadierten *Lm Δ tk^{n/p}*-Zellen beobachtet. Die meisten dieser Mutanten hafteten außen an den Makrophagen.

Auf *Ld*- und *Lm*-WT-Zellen hatte die Überexpression des *Ldtk* keinen Einfluss, ebenso wenig auf die Synthese der Amastigoten-spezifischen Proteine der A2-Familie sowie HSP70, HSP90 und HSP100 in *in vitro* differenzierten *L. donovani*-Zellen. Durch eine episomale Expression von *Ldtk* in der Mutante *LmΔtk^{+/n}* konnten die phänotypischen Merkmale rekonstituiert werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die Thymidin Kinase eine wichtige Rolle bei der Infektiösität des Parasiten und der Ausprägung des für die Promastigoten typischen Phänotyps spielt.

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit liefern die Grundlagen für zukünftige Studien der mit dem Differenzierungsprozess der Leishmanien assoziierten Proteine. Die hier erfolgte Identifizierung stadienspezifischer Proteine und eine weiterführende Charakterisierung derselben können zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Wirtszell-Invasion und des Differenzierungsprozesses beitragen.

- Abele, U. and G. E. Schulz (1995). "High-resolution structures of adenylate kinase from yeast ligated with inhibitor Ap5A, showing the pathway of phosphoryl transfer." Protein Sci **4**(7): 1262-71.
- Abeliovich, H., Y. Tzfati, et al. (1993). "A trypanosomal CCHC-type zinc finger protein which binds the conserved universal sequence of kinetoplast DNA minicircles: isolation and analysis of the complete cDNA from *Crithidia fasciculata*." Mol Cell Biol **13**(12): 7766-73.
- Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." Cell **61**(7): 1157-60.
- Agami, R. and M. Shapira (1992). "Nucleotide sequence of the spliced leader RNA gene from *Leishmania mexicana amazonensis*." Nucleic Acids Res **20**(7): 1804.
- Akopyants, N. S., R. S. Matlib, et al. (2004). "Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **136**(1): 71-86.
- Albert, M. A., J. R. Haanstra, et al. (2005). "Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **280**(31): 28306-15.
- Alexander, J., G. H. Coombs, et al. (1998). "Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response." J Immunol **161**(12): 6794-801.
- Alexander, J. and D. G. Russell (1992). "The interaction of *Leishmania* species with macrophages." Adv Parasitol **31**: 175-254.
- Alexander, J., A. R. Satoskar, et al. (1999). "Leishmania species: models of intracellular parasitism." J Cell Sci **112 Pt 18**: 2993-3002.
- Almeida, R., B. J. Gilmartin, et al. (2004). "Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome." Mol Biochem Parasitol **136**(1): 87-100.
- Almeida, R., A. Norrish, et al. (2002). "From genomes to vaccines: *Leishmania* as a model." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1417): 5-11.
- Alonso, G. D., C. A. Pereira, et al. (2001). "Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity." FEBS Lett **498**(1): 22-5.
- Alvar, J., C. Canavate, et al. (1997). "Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." Clin Microbiol Rev **10**(2): 298-319.
- Aly, R., M. Argaman, et al. (1994). "A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*." Nucleic Acids Res **22**(15): 2922-9.
- Andreeva, L., R. Heads, et al. (1999). "Cyclophilins and their possible role in the stress response." Int J Exp Pathol **80**(6): 305-15.
- Argaman, M., R. Aly, et al. (1994). "Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally." Mol Biochem Parasitol **64**(1): 95-110.
- Arner, E. S. and S. Eriksson (1995). "Mammalian deoxyribonucleoside kinases." Pharmacol Ther **67**(2): 155-86.
- Ashton, P. D., R. S. Curwen, et al. (2001). "Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins." Trends Parasitol **17**(4): 198-202.
- Avila, A. R., S. F. Yamada-Ogatta, et al. (2001). "Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." Mol Biochem Parasitol **117**(2): 169-77.
- Bailey, H. and W. J. Bishop (1959). "Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951." Br J Vener Dis

- 35(1):** 8-9.
- Bakker, B. M., H. V. Westerhoff, et al. (2000). "Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs." Mol Biochem Parasitol **106(1)**: 1-10.
- Banerjee, A. K. (1980). "5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids." Microbiol Rev **44(2)**: 175-205.
- Barr, S. D. and L. Gedamu (2001). "Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals." J Biol Chem **276(36)**: 34279-87.
- Bart, G., M. J. Frame, et al. (1997). "Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **88(1-2)**: 53-61.
- Bellatin, J. A., A. S. Murray, et al. (2002). "*Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes." Exp Parasitol **100(1)**: 44-53.
- Bello, L. J. (1974). "Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells." Exp Cell Res **89(2)**: 263-74.
- Bengs, F., A. Scholz, et al. (2005). "LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*." Mol Microbiol **55(5)**: 1606-15.
- Beverley, S. M., N. S. Akopyants, et al. (2002). "Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357(1417)**: 47-53.
- Beverley, S. M. and S. J. Turco (1998). "Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*." Trends Microbiol **6(1)**: 35-40.
- Birringer, M. S., M. T. Claus, et al. (2005). "Structure of a type II thymidine kinase with bound dTTP." FEBS Lett **579(6)**: 1376-82.
- Bjellqvist, B., K. Ek, et al. (1982). "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." J Biochem Biophys Methods **6(4)**: 317-39.
- Boccardo, M., V. Redoglio, et al. (1986). "Multiple myeloma plasma cell kinetics: rapid and reliable evaluation using 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) DNA incorporation detected by an anti-BrdUrd monoclonal antibody." Tumori **72(2)**: 135-7.
- Boucher, N., Y. Wu, et al. (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element." J Biol Chem **277(22)**: 19511-20.
- Brandau, S., A. Dresel, et al. (1995). "High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*." Biochem J **310 (Pt 1)**: 225-32.
- Brittingham, A., M. A. Miller, et al. (2001). "Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **112(1)**: 51-9.
- Burchmore, R. J. and M. P. Barrett (2001). "Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes." Int J Parasitol **31(12)**: 1311-20.
- Burchmore, R. J. and D. T. Hart (1995). "Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*." Mol Biochem Parasitol **74(1)**: 77-86.
- Burchmore, R. J. and S. M. Landfear (1998). "Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*." J Biol Chem **273(44)**: 29118-26.
- Button, L. L., D. G. Russell, et al. (1989). "Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed." Mol Biochem Parasitol **32(2-3)**: 271-83.
- Caraglia, M., M. Marra, et al. (2003). "The eukaryotic initiation factor 5A is involved in the regulation of proliferation and apoptosis induced by interferon-alpha and EGF in

- human cancer cells." *J Biochem (Tokyo)* **133**(6): 757-65.
- Caraglia, M., M. Marra, et al. (2001). "The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis." *Amino Acids* **20**(2): 91-104.
- Carnrot, C., R. Wehelie, et al. (2003). "Molecular characterization of thymidine kinase from *Ureaplasma urealyticum*: nucleoside analogues as potent inhibitors of mycoplasma growth." *Mol Microbiol* **50**(3): 771-80.
- Cash, P. (2000). "Proteomics in medical microbiology." *Electrophoresis* **21**(6): 1187-201.
- Chakraborty, A., I. Das, et al. (2002). "A single-domain cyclophilin from *Leishmania donovani* reactivates soluble aggregates of adenosine kinase by isomerase-independent chaperone function." *J Biol Chem* **277**(49): 47451-60.
- Chakraborty, R., S. Mukherjee, et al. (1996). "Oxygen-dependent leishmanicidal activity of stimulated macrophages." *Mol Cell Biochem* **154**(1): 23-9.
- Chan, J., T. Fujiwara, et al. (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7): 2453-7.
- Chan, M. M. and D. Fong (1994). "Plant microtubule inhibitors against trypanosomatids." *Parasitol Today* **10**(11): 448-51.
- Charest, H. and G. Matlashewski (1994). "Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." *Mol Cell Biol* **14**(5): 2975-84.
- Charest, H., W. W. Zhang, et al. (1996). "The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region." *J Biol Chem* **271**(29): 17081-90.
- Chello, P. L. and J. J. Jaffe (1972). "Comparative properties of trypanosomal and mammalian thymidine kinases." *Comp Biochem Physiol B* **43**(3): 543-62.
- Chello, P. L. and J. J. Jaffe (1972). "Isolation, partial purification, and properties of thymidine kinase from *Trypanosoma (trypanozoon) brucei rhodesiense*." *J Parasitol* **58**(2): 298-305.
- Chung, Y. M., Y. D. Yoo, et al. (2001). "Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin." *Anticancer Res* **21**(2A): 1129-33.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." *Embo J* **21**(8): 1881-8.
- Clayton, D. A. and R. L. Teplitz (1972). "Intracellular mosaicism (nuclear - -mitochondrial +) for thymidine kinase in mouse L cells." *J Cell Sci* **10**(2): 487-93.
- Coulson, R. M. and D. F. Smith (1990). "Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*." *Mol Biochem Parasitol* **40**(1): 63-75.
- Cruz, A. and S. M. Beverley (1990). "Gene replacement in parasitic protozoa." *Nature* **348**(6297): 171-3.
- Curotto de Lafaille, M. A. and D. F. Wirth (1992). "Creation of Null/+ mutants of the alpha-tubulin gene in *Leishmania enriettii* by gene cluster deletion." *J Biol Chem* **267**(33): 23839-46.
- Cuvillier, A., F. Redon, et al. (2000). "LdARL-3A, a *Leishmania* promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity." *J Cell Sci* **113**(Pt): 2065-2074.
- D'Mello, R. A., P. R. Langford, et al. (1997). "Role of bacterial Mn-cofactored superoxide dismutase in oxidative stress responses, nasopharyngeal colonization, and sustained bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b." *Infect Immun* **65**(7): 2700-6.
- de Curtis, I. (2001). "Cell migration: GAPs between membrane traffic and the cytoskeleton." *EMBO Rep.* **2001 Apr**(2(4)): 277-81.
- Dell, K. R. and J. N. Engel (1994). "Stage-specific regulation of protein phosphorylation in

- Leishmania major." Mol Biochem Parasitol **64**(2): 283-92.
- Demasi, A. P., G. A. Pereira, et al. (2001). "Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria." FEBS Lett **509**(3): 430-4.
- Denise, H., G. H. Coombs, et al. (2004). "Generation of Leishmania mutants lacking antibiotic resistance genes using a versatile hit-and-run targeting strategy." FEMS Microbiol Lett **235**(1): 89-94.
- Dobrovolsky, V. N., T. Bucci, et al. (2003). "Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease." Mol Genet Metab **78**(1): 1-10.
- Donaldson, J. G. and R. D. Klausner (1994). "ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 527-32.
- Drummelsmith, J., V. Brochu, et al. (2003). "Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms." Mol Cell Proteomics **2**(3): 146-55.
- Duncan, R. C., P. Salotra, et al. (2004). "The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research." Curr Mol Med **4**(6): 611-21.
- El Fakhry, Y., M. Ouellette, et al. (2002). "A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum." Proteomics **2**(8): 1007-17.
- Elion, G. B., P. A. Furman, et al. (1977). "Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5716-20.
- Erdmann, M., A. Scholz, et al. (2006). "Interacting Protein Kinases Involved in the Regulation of Flagellar Length." Mol Biol Cell.
- Eriksson, S., B. Munch-Petersen, et al. (2002). "Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases." Cell Mol Life Sci **59**(8): 1327-46.
- Espinosa, J. M., D. Portal, et al. (2003). "Trypanosoma cruzi poly-zinc finger protein: a novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 35-44.
- Etges, R., J. Bouvier, et al. (1986). "The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease." J Biol Chem **261**(20): 9098-101.
- Fischer, C., A. Voss, et al. (2001). "Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis." Med Microbiol Immunol (Berl) **190**(1-2): 85-7.
- Flinn, H. M. and D. F. Smith (1992). "Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major." Nucleic Acids Res **20**(4): 755-62.
- Foekens, J. A., S. Romain, et al. (2001). "Thymidine kinase and thymidylate synthase in advanced breast cancer: response to tamoxifen and chemotherapy." Cancer Res **61**(4): 1421-5.
- Fougerousse, F., F. Edom-Vovard, et al. (2001). "The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis." J Muscle Res Cell Motil **22**(6): 535-44.
- Fox, D. and A. G. Smulian (2001). "Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen Pneumocystis carinii." Med Mycol **39**(6): 495-507.
- Fulton, J. D. and L. P. Joyner (1949). "Studies on protozoa; the metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of Leishmania donovani." Trans R Soc Trop Med Hyg **43**(3): 273-86, pl.
- Gallo, J. M. and E. Precigout (1988). "Tubulin expression in trypanosomes." Biol Cell **64**(2): 137-43.
- Gentry, G. A. (1992). "Viral thymidine kinases and their relatives." Pharmacol Ther **54**(3): 319-55.
- Ghedini, E., W. W. Zhang, et al. (1997). "Antibody response against a Leishmania donovani amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis." Clin Diagn

- Lab Immunol **4**(5): 530-5.
- Ghosh, M. and T. Mukherjee (2000). "Stage-specific development of a novel adenosine transporter in *Leishmania donovani* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **108**(1): 93-99.
- Gilles, A. M., P. Glaser, et al. (1994). "Zinc, a structural component of adenylate kinases from gram-positive bacteria." J Bacteriol **176**(2): 520-3.
- Glaser, T. A., J. E. Baatz, et al. (1988). "pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7602-6.
- Glaser, T. A., S. F. Moody, et al. (1991). "An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **45**(2): 337-44.
- Gradoni, L., A. Scalone, et al. (1996). "Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy." Aids **10**(7): 785-91.
- Grobner, P. (1979). "Thymidine kinase enzyme variants in *Physarum polycephalum*. Kinetics and properties of the enzyme variants." J Biochem (Tokyo) **86**(5): 1607-14.
- Grobner, P. and P. Loidl (1982). "Thymidylate synthetase during synchronous nuclear division cycle and differentiation of *Physarum polycephalum*." Biochim Biophys Acta **697**(1): 83-8.
- Grobner, P. and P. Loidl (1983). "Response of the dTMP-synthesizing enzymes to differentiation processes in *Physarum polycephalum*." Exp Cell Res **144**(2): 385-91.
- Gutteridge, W. E. and P. I. Trigg (1970). "Incorporation of radioactive precursors into DNA and RNA of *Plasmodium knowlesi* in vitro." J Protozool **17**(1): 89-96.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Mol Cell Biol **19**(3): 1720-30.
- Handman, E. and J. W. Goding (1985). "The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate." Embo J **4**(2): 329-36.
- Handman, E., A. H. Osborn, et al. (1995). "The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle." Mol Biochem Parasitol **74**(2): 189-200.
- Hanke, T., M. J. Ramiro, et al. (2003). "Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs." Nucleic Acids Res **31**(16): 4917-28.
- Hannaert, V., F. Bringaud, et al. (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." Kinetoplastid Biol Dis **2**(1): 11.
- Harder, S. (2005). "Charakterisierung von zwei stadien-spezifischen Proteinen des parasitischen Protozoons *Leishmania donovani*." Dissertation, Universität Hamburg.
- Harder, S., M. Bente, et al. (2006). "Expression of a Mitochondrial Peroxiredoxin Prevents Programmed Cell Death in *Leishmania donovani*." Eukaryotic Cell **5**(5).
- Harms, B. (1993). Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Thieme Verlag.
- Hart, D. T. and G. H. Coombs (1982). "*Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes." Exp Parasitol **54**(3): 397-409.
- Hart, D. T., O. Misset, et al. (1984). "A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes." Mol Biochem Parasitol **12**(1): 25-35.
- Herzyk, P., A. Beveridge, et al. (1987). "Conformational properties of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), an inhibitor of HIV reverse transcriptase." Biochem Biophys Res Commun **145**(3): 1356-61.
- Hubel, A., S. Brandau, et al. (1995). "A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp." Mol Biochem Parasitol **70**(1-2): 107-18.
- Hubel, A., S. Krobisch, et al. (1997). "*Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the

- mammalian stage of the parasite." Mol Cell Biol **17**(10): 5987-95.
- Iida, H. and I. Yahara (1984). "A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth." J Cell Biol **99**(4 Pt 1): 1441-50.
- Iida, H. and I. Yahara (1985). "Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase." Nature **315**: 688-90.
- Ilg, T., D. Craik, et al. (1998). "Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides." J Biol Chem **273**(22): 13509-23.
- Ivanetich, K. M. and D. V. Santi (1990). "Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa." Faseb J **4**(6): 1591-7.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-42.
- Jaffe, J. J., J. C. Comley, et al. (1982). "Thymidine kinase activity and thymidine salvage in adult *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis*." Mol Biochem Parasitol **5**(6): 361-70.
- Janeway, T. (1995). Immunologie, Spektrum Verlag.
- Jensen, O. N., P. Mortensen, et al. (1997). "Automation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control." Anal Chem **69**(9): 1706-14.
- Johnson, D. I. (1999). "Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity." Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 54-105.
- Jungblut, P. R., U. E. Schaible, et al. (1999). "Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens." Mol Microbiol **33**(6): 1103-17.
- Jungblut, P. R., U. Zimny-Arndt, et al. (1999). "Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases." Electrophoresis **20**(10): 2100-10.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn, et al. (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-94.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.
- Kauffman, M. G. and T. J. Kelly (1991). "Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis." Mol Cell Biol **11**(5): 2538-46.
- Kauffman, M. G., S. J. Noga, et al. (1990). "Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation." Anal Biochem **191**(1): 41-6.
- Kawazu, S., N. Tsuji, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **109**(2): 165-9.
- Ke, P. Y. and Z. F. Chang (2004). "Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway." Mol Cell Biol **24**(2): 514-26.
- Kelly, B. L., T. N. Nelson, et al. (2001). "Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63)." Mol Biochem Parasitol **116**(1): 101-4.
- Klier, H., R. Csonga, et al. (1995). "Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells." Biochemistry **34**(45): 14693-702.
- Knecht, M., V. Regitz-Zagrosek, et al. (1994). "Characterization of myocardial protein

- composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis." Eur Heart J **15 Suppl D**: 37-44.
- Kohl, L., D. Robinson, et al. (2003). "Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes." Embo J **22**(20): 5336-46.
- Krobitch, S., S. Brandau, et al. (1998). "Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation." J Biol Chem **273**(11): 6488-94.
- Krobitch, S. and J. Clos (2000). "Cross-species homologous recombination in Leishmania donovani reveals the sites of integration." Mol Biochem Parasitol **107**(1): 123-8.
- LaFon, S. W., D. J. Nelson, et al. (1982). "Purine and pyrimidine salvage pathways in Leishmania donovani." Biochem Pharmacol **31**(2): 231-8.
- Laird, P. W., J. C. Zomerdijk, et al. (1987). "In vivo labelling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in Trypanosoma brucei." Embo J **6**(4): 1055-62.
- Lamontagne, J. and B. Papadopoulou (1999). "Developmental regulation of spliced leader RNA gene in Leishmania donovani amastigotes is mediated by specific polyadenylation." J Biol Chem **274**(10): 6602-9.
- Langen, H., P. Berndt, et al. (1999). "Two-dimensional map of human brain proteins." Electrophoresis **20**(4-5): 907-16.
- Lasonder, E., Y. Ishihama, et al. (2002). "Analysis of the Plasmodium falciparum proteome by high-accuracy mass spectrometry." Nature **419**(6906): 537-42.
- LeBowitz, J. H., A. Cruz, et al. (1992). "Thymidine kinase as a negative selectable marker in Leishmania major." Mol Biochem Parasitol **51**(2): 321-5.
- Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." Annu Rev Biochem **55**: 1151-91.
- Liu, K., Zinker, S., Arguello, C., Salgado, L.M. (2000). "Isolation and analysis of a new developmentally regulated gene from amastigotes of Leishmania mexicana mexicana." Parasitol Res **86**(2): 140-50.
- Lockwood, B., North, M., Mallinson, D., Coombs, G. (1987). "Analysis of Leishmania proteinases reveals the developmental changes in species-specific forms and common 68-kDa activity." FEMS Microbiology Letters **48**: 345-350.
- Lu, W., G. L. Egerton, et al. (1998). "Thioredoxin peroxidase from Onchocerca volvulus: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 221-35.
- Mader, U., H. Antelmann, et al. (2002). "Bacillus subtilis functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics." Mol Genet Genomics **268**(4): 455-67.
- Mahoney, A. B. and S. J. Turco (1999). "Characterization of the glucosyltransferases that assemble the side chains of the Indian Leishmania donovani lipophosphoglycan." Arch Biochem Biophys **372**(2): 367-74.
- Maniatis, T. and R. Reed (2002). "An extensive network of coupling among gene expression machines." Nature **416**(6880): 499-506.
- McConville, M. J., S. J. Turco, et al. (1992). "Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage." Embo J **11**(10): 3593-600.
- McKean, P. G., S. Vaughan, et al. (2001). "The extended tubulin superfamily." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2723-33.
- McNeely, T. B. and P. S. Doyle (1996). "Isolation of lipophosphoglycans from Leishmania donovani amastigotes." Arch Biochem Biophys **334**(1): 1-8.
- McNeely, T. B. and S. J. Turco (1990). "Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes." J Immunol **144**(7): 2745-50.
-

- McNicoll F, D. J., Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B (im Druck). "Comparative analysis of stage differentiation in *Leishmania infantum*." Proteomics.
- Medina-Acosta, E., R. E. Karess, et al. (1993). "Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated." Mol Biochem Parasitol **57**(1): 31-45.
- Mehlhorn, P. (1998). Parasitologie.
- Michelis, R. and S. Gepstein (2000). "Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast." Plant Mol Biol **44**(4): 487-98.
- Miller, J. S. (1988). "Effects of temperature elevation on mRNA and protein synthesis in *Leishmania mexicana amazonensis*." Mol Biochem Parasitol **30**(2): 175-84.
- Miller, P. J. and D. I. Johnson (1994). "Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Cell Biol **14**(2): 1075-83.
- Moore, L. L., C. Santrich, et al. (1996). "Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2." Mol Biochem Parasitol **80**(2): 125-35.
- Mukkada, A. J., J. C. Meade, et al. (1985). "Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth." Science **229**(4718): 1099-101.
- Munch-Petersen, B. and G. Tyrsted (1977). "Induction of thymidine kinases in phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes." Biochim Biophys Acta **478**(3): 364-75.
- Murray, H. W. (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes." J Immunol **129**(1): 351-7.
- Murray, J. M. and D. I. Johnson (2000). "Isolation and characterization of Nrf1p, a novel negative regulator of the Cdc42p GTPase in *Schizosaccharomyces pombe*." Genetics **154**(1): 155-65.
- Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-62.
- Ngo, H., C. Tschudi, et al. (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14687-92.
- Nishino, I., A. Spinazzola, et al. (2001). "MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA." Neuromuscul Disord **11**(1): 7-10.
- Nogoceke, E., D. U. Gommel, et al. (1997). "A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*." Biol Chem **378**(8): 827-36.
- Noll, T. M., C. Desponds, et al. (1997). "Histone H1 expression varies during the *Leishmania* major life cycle." Mol Biochem Parasitol **84**(2): 215-27.
- North, M. J. and G. H. Coombs (1981). "Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: analysis by gel electrophoresis." Mol Biochem Parasitol **3**(5): 293-300.
- Nugent, P. G., S. A. Karsani, et al. (2004). "Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation." Mol Biochem Parasitol **136**(1): 51-62.
- Nyalwidhe, J., U. G. Maier, et al. (2003). "Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells." Zoology (Jena) **106**(4): 341-8.
- O'Day, D. H., M. Chatterjee-Chakraborty, et al. (2005). "Isolation and characterization of *Dictyostelium* thymidine kinase 1 as a calmodulin-binding protein." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 1494-502.
- Oakley, B. R. (2000). "An abundance of tubulins." Trends Cell Biol **10**(12): 537-42.
- Olivero, O. A. (2006). "Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Environ Mol Mutagen.

- Omara-Opyene, A. L. and L. Gedamu (1997). "Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani* chagasi." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 247-67.
- Opperdoes, F. R. and P. Borst (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." FEBS Lett **80**(2): 360-4.
- Pan, A. A., S. M. Duboise, et al. (1993). "Developmental life cycle of *Leishmania*--cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes." J Eukaryot Microbiol **40**(2): 213-23.
- Pancholi, V. and V. A. Fischetti (1998). "alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci." J Biol Chem **273**(23): 14503-15.
- Parsons, M., T. Furuya, et al. (2001). "Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes." Mol Biochem Parasitol **115**(1): 19-28.
- Passwell, J. H., R. Shor, et al. (1994). "Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst." Int J Exp Pathol **75**(4): 277-84.
- Patwardhan, A. J., E. F. Strittmatter, et al. (2005). "Comparison of normal and breast cancer cell lines using proteome, genome, and interactome data." J Proteome Res **4**(6): 1952-60.
- Pellegrini, F. and D. R. Budman (2005). "Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development." Cancer Invest **23**(3): 264-73.
- Pereira, C. A., G. D. Alonso, et al. (2003). "Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability." FEBS Lett **554**(1-2): 201-5.
- Pereira, C. A., G. D. Alonso, et al. (2000). "*Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites." J Biol Chem **275**(2): 1495-501.
- Pereira, C. A., G. D. Alonso, et al. (2002). "Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids." J Eukaryot Microbiol **49**(1): 82-5.
- Pimenta, P. F., S. J. Turco, et al. (1992). "Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut." Science **256**(5065): 1812-5.
- Piperno, G., B. Huang, et al. (1981). "Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition and phosphorylation of stalk components." J Cell Biol **88**(1): 73-9.
- Polson, A., M. B. von Wechmar, et al. (1980). "Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens." Immunol Commun **9**(5): 475-93.
- Pontarin, G., L. Gallinaro, et al. (2003). "Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12159-64.
- Price, H. P., C. Panethymitaki, et al. (2005). "Functional analysis of TbARL1, an N-myristoylated Golgi protein essential for viability in bloodstream trypanosomes." J Cell Sci **118**(Pt 4): 831-41.
- Priest, J. W. and S. L. Hajduk (1992). "Cytochrome c reductase purified from *Crithidia fasciculata* contains an atypical cytochrome c1." J Biol Chem **267**(28): 20188-95.
- Priest, J. W. and S. L. Hajduk (1994). "Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*." J Bioenerg Biomembr **26**(2): 179-91.
- Priest, J. W. and S. L. Hajduk (1995). "The trypanosomatid Rieske iron-sulfur proteins have a cleaved presequence that may direct mitochondrial import." Biochim Biophys Acta **1269**(3): 201-4.
- Priest, J. W., Z. A. Wood, et al. (1993). "Cytochromes c1 of kinetoplastid protozoa lack mitochondrial targeting presequences." Biochim Biophys Acta **1144**(2): 229-31.
- Proudfoot, N. J. (1989). "How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes." Trends Biochem Sci **14**(3): 105-10.

- Puentes, S. M., D. L. Sacks, et al. (1988). "Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan." J Exp Med **167**(3): 887-902.
- Pupkis, M. F. and G. H. Coombs (1984). "Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes." J Gen Microbiol **130**(Pt 9): 2375-83.
- Quivey, R. G., Jr., R. Faustoferrri, et al. (2000). "Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*." FEMS Microbiol Lett **189**(1): 89-92.
- Ramamoorthy, R., J. E. Donelson, et al. (1992). "Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form." J Biol Chem **267**(3): 1888-95.
- Robertson, C. D. and G. H. Coombs (1990). "Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*." Mol Biochem Parasitol **42**(2): 269-76.
- Robertson, C. D. and G. H. Coombs (1994). "Multiple high activity cysteine proteases of *Leishmania mexicana* are encoded by the *Imcpb* gene array." Microbiology **140** (Pt 2): 417-24.
- Romain, S., I. J. Christensen, et al. (1995). "Prognostic value of cytosolic thymidine kinase activity as a marker of proliferation in breast cancer." Int J Cancer **61**(1): 7-12.
- Saar, Y., A. Ransford, et al. (1998). "Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **95**(1): 9-20.
- Sacks, D. L., P. F. Pimenta, et al. (1995). "Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J Exp Med **181**(2): 685-97.
- Sacks, D. L., E. M. Saraiva, et al. (1994). "The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence." Parasitology **108** Suppl: S55-62.
- Sanger, F., A. R. Coulson, et al. (1980). "Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing." J Mol Biol **143**(2): 161-78.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Saxena, A., E. A. Worthey, et al. (2003). "Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis." Mol Biochem Parasitol **129**(1): 103-14.
- Schindler, R., E. Weichselsdorfer, et al. (2001). "Aldolase-localization in cultured cells: cell-type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations." Biochem Cell Biol **79**(6): 719-28.
- Schlee, M., T. Krug, et al. (2004). "Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis: activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV." J Virol **78**(8): 3941-52.
- Sharp, P. A. (1994). "Split genes and RNA splicing." Cell **77**(6): 805-15.
- Sherley, J. L. and T. J. Kelly (1988). "Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle." J Biol Chem **263**(17): 8350-8.
- Shiozaki, K., H. Akhavan-Niaki, et al. (1994). "Protein phosphatase 2C, encoded by *ptc1+*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Cell Biol **14**(6): 3742-51.
- Silflow, C. D. and P. A. Lefebvre (2001). "Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiol **127**(4): 1500-7.
- Siman-Tov, M. M., R. Aly, et al. (1996). "Cloning from *Leishmania major* of a

- developmentally regulated gene, c-lpk2, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase." *Mol Biochem Parasitol* **77**(2): 201-15.
- Smirnov, I. P., X. Zhu, et al. (2004). "Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry." *Anal Chem* **76**(10): 2958-65.
- Steinert, G., H. Firket, et al. (1958). "[Synthesis of desoxyribonucleic acid in the parabasal body of *Trypanosoma mega*]." *Exp Cell Res* **15**(3): 632-5.
- Stiles, J. K., P. I. Hicock, et al. (1999). "Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*." *Ann Trop Med Parasitol* **93**(8): 781-807.
- Streit, J. A., J. E. Donelson, et al. (1996). "Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line." *Infect Immun* **64**(5): 1810-8.
- Striepen, B., A. J. Pruijssers, et al. (2004). "Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3154-9.
- Sundar, S. (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." *Trop Med Int Health* **6**(11): 849-54.
- Sutton, R. E. and J. C. Boothroyd (1986). "Evidence for trans splicing in trypanosomes." *Cell* **47**(4): 527-35.
- Terent'ev, L. L., N. A. Terent'eva, et al. (1990). "[Thymidine kinase from sea urchin oocytes]." *Biokhimiia* **55**(12): 2293-9.
- Tsai, M. F., H. T. Yu, et al. (2000). "Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase." *Virology* **277**(1): 100-10.
- Turco, S. J. (1988). "The lipophosphoglycan of *Leishmania*." *Parasitol Today* **4**(9): 255-7.
- Turco, S. J. and D. L. Sacks (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes." *Mol Biochem Parasitol* **45**(1): 91-9.
- Turco, S. J., G. F. Spath, et al. (2001). "Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species." *Trends Parasitol* **17**(5): 223-6.
- Tuxhorn, J., T. Daise, et al. (1998). "Regulation of flagellar length in *Chlamydomonas*." *Cell Motil Cytoskeleton* **40**(2): 133-46.
- Ullu, E., K. R. Matthews, et al. (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." *Mol Cell Biol* **13**(1): 720-5.
- Vertessy, B. G., F. Orosz, et al. (1997). "Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system." *J Biol Chem* **272**(41): 25542-6.
- Voth, B. R., B. L. Kelly, et al. (1998). "Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment." *Mol Biochem Parasitol* **93**(1): 31-41.
- Walder, J. A., P. S. Eder, et al. (1986). "The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's." *Science* **233**(4763): 569-71.
- Walter, R. D., H. Muhlpfordt, et al. (1970). "[Comparative studies of the desoxythymidylate synthesis in *Plasmodium chabaudi*, *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma lewisi*]." *Z Tropenmed Parasitol* **21**(4): 347-57.
- Wang, J., A. J. Morris, et al. (1996). "The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants." *J Biol Chem* **271**(12): 6861-5.
- WHO (2004). "World Health Report."
- Wiese, M., D. Kuhn, et al. (2003). "Protein kinase involved in flagellar-length control." *Eukaryot Cell* **2**(4): 769-77.
- Wiese, M., Q. Wang, et al. (2003). "Identification of mitogen-activated protein kinase

- homologues from *Leishmania mexicana*." Int J Parasitol **33**(14): 1577-87.
- Wiesgigl, M. and J. Clos (2001). "Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*." Mol Biol Cell **12**(11): 3307-16.
- Wilkins, J. C., K. A. Homer, et al. (2002). "Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions." Appl Environ Microbiol **68**(5): 2382-90.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, et al. (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." Biotechnol Genet Eng Rev **13**: 19-50.
- Willard, H. F., M. Angrist, et al. (2005). "Genomic medicine: genetic variation and its impact on the future of health care." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1460): 1543-50.
- Wintersberger, E., H. Rotheneder, et al. (1992). "Regulation of thymidine kinase during growth, cell cycle and differentiation." Adv Enzyme Regul **32**: 241-54.
- Wood, V., R. Gwilliam, et al. (2002). "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." Nature **415**(6874): 871-80.
- Wu, Y., Y. El Fakhry, et al. (2000). "A new developmentally regulated gene family in *Leishmania amastigotes* encoding a homolog of amastin surface proteins." Mol Biochem Parasitol **110**(2): 345-57.
- Yao, C., K. G. Leidal, et al. (2002). "Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 119-28.
- Zhang, J., Q. Jia, et al. (2006). "Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients." Oncol Rep **15**(2): 455-61.
- Zhang, W. W., H. Charest, et al. (1996). "Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **78**(1-2): 79-90.
- Zhang, W. W. and G. Matlashewski (1997). "Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8807-11.
- Zijlstra, E. E., A. M. Musa, et al. (2003). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis." Lancet Infect Dis **3**(2): 87-98.
- Zilberstein, D., N. Blumenfeld, et al. (1991). "Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania promastigotes*." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 175-8.
- Zilberstein, D. and M. Shapira (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **48**: 449-70.
- Zilka, A., S. Garlapati, et al. (2001). "Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region." J Biol Chem **276**(51): 47922-9.
-

Publikationen

Thiel, M. und Bruchhaus, I.

Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes.

Med Microbiol Immunol (Berl). 2001 Nov;190(1-2):33-6.

Bente, M.; Harder, S.; Wiesgigl, M.; Heukeshoven, J.; Gelhaus, C.; Krause, E.; Clos, J.; Bruchhaus, I.

Developmentally induced changes of the proteome in the parasite protozoan *Leishmania donovani*. Proteomics 2003,3,1811-1829

Harder, S.; **Bente, M.**; Isermann, K.; Bruchhaus, I.

Expression of a Mitochondrial Peroxiredoxin Prevents Programmed Cell Death in *Leishmania donovani*. Eukaryotic Cell, Mai 2006, 861-870

Meike Bente - Dissertation -

Gutachter der Dissertation:

1. Frau PD Dr. I. Bruchhaus
2. Herr Prof. Dr. Wiese

Disputation am 30.06.2006