

**Ein dupliziertes Gen aus *Leishmania infantum* (Nicolli, 1908)
vermittelt Resistenz gegen Miltefosin und Antimon (III)**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie der Fakultät
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von Kohelia Choudhury
aus Hamburg**

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. J. CLOS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. STREIT
Tag der Disputation: 09. November 2007

Hamburg, den 25. Oktober 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

1.	Einleitung	5
1.1	<i>Leishmania</i>: Lebenszyklus und Invasionsstrategien	5
1.1.2	Differenzierung im Insektenvektor	5
1.1.2	Differenzierung im Säugetierwirt	6
1.2	Leishmaniasen	8
1.2.1	Kutane Leishmaniose	8
1.2.2	Mukokutane Leishmaniasen	8
1.2.3	Viszerale Leishmaniose	9
1.3	Therapie von Leishmaniasen	9
1.4	Miltefosin	11
1.5	Wirkungsmechanismen des Miltefosins	12
1.5.1	Wirkungsmechanismen des Miltefosins in Tumorzellen	12
1.5.2	Wirkungsmechanismen des Miltefosins in <i>Leishmania</i>	13
1.6	Chemoresistenz im Allgemeinen	15
1.6.1	Mechanismen der Miltefosin-Resistenz in Tumorzellen	16
1.6.2	Mechanismen der Miltefosin-Resistenz in <i>Leishmania</i>	16
1.7	Problematik der Entwicklung und Ausbreitung von therapieresistenter VL	18
1.8	Funktionelle Komplementation in <i>Leishmania</i>	20
1.9	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Geräte und sonstige Materialien	25
2.1.3	Kits	26
2.1.4	Membranen	26
2.1.5	Enzyme	26
2.1.6	Marker	26
2.1.7	Antikörper	27
2.1.8	DNA-Oligonukleotide	27

2.1.9	Vektoren	28
2.1.10	Bakterienstämme	31
2.1.11	<i>Leishmania</i> -Stämme	32
2.1.12	Makrophagen	33
2.1.13	Nährmedien	33
2.1.14	Medienzusätze	34
2.1.15	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	34
2.2	Methoden	36
2.2.1	Zellbiologische Methoden	36
2.2.1.1	Zellkultur von promastigoten Leishmanien	36
2.2.1.2	Einfrieren von <i>Leishmania</i> -Stammkulturen	36
2.2.1.3	Transfektion von <i>Leishmania</i> -Promastigoten durch Elektroporation	37
2.2.1.4	Vereinzelung von Leishmanien	38
2.2.1.5	Selektion von Miltefosin-resistenten <i>L. infantum</i> -Promastigoten	38
2.2.1.6	Quantitative Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie	39
2.2.1.7	Kultivierung von J774-Makrophagen	40
2.2.1.8	<i>In vitro</i> -Infektion von J774-Makrophagen mit Leishmanien	40
2.2.1.9	Giemsa-Färbung	41
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.2.1	Herstellung von kompetenten Zellen	41
2.2.2.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	41
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA durch alkalische Lyse (Mini-Präparation)	42
2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Midi-Präparation)	42
2.2.2.5	Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation)	43
2.2.2.6	Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA	44
2.2.2.7	Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien	45
2.2.2.8	Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien	45
2.2.2.9	Phenol-Chloroform-Extraktion	46

2.2.2.10	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
2.2.2.11	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
2.2.2.12	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	47
2.2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	47
2.2.2.14	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
2.2.2.15	Semi-Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	49
2.2.2.16	Mykoplasmen-Kontrolle mittels PCR	49
2.2.2.17	Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen	50
2.2.2.18	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.2.2.19	Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE)	51
2.2.2.20	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	52
2.2.2.20.1	Herstellung von chromosomaler DNA in Agaroseblöcke für die PFGE	52
2.2.2.20.1	Auftrennung von Chromosomen mittels PFGE	53
2.2.2.21	Transfer von DNA auf eine Membran (<i>Southern Blot</i>)	53
2.2.2.22	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	54
2.2.2.23	Qualitätskontrolle der DIG-markierten Sonden (<i>spot test</i>)	55
2.2.2.24	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	55
2.2.2.25	Hybridisierung von Membranen mit DNA-Sonden	56
2.2.2.26	Immunologischer Nachweis von DIG-markierter DNA	56
2.2.2.27	Nachweis von radioaktiv-markierter DNA (Autoradiographie)	57
2.2.2.28	Sequenzierung von DNA	57
2.2.2.29	Auftrennung und Digitalisierung der Sequenzdaten	58
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	59
2.2.3.1	Überexpression fremder Gene in <i>E. coli</i> zur Antigen-Gewinnung	59
2.2.3.2	Induktion der Proteinexpression	59
2.2.3.3	Aufreinigung der Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie	60
2.2.3.4	Dialyse von Proteinlösungen	61
2.2.3.5	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Leishmania</i>	61
2.2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	62
2.2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62

2.2.3.8	Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blau	64
2.2.3.9	MALDI-TOF-MS	64
2.2.3.10	Immunisierung einer Maus und Antikörpergewinnung	65
2.2.3.11	Immunisierung eines Huhns und Antikörpergewinnung (IgY)	66
2.2.3.12	Peptidimmunisierung von Kaninchen	67
2.2.3.13	Transfer von Proteinen auf eine Membran (<i>Western Blot</i>)	67
2.2.3.14	Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen	68
2.2.4	Mikroskopie	69
2.2.4.1	Lichtmikroskopie	69
2.2.4.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	69
2.2.4.3	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	70
2.2.5	Elektronische Bildbearbeitung	70
3.	Ergebnisse	71
3.1	<i>In vitro</i>-Selektion Miltefosin-resistenter Promastigoten	71
3.1.1	Bestimmung der IC_{95} (<i>inhibition concentration</i>) für Miltefosin	71
3.1.2	Erste Selektion auf Miltefosin-resistente Promastigoten	71
3.1.3	Kompetitive Selektion	74
3.1.4	Erhöhte IC_{50} -Werte für Miltefosin von <i>Li</i> [pcosM1] und <i>Li</i> [pcosM2]	76
3.1.5	Schutz gegen Miltefosin-induzierte morphologische Veränderungen in Promastigoten	77
3.1.6	Schutz gegen Miltefosin-induzierte DNA-Degradation in Promastigoten	79
3.2	Identifizierung des Miltefosin-Resistenz vermittelnden Gens	81
3.2.1	Überlappende Sequenzen von pcosM1 und pcosM2	81
3.2.2	Sequenzanalyse von pcosM1 und pcosM2	82
3.2.3	Klonierung des P300-Gens mit flankierenden Sequenzen	85
3.2.4	Erhöhte Kopienzahl des P300-Gens vermittelt Miltefosin-Resistenz in <i>L. infantum</i> -Promastigoten	86
3.3	Charakteristika des P300-Genprodukts	89
3.4	Rekombinante Expression von P300 in <i>E. coli</i>	91
3.4.1	Klonierung von <i>P300</i> in pJC45	91
3.4.2	Überexpression eines 65 kDa Proteins in <i>E. coli</i>	91

3.4.3	Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins zur Antigen-Gewinnung	93
3.4.4	Gewinnung von Antikörpern	94
3.4.5	Erneute Klonierung und Expression von <i>P300</i> in <i>E. coli</i>	96
3.5	<i>P300</i> vermittelt Antimon-Resistenz in Promastigoten	99
3.6	<i>P300</i> vermittelt Miltefosin-Resistenz in intrazellulären Amastigoten	101
3.7	Herstellung einer <i>P300</i>-Deletionsmutante in <i>L. infantum</i>	103
3.7.1	Bestimmung der Kopienzahl des <i>P300</i> -Gens	103
3.7.2	Herstellung der DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination	105
3.7.3	Transfektion der DNA-Konstrukte in <i>L. infantum</i> WT	106
3.7.4	Überprüfung der <i>LiP300-P235</i> ^{-/-} -Deletionsmutante mittels <i>Southern Blot</i> Analyse	108
3.8	Untersuchung der chromosomalen Lokalisation des <i>P300</i>-Gens	111
3.9	Charakterisierung der <i>LiP300</i>^{-/-}-Deletionsmutante	115
3.9.1	Morphologie der <i>LiP300</i> ^{-/-} -Promastigoten	115
3.9.2	Erhöhte Miltefosin-Sensitivität der <i>LiP300</i> ^{-/-} -Promastigoten	115
3.9.3	Verlangsamtes Wachstum von <i>LiP300</i> ^{-/-} -Promastigoten bei hohen Zelldichten	117
3.9.4	Höhere Wachstumsrate der <i>LiP300</i> ^{-/-} -Promastigoten in konditioniertem Medium	118
3.9.5	Makrophagen-Infektion der <i>LiP300</i> ^{-/-} -Promastigoten	119
4.	Diskussion	121
4.1	Funktionelle Komplementation als Strategie zur Identifizierung von Miltefosin-Resistenzmarkern	121
4.2	Methodische Aspekte der Selektion und Identifizierung von Miltefosin-Resistenz vermittelnden Genen	123
4.3	Natürliche Chemoresistenz in Patienten-Isolaten	125
4.4	Überprüfung der Miltefosin-Resistenz in promastigoten Leishmanien	127
4.5	<i>pcosM2</i> vermittelt die ausgeprägteste Miltefosin-Resistenz	128
4.6	Miltefosin-Resistenz in intrazellulären Amastigoten	130
4.7	Herstellung einer <i>P300</i>-Deletionsmutante	132
4.8	Die Rolle von <i>P300</i> in der Chemoresistenz	134
4.9	Mögliche biologische Funktionen von <i>P300</i>	137

4.10	Ausblick	140
5.	Zusammenfassung	142
6.	Literaturverzeichnis	145

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Destilliertes Wasser
aa	<i>Amino acid</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AGPC	Alkylglycerophosphocholin
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
ampR	Ampicillin Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
APC	Alkylphosphocholin
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cFA	komplettes Freund'sches Adjuvanz
Chr.	Chromosom
CIP	<i>Calf intestine phosphatase</i>
CL	kutane Leishmaniase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cos	Cosmid
CR1	Komplementrezeptor
d.h.	das heisst
DAG	Diacylglycerin
ddNTP	Didesoxy-Nukleotriphosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum

FIGE	Feldinversions-Gelelektrophorese
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GA	Geldanamycin
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GIPL	Glykosylinositolphospholipid
h	Stunden
HEPES	4-2-Hydrogenethylpiperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSP	Hitzeschock Protein
hygro	Hygromycin
IC	<i>inhibition concentration</i>
iFA	<i>incomplete</i> Freund'sches Adjuvanz
Ig	Immunglobulin
iNOS	induzierbare Stickstoffsynthase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
L.	<i>Leishmania</i>
lac	Laktose Operon
LB	Luria-Bertani
Ld	<i>Leishmania donovani</i>
Li	<i>Leishmania infantum</i>
LPG	Lipophosphoglykan
M	Mol pro Liter (molar)
mA	Milliampere
max.	maximal
Mb	Megabasen
mcs	multiple Klonierungstelle
MDR	<i>multidrug resistance</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRP	Multi drug resistance related protein

ms	Millisekunden
MW	<i>molecular weight</i>
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
neoR	Neomycin Resistenz
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	Nanosekunden
OD	optische Dichte
OH-	Hydroxylgruppe
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Plasmid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEN	Pentamidin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PIP	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKDL	Post-Kala-Azar dermale Leishmanoid
PLC	Phospholipase C
pmol	picomol
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur; reverse Transkriptase
SAT	Streptothricin-acetyltransferase
SbIII	dreiwertiges Antimon
SbV	fünfwertiges Antimon
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunden
sog.	sogenannte/s
SPF	<i>specific free pathogen</i>
SSC	„standard saline-citrate“ (Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer)
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
U	Unit (enzymatische Wirkungseinheit)
ump	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VL	viszerale Leishmaniase
WT	Wildtyp
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-phosphat
Z	Zellen
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	zwei dimensional

1. Einleitung

1.1 *Leishmania*: Lebenszyklus und Invasionsstrategien

Leishmanien sind parasitische Protozoen, die zur Ordnung der Kinetoplastida und zur Familie der *Trypanosomatidae* gehören. Das wesentliche Merkmal der Ordnung ist der sogenannte Kinetoplast, der stets in der Nähe des Geißelbasalkörpers lokalisiert ist, und mit dem einzigen Mitochondrium der Zelle assoziiert ist. Der Kinetoplast enthält ca. 15% der gesamten zellulären DNA (Gessner A., 1994). Die einzelligen Flagellaten wurden erstmals 1903 - unabhängig voneinander- von dem britischen Pathologen und Militärarzt Sir William Leishman und von Charles Donovan beschrieben (Bailey H., 1959; Fulton J.D., 1949).

Leishmanien besitzen einen zweiphasigen Lebenszyklus. Sie werden durch weibliche, blutsaugende Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* (Europa, Afrika und Asien) und *Lutzomyia* (Zentral- und Südamerika) auf verschiedene Säugetierspezies, einschließlich des Menschen, übertragen (Harms-Zwingenberger G., 1993); TDR: *Report on Leishmaniasis*, 2004). Im Insektenvektor leben die Parasiten extrazellulär, als längliche (10-20 μm), begeißelte Promastigoten. Im Säugetierwirt existieren sie fast ausschließlich in den Zellen des retikuloendothelialen Systems als 2-5 μm große Amastigoten (Gessner A., 1994). Diese besitzen nur ein rudimentäres Flagellum.

1.1.1 Differenzierung im Insektenvektor

Während einer Blutmahlzeit der Sandmücke an einem infizierten Säugetier, gelangen Wirtszellen, die amastigote Leishmanien enthalten, in den Verdauungstrakt des Insekts. Im Darmlumen erfolgt durch den Verdauungsprozess die Freisetzung der Amastigoten aus den Wirtszellen. Innerhalb von 12-24 Stunden findet die Umwandlung der Amastigoten in nicht-infektiöse, prozyklische Promastigoten statt. In den ersten zwei Tagen befinden sich die Parasiten in der peritrophen Matrix des Mitteldarms. Diese Matrix wird von den Darmepithelzellen abgesondert und schützt die Parasiten vor proteolytischen Enzymaktivitäten (Pimenta P., 1997).

Nach drei Tagen beginnt sich die peritrophe Matrix aufzulösen und setzt die Parasiten frei. Um nicht aus dem Darm ausgeschieden zu werden, heften sich die Leishmanien mit ihren Flagellen über das Hauptoberflächenmolekül der Promastigoten, das Lipophosphoglykan (LPG), zwischen die Mikrovilli des Mitteldarmepithels und beginnen, sich durch Zweiteilung

zu vermehren (Pimenta P., 1992). Für die vektorspezifische Bindung der jeweiligen *Leishmania*-Spezies ist vermutlich der Polymorphismus der endständigen Saccharide der LPGs verantwortlich (Pimenta P., 1994). Gelangen Leishmanien bei einer Blutmahlzeit der Insekten nicht in ihren natürlichen Vektor, werden sie später im Verdauungstrakt abgetötet und ausgeschieden. Bisher ist nicht viel über die LPG-Rezeptoren der Mikrovilli bekannt. Es wird vermutet, dass es sich um Lektin-ähnliche Moleküle handelt. Kamhawi und Mitarbeiter (Kamhawi S., 2004) konnten zeigen, dass *L. major*-LPG an ein Galectin aus dem Mitteldarm von *Phlebotomus papatasi*, dem natürlichen Vektor von *L. major*, binden kann.

Im Verlauf von fünf bis acht Tagen differenzieren die nicht-infektiösen prozyklischen Stadien zu hochgradig infektiösen metazyklischen Promastigoten (Metazyklogenese). Die LPGs erfahren während dieser Differenzierung eine Modifikation in ihren endständigen Zuckerbestandteilen. Dadurch geht die Fähigkeit zur Bindung an das Darmepithel verloren (Pimenta P., 1997; Pimenta P., 1992; Sacks D., 1994; Sacks D.L., 1995a) und es kommt zur Ablösung der Parasiten. Die infektiösen Parasiten gelangen über das Vorderende des Darms in den Ösophagus und Pharynx des Insekts, von wo aus metazyklische Promastigoten bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen Säugetierwirt übertragen werden.

1.1.2 Differenzierung im Säugetierwirt

Leishmanien haben besondere Strategien entwickelt, die sie vor den Zerstörungsmechanismen der Immunabwehr schützen. Im Serum des Säugetierwirts sind die Parasiten zunächst dem Komplementsystem ausgesetzt (Bogdan C., 1990). Metazyklische Promastigoten sind resistent gegenüber Komplement-vermittelter Lyse. Der lytische C5b-9 Komplex wird, im Unterschied zu prozyklischen Promastigoten, nicht in die Membran von metazyklischen Promastigoten integriert (Puentes S.M., 1990). Diese Resistenz ist auf die veränderte LPG-Struktur der metazyklischen Promastigoten zurückzuführen (Sacks D.L., 1995a). Die Phosphorylierung von C3, C5 und C9 durch Proteinkinasen, die verstärkt in metazyklischen Leishmanien exprimiert werden, verhindert die Aktivierung des klassischen und des alternativen Komplementweges (Hermoso T., 1991; Sacerdoti-Sierra N., 1997). Einige Faktoren des Komplementsystems werden sogar für die „stille“ Invasion der Parasiten in die Makrophagen genutzt. Der Komplementfaktor C3b bindet an LPG-Moleküle und an das gp63 auf der Zelloberfläche der Promastigoten (Opsonierung). Gp63, eine Metalloprotease, wird verstärkt in metazyklischen Promastigoten exprimiert und hydrolysiert eine große Anzahl von Substraten (Bouvier J., 1989; Chaudhuri G., 1989). Durch die proteolytische Aktivität des gp63 kommt es zu einer schnellen Spaltung von C3b in iC3b (inaktive Form des C3b), so dass keine Bindung der terminalen Komponenten des

Komplementssystemen an C3b stattfinden kann, und dadurch die Lyse der Parasiten verhindert wird (Brittingham A., 1995; Joshi P.B., 1998). Die opsonierten Leishmanien binden über C3b und iC3b an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen, und werden phagozytiert.

Die Leishmanien befinden sich nach Internalisierung in den Phagosomen der Makrophagen. Das Phagosom (parasitophore Vakuole) verschmilzt mit Endosomen und Lysosomen zum sogenannten Phagolysosom. Die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom wird von den LPGs der metazyklischen Promastigoten verzögert. Dies gibt den Parasiten mehr Zeit für die Differenzierung zur Amastigote. Diese ist resistenter gegenüber den lysosomalen Enzymen und besser an das saure Milieu im Phagolysosom angepasst (Bogdan C., 1998; Dermine J.F., 2000; Desjardins M., 1997).

In den Makrophagen sind die Leishmanien mikroziden Abwehrmechanismen ausgesetzt. Amastigoten sind in der Lage, dem „oxidative burst“, der Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid-Anionen (O_2^-), entgegen zu wirken (Passwell J., 1994). Descoteaux *et al.* (Descoteaux A., 1992) konnten zeigen, dass LPG die Proteinkinase C (PKC)-Aktivität der Makrophagen hemmt. Die PKC stellt ein wichtiges Enzym für den „oxidative burst“ dar. Weiterhin sind LPGs und Enzyme der Leishmanien wie die Gluthationperoxidase und die Superoxid-Dismutase am Abbau der toxischen Sauerstoffmetabolite beteiligt (Chan J., 1989). Lysosomale Enzyme und Hydrolasen werden durch LPG und gp63 inaktiviert (Titus R. G., 1993). Auch das Hauptoberflächenmolekül der Amastigoten, das Glykosylinositolphospholipid (GIPL), hat einen inhibierenden Effekt auf die PKC-Aktivität. Zusätzlich kann es die Expression von iNOS (induzierbare Stickoxid-Synthase), die für die Bildung des toxischen Stickoxids verantwortlich ist, hemmen (McNeely T.B., 1989; Proudfoot L., 1995).

Die Amastigoten vermehren sich durch Zweiteilung bis es zur Lyse des Makrophagen kommt. Freigesetzte Amastigoten werden erneut von Makrophagen durch rezeptorvermittelte Phagozytose aufgenommen. Einige Parasiten werden von Monozyten des peripheren Bluts phagozytiert. Diese können mit der Blutmahlzeit von Sandmücken aufgenommen werden, wo es wiederum zur Differenzierung hin zu Promastigoten kommt.

1.2 Leishmaniasen

Unter dem Begriff „Leishmaniasen“ werden unterschiedliche Krankheitsformen zusammengefasst, die von verschiedenen *Leishmania*-Arten hervorgerufen werden. Weltweit sind etwa 12 Millionen Menschen in 88 Ländern mit Leishmanien infiziert. Etwa 350 Millionen Menschen leben mit dem täglichen Risiko einer Infektion, und die Zahl der geschätzten jährlichen Neuerkrankungen beträgt zwei Millionen jährlich (WHO, <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>; (Desjeux P., 2001). Beim Menschen lassen sich Leishmaniasen aufgrund der klinischen Verläufe in drei Gruppen unterteilen: Kutane-, mukokutane- und viszerale Leishmaniose. Die Krankheitsform hängt von der infizierenden *Leishmania*-Spezies sowie vom Immunstatus des Wirtes ab.

1.2.1 Kutane Leishmaniose (Hautleishmaniose, Orientbeule)

Die kutane Leishmaniose (CL) wird in der alten Welt von *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* hervorgerufen. Das Vorkommen der Erreger erstreckt sich vom indischen Subkontinent über Zentralasien in den Mittelmeerraum und in die Sahelzone. In der Neuen Welt sind die Erreger des *L. braziliensis*- und *L. mexicana*-Komplexes für die Krankheit verantwortlich. Die Verbreitung der kutanen Leishmaniose der Neuen Welt reicht von Südtexas bis Nordargentinien. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beträgt ca. 1-1,5 Millionen weltweit. Bei der Hautleishmaniose unterscheidet man die lokalisierte Form (*L. major*, *L. tropica*) mit einer auf eine bestimmte Körperregion begrenzte Läsion, und die diffuse Form (*L. mexicana*) mit einer Vielzahl von Läsionen an verschiedenen Körperregionen. Nach 2 – 6 Wochen bilden sich an der Bissstelle kleine Knötchen oder Papeln, die sich im Verlauf der Krankheit vergrößern und zu ulzerieren beginnen. Bakterielle Sekundär-Infektionen komplizieren den Krankheitsverlauf. Nach einem Jahr kommt es zur spontanen Heilung, wobei typische Narben und eine lebenslange Immunität zurück bleiben. Eine Spontanheilung tritt bei der diffusen kutanen Leishmaniose nicht auf, und der Behandlungserfolg ist nur minimal (Piekarski, 2002).

1.2.2 Mukokutane Leishmaniasen (Schleimhautleishmaniose, Espundia)

Die mukokutane Leishmaniose wird von Erregern des *L. (Viannia) braziliensis*-Komplexes verursacht, und kommt ausschließlich in Süd- und Mittelamerika vor. Die Espundia stellt eine Komplikation der kutanen Leishmaniose dar. Nach der primären Hautläsion befallen die Erreger die oralen und nasalen Schleimhäute. Bei einer unbehandelten Espundia kann es zur Zerstörung der gesamten Nasenschleimhaut, des Nasenseptums, der Lippen und des

Gaumens kommen. Der Krankheitsverlauf kann sich über mehrere Jahre erstrecken und führt unbehandelt meist durch Superinfektion zum Tod.

1.2.3 Viszerale Leishmaniase (Kala-Azar, Dum-Dum Fieber)

Die viszerale Leishmaniase (VL) ist die schwerwiegendste Form der Leishmaniasen, mit ca. 500.000 Neuinfektionen jährlich. Sie wird durch Erreger des *L. donovani*-Komplexes (*L. donovani* und *L. infantum* in der Alten Welt) und *L. infantum/chagasi* (Neue Welt) verursacht. Kala-Azar (Hindi: schwarzes Fieber) tritt in Ländern Südeuropas, im vorderen Orient, in Nordafrika, auf dem indischen Subkontinent und in Südamerika auf. Die Inkubation kann wenige Wochen bis zu zwei Jahren betragen. Erreger dieser Krankheitsform befallen innere Organe, insbesondere Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Es setzen unregelmäßige Fieberschübe ein und es kommt zur Vergrößerung der Milz und Leber (Splenomegalie und Hepatomegalie), zur Anämie und zur Verdunklung der Haut. Unbehandelt liegt die Lethalität der Kala-Azar bei fast 100%, und der Tod tritt meist während der ersten beiden Jahre nach Krankheitsbeginn auf (Gessner A., 1994). Bei unzureichender Behandlung kann das post-Kala-Azar dermale Leishmanoid (PKDL) auftreten (hauptsächlich in Sudan und Kenia) (Ramesh V., 1995; Zijlstra E.E., 2001). Dabei handelt es sich um Knötchen, die bevorzugt im Gesicht wachsen, und sich später auf den gesamten Körper verteilen. Diese Knötchen enthalten Erreger und sind verantwortlich für das Fortbestehen der Infektion. Patienten mit PKDL werden somit zur Infektionsquelle für den Vektor.

1.3 Therapie von Leishmaniasen

Eine „Impfung“ gegen die kutane Leishmaniase (CL) wurde im mittleren Osten schon vor Jahrhunderten durchgeführt. Aufgrund der Beobachtung, dass die selbst heilende CL eine lebenslange Immunität hinterlässt, wurden uninfizierte Kinder mit infiziertem Ulkusmaterial inokuliert (*leishmanization*) (Handman E., 1997); TDR: *Report on Leishmaniasis*, 2004}. Diese Praxis wird heute noch in einigen Regionen, hauptsächlich in Usbekistan, in kontrollierter Form durchgeführt (Khamesipour A., 2006; Selvapandiyani A., 2006). Die erworbene Immunität ist nur gegen *L. tropica*-Infektionen wirksam.

Trotz vieler Studien gibt es derzeit keine Impfstoffe gegen kutane Leishmaniasen der Neuen Welt und gegen die viszerale Leishmaniase (Kedzierski L., 2006). Auch eine medikamentöse Prophylaxe ist nicht möglich. Leishmaniasen zählen zu den sogenannten „vernachlässigten Krankheiten“ (DNDi: www.dndi.org; WHO: http://www.who.int/neglected_diseases/), für die bisher wenig in die Entwicklung von Medikamenten investiert wurde. Dies spiegelt sich in der

geringen Anzahl von verfügbaren Medikamenten wieder (Tab. 1), die nicht speziell gegen diese Erkrankungen entwickelt wurden, und die zudem schon seit Jahrzehnten zur Anwendung kommen.

Seit den 40er Jahren werden Leishmaniasen (CL und VL) mit pentavalenten Antimonpräparaten behandelt, die auch heute noch in Entwicklungs- und Schwellenländern Mittel der Wahl sind (WHO, <http://www.who.int/leishmaniasis/research/>). Dabei werden Pentostam (Natriumstibogluconat) und Glucantim (N-Methylglucaminantimonat) am häufigsten verwendet. Die Wirkungsmechanismen der Antimonverbindungen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Mehrere Stoffwechselwege, z.B. die Glykolyse und der Thiol-Metabolismus werden durch Antimon gestört (Berman J. D., 1987; Wyllie S., 2004). Die Behandlung mit hochgiftigen Antimonpräparaten ist nur stationär durchführbar, geht mit starken Nebenwirkungen einher und wird durch die zunehmende Resistenzentwicklung eingeschränkt.

Bei Therapieresistenzen (CL und VL) kommen gewöhnlich Pentamidinpräparate (Diamidine) zum Einsatz. Es wurde gezeigt, dass sich Pentamidin im Mitochondrium der Parasiten anreichert, und die mitochondriale Topoisomerase II inhibiert (Basselin M., 1996). Nachteile dieser Therapieform sind schwere Nebenwirkungen und eine steigende Zahl von Patienten, die nicht mehr auf eine Pentamidintherapie ansprechen (Sundar S., 2000a).

Alternativ wird bei Therapieresistenzen seit den 60er Jahren auch Amphotericin B Deoxycholat (Polyenantibiotikum) verwendet. Der Wirkungsmechanismus beruht auf Inhibierung der Ergosterol-Synthese, welches ein Bestandteil der *Leishmania*-Membran ist. Obwohl die Behandlung mit Amphotericin B sehr effektiv ist, wird es aufgrund der hohen Toxizität nur begrenzt eingesetzt. Neue Lipidformulierungen von Amphotericin B sind deutlich besser verträglich, für die betroffenen Menschen in Entwicklungsländern jedoch nicht bezahlbar (Sundar S., 2000b). Bisher sind nur wenige Fälle von klinischer Amphotericin B-Resistenz aufgetreten. Durch den zunehmenden Einsatz des Therapeutikums in Fällen von Antimonresistenz, und durch die verlängerte Halbwertszeit der Lipidformulierungen, muss jedoch in naher Zukunft mit verstärkter Amphotericin B-Resistenz gerechnet werden.

Paromomycin zählt zu den Aminoglykosidantibiotika und wurde erst kürzlich (2006) nach erfolgreichen Phase III Studien in Indien als Medikament zur Therapie von VL zugelassen (Croft S.L., 2006a); www.oneworldhealth.org/diseases/leishmaniasis_program.php). Der Wirkungsmechanismus von Paromomycin in Bakterien beruht auf der Bindung an die 16S

rRNA der 30S Untereinheit der Ribosomen, die zur Inhibierung der Proteinsynthese führt. Ribosomen könnten auch in Leishmanien Ziele des Paromomycins sein (Maarouf M., 1995). Die anti-bakterielle Aktivität des Medikaments ist ein weiterer Vorteil, da gleichzeitig bakterielle Infektionen, die häufig mit VL assoziiert sind, behandelt werden könnten (Sundar S., 2001).

Die übliche Form der Behandlung mit den verfügbaren Medikamenten ist nach wie vor eine intravenöse Therapie, die mit einem stationären Aufenthalt verbunden ist.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten anti-*Leishmania* Wirkstoffe und der Resistenzentwicklung (modifiziert nach Clos and Choudhury, 2006)

Medikament	Resistenz <i>in vitro</i>	Fälle von Therapieresistenz
Pentvalente Antimonverbindungen	✓ (Ouellette M., 2004)	✓ (Sundar S., 2001)
Pentamidin	✓ (Coelho A.C, 2003)	✓ (Jha S.N., 1991)
Amphotericin B	✓ (Singh A.K., 2001)	✓ (Di Giorgio C., 1999)
liposomales Amphotericin B	✗	✗
Miltefosin	✓ (Seifert K., 2003)	✗
Paromomycin	✓ (Cotrim P.C., 1999)	✓ (Teklemariam S., 1994)
Sitamaquine (befindet sich in Phase II Studien zur Behandlung von VL)	✓ (Loiseau P.M., 2006)	✗

✗ = keine Daten vorhanden; ✓ = Resistenz vorhanden

1.4 Miltefosin

Ein relativ neu entwickeltes Medikament ist Impavido™, welches den Wirkstoff Miltefosin enthält. Nach erfolgreichen klinischen Studien, mit Heilungsraten von 95%, wurde es 2002 in Indien für die Behandlung von VL zugelassen (Bhattacharya S.K., 2004; Sundar S., 2002). Es wurden annähernd gleiche Heilungsraten bei Erstinfektionen (92%) sowie bei Fällen von Antimonresistenz (95%) erzielt. Die beobachteten Nebenwirkungen beschränkten sich auf Erbrechen und Diarrhöe, die nur von kurzer Dauer waren und die Fortführung der Therapie nicht behinderten. Ein großer Vorteil von Miltefosin ist, dass es oral verabreicht werden kann,

und dadurch ein Krankenhausaufenthalt entfällt. Dies ermöglicht die Behandlung von Patienten, die zuvor aufgrund der hohen Kosten und beschränkten Krankenhauskapazitäten nicht therapiert werden konnten.

Studien in Europa zeigten, dass Miltefosin in 64% der VL-Patienten, die eine HIV-Koinfektion aufwiesen, eine Heilung (43%) oder eine deutliche Verbesserung herbeiführte (Sindermann H., 2004). Bei diesen Patienten waren Standardtherapien nicht mehr wirksam. In klinischen Studien für die Behandlung von kutaner und mukokutaner Leishmaniose der Neuen Welt erzielte Miltefosin, im Vergleich zu Antimon und Amphotericin B, ebenfalls gleich gute bzw. bessere Heilungsraten (Soto J., 2004; Soto J., 2007). Demnach ist eine Therapie der CL und der mukokutane Leishmaniasis mit Miltefosin in Südamerika möglich.

1.5 Wirkungsmechanismen des Miltefosins

Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) wurde ursprünglich im Rahmen der Krebsforschung entwickelt und gehört zur Gruppe der Alkylphosphocholine (APC). Ebenso wie die Alkylglycerophosphocholine (AGPC), zu denen Edelfosin zählt, sind APCs synthetische Analoga des Lyso-Phosphatidylcholins. Im Gegensatz zu Edelfosin besitzt Miltefosin kein Glycerin-Rückgrat mehr, und ist damit resistenter gegenüber den Phospholipid-spaltenden Enzymen (Hilgard P., 1993). In klinischen Studien zur Behandlung von Karzinomen führte die orale Verabreichung von Miltefosin zu schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen. Miltefosin (6% Miltefosin, Miltex™) kommt deshalb lediglich als topische Anwendung zur lokalen Behandlung von Hautmetastasen des Mammakarzinoms zum Einsatz (de Castro S.L., 2004; Unger C., 2001). Die Beobachtung, dass bereits geringe Miltefosin-Konzentrationen im Maus-Modell den Zelltod in *Leishmania* auslösen (Croft S.L., 1987; Kuhlencord A., 1992), führte zur Entwicklung von Impavido™ (Croft S.L., 2006).

1.5.1 Wirkungsmechanismen des Miltefosins in Tumorzellen

In zahlreichen Studien wurden die Wirkungsmechanismen von APCs und AGPCs in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei konnten mehrere Wirkorte (*drug targets*) identifiziert werden. Während klassische Antitumor-Chemotherapeutika überwiegend durch Schädigung der DNA wirken, interagieren APCs und AGPCs, aufgrund ihres lipophilen Charakters mit verschiedenen subzellulären Strukturen und Enzymen der Zellmembran. Sie beeinflussen die Membran-Permeabilität und -Fluidität, verändern die Lipid-Zusammensetzung der Membran, und wirken auf die Synthese von Phospholipiden (Jendrossek V., 2003; Unger C., 2001).

Besonders intensiv wurde der Effekt von Miltefosin und Edelfosin auf die Synthese von Phosphatidylcholin (PC) untersucht. Beide Wirkstoffe inhibieren die *de novo* Synthese von PC, die in Säugetierzellen hauptsächlich über den CDP-Cholin *pathway* (*Kennedy pathway*) abläuft. Dabei wird die Translokation des Schlüsselenzyms der PC-Biosynthese (CTP:phosphocholin-cytidyltransferase), von der inaktiven zytosolischen Form zur aktiven Membran-gebundenen Form verhindert (Geilen C.C., 1992; Haase R., 1991; Jendrossek V., 2003; Wieder T., 1999). Die Cholin-Gruppe von Miltefosin und Edelfosin scheint essentiell für die Inaktivierung dieses Enzyms zu sein, da Hexadecylphosphoethanolamin und Hexadecylphosphoserin nicht zu einer Inhibierung der PC-Synthese führten (Boggs KP, 1995a; Wieder T., 1998).

Da Sphingomyeline aus Ceramiden und PC bestehen, wird ihre Biosynthese ebenfalls von Miltefosin beeinträchtigt. Dies führt zur Anreicherung von Ceramiden in der Zelle, die über weitere Faktoren den mitochondrialen Weg der Apoptose einleiten. Ein Miltefosin-induzierter Zelltod konnte durch Fumonisin-B1, ein Inhibitor der Ceramid-Synthese verhindert werden (Wieder T., 1998).

In Tumorzellen wurde beobachtet, dass Miltefosin die Signaltransduktion durch Inaktivierung der Membran-gebundenen Phospholipase C (PLC) stört. Die PLC ist ein Schlüsselenzym im Phosphoinositidstoffwechsel und katalysiert die Bildung von Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂). IP₃ und DAG stellen wichtige *second messenger* dar. IP₃ bewirkt die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG an der Aktivierung der Calcium-abhängigen Protein Kinase C (PKC), einem wichtiger Regulator des zellulären Wachstums, beteiligt ist (Grunicke H.H., 1996; Jendrossek V., 2003; Nishizuka Y., 1992).

1.5.2 Wirkungsmechanismen des Miltefosins in *Leishmania*

Untersuchungen, die in *Leishmania* durchgeführt wurden, geben noch kein einheitliches Bild von den Wirkungsmechanismen des Miltefosins wieder. Die Kultivierung von *L. donovani*-Promastigoten und -Amastigoten mit Miltefosin führte zu einem Apoptose-ähnlichen Zelltod, der gekennzeichnet war durch Zellschrumpfung, DNA-Kondensation, DNA-Fragmentierung (Bildung einer DNA-Leiter) und durch die Umlagerung von Phosphatidylserin (PS) auf die Membran-Aussenseite (Paris C., 2004; Verma N.K., 2004). Weiterhin konnte der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, und die Freisetzung von Cytochrom C in Arsenit-resistenten Parasiten festgestellt werden. Freigesetztes Cytochrom C führte zur Aktivierung

einer DNase, die letztendlich die Kinetoplastiden-DNA zerstörte (Santa-Rita R.M., 2004; Verma N.K., 2007).

Wie in Tumorzellen scheint die PC-Biosynthese, die in *Leishmania* noch nicht vollständig aufgeschlüsselt wurde, ebenfalls ein Ziel des Miltefosins zu sein. PC stellt das Haupt-Phospholipid der *Leishmania*-Membran dar, gefolgt von Phosphatidylethanolamin (PE). In Miltefosin-behandelten *L. donovani*-Promastigoten wurde eine Abnahme des PC-Gehalts festgestellt. Gleichzeitig konnte eine Zunahme des PE-Gehalts verzeichnet werden. Die Autoren postulieren eine partielle Inhibition der PE-*N*-Methyltransferase durch Miltefosin (Rakotomanga M., 2007). Dieses Enzym katalysiert die Synthese von PC durch den Transfer von drei Methylgruppen an PE (*Greenberg pathway*). Eine Inaktivierung der PE-*N*-Methyltransferase durch Miltefosin wurde bereits in Tumorzellen beschrieben (Jimenez-Lopez J.M., 2003). Diese Hypothese wird weiterhin durch Untersuchungen von Lira *et al.* (Lira R., 2001) unterstützt, die eine Umkehrung des PC/PE-Verhältnisses in Miltefosin-behandelten *Trypanosoma cruzi* Epimastigoten (Erreger der Chagas-Krankheit, Kinetoplastida) beobachteten. Miltefosin könnte demnach selektiv auf die PC-Synthese von Kinetoplastiden wirken, während Säugetierzellen einen anderen Synthese-Weg für PC (*Kennedy pathway*) bevorzugen.

In *L. mexicana*-Promastigoten wurde der Effekt von Miltefosin auf den Ether-Lipid Stoffwechsel untersucht. Ether-Lipide sind Bestandteile der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Glykolipide (z.B. LPG, GIPL) und Glykoproteine (z.B. gp63), die sich in großen Mengen auf der Zelloberfläche der Leishmanien befinden. Lux und Mitarbeiter (Lux H., 2000) zeigten, dass die im Glykosom lokalisierte Alkyl-spezifische-acyl-CoA Acyltransferase, ein Enzym das am Ether-Lipid *remodelling* beteiligt ist, durch Miltefosin inhibiert wird. Wie in 1.1 bereits erwähnt, sind LPG, GIPL und gp63 für das Überleben des Parasiten im Makrophagen verantwortlich, indem sie die PKC-Aktivität beeinflussen und so dem „oxidative burst“ entgegenwirken.

Auch eventuelle immunmodulatorische Effekte des Miltefosins wurden in einigen Studien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Wirkung von Miltefosin in immundefizienten, mit Leishmanien infizierten Mäusen ähnlich ist wie in immunkompetenten Mäusen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Miltefosin eine direkte Wirkung besitzt und keine T-Zell- und Makrophagen-Aktivierung benötigt (Escobar P., 2001; Murray H.W., 2000).

Bisher konnte weder in Tumorzellen noch in *Leishmania* der genaue Wirkungsmechanismus von Miltefosin entschlüsselt werden. Die zahlreichen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass es mehrere *drug targets* geben muss. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *drug targets* von Miltefosin, in Tumorzellen und in *Leishmania* nicht dieselben sind. Das Hauptziel von Miltefosin scheint jedoch die Lipid-Biosynthese zu sein.

1.6 Chemoresistenz im Allgemeinen

Mit Chemoresistenz wird die verringerte Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber einem Zytostatikum im Vergleich zu einer anderen Zelle bezeichnet. Diese Resistenz kann primär bzw. intrinsisch sein, oder sich im Verlauf einer Chemotherapie entwickeln. Diese sekundäre Resistenz kann durch einen Selektionsvorteil von bereits resistenten Subpopulationen entstehen, oder erst durch die Behandlung mit Zytostatika induziert werden.

Die Resistenz von Zellen gegenüber einer Vielzahl von chemisch völlig unterschiedlichen Zytostatika, wird als pleiotrope Resistenz oder *multidrug resistance* (MDR) bezeichnet.

Die molekularen Mechanismen, die zur Resistenz führen sind vielfältig und werden hier nur im allgemeinen vorgestellt (Croft S.L., 2006b; Ouellette M., 2001):

- Die intrazelluläre Konzentration des Zytostatikums kann verringert werden, durch Verlust des Aufnahme-Systems, durch Veränderung der Membran-Zusammensetzung, durch schnellere Metabolisierung, und durch verstärkten Efflux des Zytostatikums.
- Die Interaktion des Zytostatikums mit dem Zielmolekül kann beeinträchtigt werden, durch Modifikation des Zielmoleküls, und durch vermehrte Expression von konkurrierenden Substraten.
- Verstärkte Expression des Zielmoleküls kann zur Titration des Zytostatikums führen.
- Die Kompartimierung des Zytostatikums führt zu einer räumlichen Trennung vom seinem Zielmolekül.
- Durch Inaktivierung oder verminderte Aktivierung des Zytostatikums kann keine Interaktion mit dem Zielmolekül stattfinden.
- Es kann eine verstärkte Reparatur der entstehenden Schäden stattfinden.
- Ein alternativer Mechanismus kann die Funktion des inaktiven Zielmoleküls übernehmen (Tolerierung des blockierten Mechanismus).
- Der Zelltod kann durch Inhibierung der Apoptose-Wege verhindert werden.

Einige dieser Resistenzmechanismen wurden in parasitischen Protozoen beobachtet (Ouellette M., 2001).

1.6.1 Mechanismen der Miltefosin-Resistenz in Tumorzellen

Es gibt nur wenige Untersuchungen zur Miltefosin-Resistenz in Tumorzellen. In Miltefosin-resistenten KB- (humane epidermoide Tumorzellen) und HL60-Zellen (humane Leukämiezellen) konnte eine verminderte Aufnahme und ein schnellerer Abbau von Miltefosin beobachtet werden (Berkovic D., 1994; Fleer E.A., 1996).

Die Expression des *multidrug resistance* Gens (*MDR1*), dessen Genprodukt das P-Glykoprotein ist, wurde ebenfalls in Miltefosin-resistenten KB-Zellen nachgewiesen. P-Glykoproteine gehören zur Familie der ABC-Transporter, und sind verantwortlich für den Energie-abhängigen Efflux von Substanzen. Die Überexpression von P-Glykoproteinen kann zum MDR-Phänotyp führen. In diesen Zellen wurde Resistenz gegenüber weiteren Ether-Lipid-Analoga beobachtet. Zusätzlich war in dieser Zelllinie die Expression von Bcl-2, einem anti-apoptischen Protein, deutlich erhöht (Fu D., 1999).

In einer weiteren Untersuchung zeigten verschiedene *MDR1*-exprimierende Tumorzelllinien eine deutliche Resistenz gegenüber Miltefosin. Die Transfektion von *MDR1* in sensitive Tumorzellen führte ebenfalls zur Miltefosin-Resistenz. Die Expression von *MDR2* dagegen korrelierte nicht mit einer Resistenz gegenüber Miltefosin. Die ATPase-Aktivität der P-Glykoproteine wurde durch Miltefosin inhibiert. Bindungsstudien zeigten, dass Miltefosin an P-Glykoproteinen binden kann. Die Resultate deuten daraufhin, dass Miltefosin mit der transmembranen Domäne interagiert und nicht mit der zytosolischen Nukleotid-bindenden Domäne (Rybczynska M., 2001a). Das Auftreten von Miltefosin-Resistenz in Tumorzellen könnte demnach auf eine erhöhte *MDR1*-Expression zurückzuführen sein.

1.6.2 Mechanismen der Miltefosin-Resistenz in *Leishmania*

Miltefosin wurde erst kürzlich zur Therapie von VL in Indien zugelassen. Fälle von klinischer Therapieresistenz sind deshalb noch nicht bekannt geworden. Resistenz gegen Zytostatika kann in *Leishmania* einfach induziert werden, z.B. durch Langzeitkultivierung unter subletalen Konzentrationen und allmählicher Erhöhung der Wirkstoff-Konzentration. Einige Miltefosin-resistente Zelllinien wurden bereits charakterisiert.

Eine *MDR1*-überexprimierende *L. tropica*-Zelllinie, die auf Daunomycin-Resistenz selektiert wurde, war kreuzresistent gegenüber Miltefosin und Edelfosin. Die Kultivierung der Zellen mit Miltefosin und einem Inhibitor von P-Glykoprotein-ähnlichen Transportern, Sesquiterpen C-3, führte zu einer Abnahme der Miltefosin-Resistenz. Diese Resultate deuten darauf hin, dass wie in Tumorzellen, auch in *Leishmania*, Miltefosin-Resistenz mit einer erhöhten *MDR1*-

Expression assoziiert sein kann (Perez-Victoria F.J., 2006; Perez-Victoria J.M., 2001). P-Glykoprotein-ähnliche Transporter sind in *Leishmania* in einer Vielzahl von sekretorischen Kompartimenten lokalisiert, wie im Golgi-Apparat, im endoplasmatischen Retikulum und in *multivesicular tubule* (MVT)-Lysosomen (Dodge M.A., 2004). Die Autoren nehmen an, dass Miltefosin und weitere Substanzen über P-Glykoprotein-ähnliche Transporter in diese Kompartimente gelangen, und anschließend über Exozytose ausgeschieden werden.

Miltefosin-resistente *L. donovani*-Zellen zeigten Resistenz gegen Edelfosin, jedoch nicht gegenüber weiteren anti-*Leishmania* Medikamenten. In diesen Zellen fand keine Überexpression von P-Glykoproteinen statt. Genamplifikation, ein bekannter *in vitro* Resistenzmechanismus in Leishmanien, wurde ebenfalls nicht beobachtet (Segovia M., 1994; Seifert K., 2003). Dagegen wurde ein Zusammenhang zwischen Resistenz und verringerter Akkumulation von Miltefosin festgestellt. Die verminderte Anreicherung wurde durch einen Defekt im Transport von Miltefosin von der äußeren zur inneren Seite der Plasmamembran ausgelöst (Perez-Victoria F.J., 2003a). Dieser Transport wird auch als *inward translocation* bezeichnet. Durch funktionelle Komplementation konnte die Miltefosin-Translokase, LdMT, isoliert werden. Die Transfektion von *LdMT* in resistente Promastigoten führte zu einer erhöhten Miltefosin-Empfindlichkeit. LdMT zählt zu einer neuen Gruppe von P₄-Typ ATPasen, die zur Subfamilie der Aminophospholipid-Translokasen gehören (Perez-Victoria F.J., 2003b). Im Miltefosin-resistenten Stamm tragen beide Allele des LdMT-Gens einzelne, aber verschiedene Punktmutationen. In weiter führenden Untersuchungen wurde die β -Unterheit von LdMT, LdRos3, identifiziert. Beide Proteine werden für die Translokation von Miltefosin benötigt und sind in der Plasmamembran lokalisiert. Die Deletion von *LdMT* bzw. *LdRos3*, bzw. die Inaktivierung eines dieser Proteine durch Einführung von Punktmutationen, führte zur Zurückhaltung des anderen Proteins im endoplasmatischen Retikulum (Perez-Victoria F.J., 2006). Demnach gehören LdMT und LdRos3 zur selben Translokations-Maschinerie. Da bereits Punktmutationen in nur zwei Allelen dieser Proteine zu einer hohen Miltefosin-Resistenz führen, wird die Miltefosin-Empfindlichkeit in *Leishmania* maßgeblich von LdMT und LdRos3 bestimmt.

In denselben Miltefosin-resistenten *L. donovani*-Zellen wurde in weiteren Analysen Veränderungen in der Lipid-Zusammensetzung der Membran festgestellt. Die Plasmamembran enthält, im Vergleich zu den entsprechenden sensitiven Zellen, einen geringeren Anteil von ungesättigten Fettsäuren. Dies führt zu einer niedrigeren Membran-Fluidität in resistenten Promastigoten. Der Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren (bis C₁₆) in resistenten Zellen ist ca. zweimal höher, der Anteil der länger-kettigen Fettsäuren (ab C₁₈) ist

dagegen um die Hälfte geringer als in den sensitiven Zellen. Diese Beobachtungen deuten auf eine partielle Inaktivierung der Enzyme des Desaturase-Systems, und des Fettsäuren-Elongations-Systems in Miltefosin-resistenten *L. donovani*-Promastigoten hin (Rakotomanga M., 2005).

Ein Antimon-resistenter *L. donovani*-Stamm, der aus einem Kala-Azar Patienten isoliert wurde, war kreuzresistent gegenüber Amphotericin B und Miltefosin. Vergleichende Proteom-Analysen des resistenten und des entsprechenden sensitiven Stammes zeigten, dass viele Proteine differentiell exprimiert waren. Die Expression des Hitzeschock-Proteins 83 (HSP83) in resistenten Promastigoten war deutlich erhöht. Die Transfektion von *HSP83* in den sensitiven Stamm führte zu einer zweifach höheren Antimon- und Miltefosin-Resistenz in Promastigoten (Vergnes B., 2007). Die Expression des *small kinetoplast calpain-related protein* (SKCRP 14.1) war in den resistenten Zellen dagegen deutlich herabgesetzt. Die Überexpression von SKCRP 14.1 in resistenten Promastigoten und Amastigoten führte zu einer Abnahme der Antimon-Resistenz, und gleichzeitig zu einer Steigerung der Miltefosin-Toleranz. Beide Medikamente lösen in *Leishmania* einen Apoptose-ähnlichen Zelltod aus (1.5.2). Die Überexpression des gleichen Proteins führt in *L. donovani* zu unterschiedlichen Resultaten des Medikamenten-vermittelten programmierten Zelltods.

1.7 Problematik der Entwicklung und Ausbreitung von therapieresistenter VL

VL tritt meist in ärmlichen, abgelegenen Gebieten auf, in denen keine ausreichende medizinische Versorgung der Bevölkerung gegeben ist. In diesen endemischen Gebieten stellt die Resistenzentwicklung ein großes Problem in der Behandlung der VL dar. In einigen Distrikten im nordindischen Bundesstaat Bihar sprechen über 60% der VL-Patienten, die zuvor noch nie gegen VL behandelt wurden, nicht auf eine Antimon-Therapie an. Dies lässt auf eine Zunahme der primären Antimon-Resistenz schließen (Sundar S., 2000a).

In Indien ist die VL eine Anthroponose, d.h. dass erkrankte Patienten die einzigen Reservoirs für Leishmanien darstellen. Die Zunahme von HIV-Infektionen in abgelegenen Gebieten führt auch zur Zunahme der opportunistischen VL. Sowohl *Leishmania* als auch HIV zerstören Immunabwehrzellen. Die VL beschleunigt das Einsetzen von AIDS, während HIV die Entwicklung der VL vorantreibt. Die Therapie von HIV-Koinfektionen mit Standard-Medikamenten ist aufgrund der verschlechterten Immunkompetenz der Patienten häufig nicht erfolgreich. Im Vergleich zu Patienten ohne zusätzliche HIV-Infektion, ist die Parasitenlast im peripheren Blut der HIV-Koinfizierten Patienten deutlich höher. HIV-

Hauptrisikogruppe für eine Koinfektion sind Konsumenten von intravenösen Drogen, da die mehrfache Verwendung von Injektionsnadeln neben dem HI-Virus auch Leishmanien überträgt. HIV-Koinfizierte Patienten stellen somit ein neues, humanes Reservoir in diesen Ländern dar, das zur Entwicklung eines anthroponotischen Übertragungszyklus beitragen kann. Dies kann wiederum zur Verbreitung von Chemoresistenzen führen (Alvar J., 1997; Bryceson A., 2001; Croft S.L., 2006b). In Zukunft muss auch in Ländern Südeuropas und in Südamerika mit verstärktem Auftreten von klinischer Therapieresistenz gerechnet werden.

Eine Möglichkeit, um der Entstehung und Verbreitung von Chemoresistenzen vorzubeugen, ist die Anwendung von Kombinationstherapien. Durch den kombinierten Einsatz von zwei Medikamenten, die verschiedene Resistenzmechanismen in *Leishmania* hervorrufen, können die Heilungschancen erhöht, und gleichzeitig die Resistenzentwicklung des Erregers verhindert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass Parasiten Resistenz gegenüber zwei Medikamenten entwickeln, die verschiedene Zielmoleküle angreifen, ist sehr gering (White N.J., 2003), außer es kommt zur Ausbildung eines *multidrug resistance*-Phänotyps. Kombinationstherapien werden bereits erfolgreich für die Behandlung von therapieresistenten Malariafällen eingesetzt (Simpson J.A., 2000). Damit Kombinationstherapien gegen VL in Zukunft angewandt werden können, müssen die einzelnen Zielmoleküle, und die molekularen Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber den einzelnen Medikamenten bekannt sein. So kann ausgeschlossen werden, dass zwei kombinierte Medikamente über denselben Resistenzmechanismus unwirksam werden.

1.8 Funktionelle Komplementation in *Leishmania*

Für die Identifizierung und Funktionsanalyse von unbekanntem Genen in *Leishmania* wurde die funktionelle Komplementation schon mehrfach erfolgreich angewandt. Dabei wurden vorzugsweise *Leishmania*-Mutanten, die einen charakteristischen Phänotyp besaßen, mit Cosmidbanken genomischer DNA aus *Leishmania* Wildtyp (WT)-Stämmen transfiziert. Durch stringente Selektion der Transfektanden auf den gewünschten Phänotyp, und die nachfolgende Analyse der entsprechenden Cosmide, konnten die beteiligten Gene identifiziert werden. Die Komplementierung der Leishmanien erfolgt durch die Amplifikation von Genen, die sich auf den Cosmiden befinden (Clos J., 2006).

Mit Hilfe von Komplementationsanalysen konnten Ryan *et al.* (Ryan K.A., 1993) und Descoteaux *et al.* (Descoteaux A., 1995) Gene, die in der Synthese der LPGs involviert sind,

identifizieren. Durch ungerichtete Mutagenese konnten verschiedene LPG-defiziente *L. donovani*-Promastigoten hergestellt werden, die anschließend mit einer genomischen Cosmidbank aus *L. donovani*-WT transfiziert wurden. Die Selektion führte zur Isolation von Parasiten, die wieder LPG synthetisieren konnten. Die Reisolation und Analyse von Cosmiden aus diesen komplementierten Leishmanien, führte zur Identifizierung von *LPG1* und *LPG2*.

Auch für die Identifizierung von molekularen Resistenzmarkern wurde die funktionelle Komplementation bereits angewandt.

Geldanamycin (GA), ein spezifischer Inhibitor von HSP90, induziert in *Leishmania* einen Wachstumsarrest in der G2/M-Phase. In einer Komplementationsanalyse sollten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte durch Überexpression GA binden können (Titration von GA), und dadurch die Inaktivierung von HSP90 aufheben können. Dazu wurden promastigote *L. donovani*-Zellen mit einer genomischen Cosmidbank aus *L. donovani* transfiziert. Die Selektion der Transfektanden fand in Gegenwart von GA statt. Die komplementierten *Leishmania*-Klone, enthielten ausschließlich Cosmid-DNA, die für HSP90 kodierte. Dies lässt vermuten, dass HSP90 das einzige Zielmolekül für GA in *L. donovani* ist (Wiesgigl M., 2001).

In einer weiteren Studie wurde *L. major* mit einer Cosmidbank genomischer DNA aus *L. major*-WT transfiziert. Die Transfektanden wurden einer Selektion mit Pentamidin unterzogen. Die Analyse der Cosmide aus Pentamidin-resistenten Leishmanien, führte zur Identifizierung eines Gens, das für ein P-Glykoprotein-ähnliches Protein kodiert (*pentamidine resistance protein 1*), und durch Überexpression Pentamidin-Resistenz in *Leishmania* vermittelt (Coelho A.C, 2003).

Die Miltefosin-Translokase, LdMT, wurde mittels funktioneller Komplementation identifiziert (1.6.2) (Perez-Victoria F.J., 2003b). Dabei wurden Miltefosin-resistente Promastigoten mit einer genomischen Cosmidbank aus dem entsprechenden sensitiven Stamm komplementiert. Die Analyse von *Leishmania*-Klonen, in denen die Miltefosin-Sensitivität wieder hergestellt war, führte zur Identifizierung von *LdMT*. Weitere Analysen ergaben, dass zwei Punktmutationen in *LdMT* zur Miltefosin-Resistenz führten. Diese Studie zeigt, wie spontane Chemoresistenzen durch funktionelle Komplementation untersucht werden kann.

Die Beispiele zeigen, dass für die Identifizierung von molekularen Resistenzmarkern die funktionelle Komplementation eine geeignete Methode darstellt.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, stellt die zunehmende Resistenzentwicklung ein großes Problem in der Behandlung von VL dar. Gegen neue Medikamente, wie Miltefosin, kann *in vitro* schnell und einfach Resistenz induziert werden (Tab. 1). Miltefosin besitzt in Geweben eine lange Halbwertszeit. Folglich werden subtherapeutische Miltefosin-Konzentrationen lange nach Beendigung der Behandlung im Blutplasma der Patienten vorhanden sein. Dies kann zur Resistenz von Leishmanien gegenüber Miltefosin führen. Der verstärkte Einsatz von Miltefosin als einziges Medikament gegen VL kann die Resistenzentwicklung weiter vorantreiben (Bryceson A., 2001). Demnach muss in Zukunft mit Miltefosin-resistenten Therapiefällen gerechnet werden.

Die molekularen Mechanismen der klinischen Therapieresistenz sind zum größten Teil noch unbekannt. Die Identifizierung von molekularen Resistenzmarkern würde der Entwicklung von neuen Medikamenten und der Erprobung von Kombinationstherapien von Nutzen sein. Weiterhin könnte, mit Hilfe von molekularen Resistenzmarkern, die Ausbreitung der Resistenz erfasst und beobachtet werden (*epidemiological survey*).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels funktioneller Komplementation Gene in *Leishmania infantum* identifiziert werden, die durch Überexpression Miltefosin-Resistenz vermitteln. Der verwendete Klon ist Miltefosin-sensitiv und stammt aus einem HIV-koinfizierten Patienten in Südeuropa. Eine Cosmidbank genomische DNA aus diesem *L. infantum*-Stamm sollte in *L. infantum* transfiziert werden. Die Selektion der Transfektanden sollte *in vitro* unter hohen Miltefosin-Konzentrationen stattfinden. Nach Selektion von Miltefosin-resistenten Promastigoten, sollten die selektierten Cosmide mittels Restriktions- und Sequenzanalyse untersucht werden. Nach erfolgreicher Identifizierung der für die Miltefosin-Resistenz verantwortlichen Gene, sollte deren weitere Charakterisierung erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	Fluka, Buchs, Schweiz
Adenin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Antimonyl tartrate	Sigma, St. Louis, U.S.A.
³² PdATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
BCIP-Touloudin-Salz	
(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Touloudin-Salz)	Biomol, Hamburg
6-Biopterin	Fluka, Buchs, Schweiz
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, St. Louis
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G-250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R-250	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
DNA-Hybridisierungslösung HYB-9	Biozym, Hess. Oldendorf
dNTPs	MBI, Fermentas, Vilnius, Litauen
EDTA	
(Ethylendiamintetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
EGTA	
(Ethylenglykoltetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
FCS (Fötale Kälberserum)	Hyclone Perbio
Formamid	Merck, Darmstadt
Feund'sches Adujanz (complete & incomplete)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Geneticinsulfat (G418)	Gibco, BRL
Gentamycin (Gencin 80)	Ratiopharm, Ulm
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted, U.K.
Glycerin	Schwarz/Mann Biotech, Cleveland, U.S.A.
Glycin	Biomol, Hamburg

Haemin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HCl 32% (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydrogenethyl)- piperazin-1-ethansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Hexanukleotidgemisch	Roche Diagnostics, Mannheim
His Bind Resin-Säulenmaterial	Novagen, Madison, U.S.A.
Hygromycin B	Fluka, Buchs, Schweiz
HPLC-Wasser (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt
I-Block-Reagenz	Tropix, Bedford, U.S.A.
Imidazol	Merck, Darmstadt
InCert Agarose	FMC BioProducts, Rockland, U.S.A.
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-beta- D-thiogalactopyranosid)	peqlab, Erlangen
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Laurylsarcosin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
LB-Agar	Sigma, St. Louis, U.S.A.
LB-Broth	Sigma, St. Louis, U.S.A.
L-Glutamin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
M199-Medium, 10-fach	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Magermilchpulver	TSV, Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Miltefosin	Zentaris, Frankfurt a.M.
Natrumacetat	Roth, Karlsruhe
Natrumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid)	Biomol, Hamburg
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Nourseothricin	Werner BioAgents, Jena
Osmiumtetroxyd	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Penicillin-Streptomycin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Pentamidin-Isotionat	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Phenol/Tris-gesättigt	Biomol, Hamburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
Polyacrylamid/Bisacrylamid (19.1)	AppliChem Biochemica, Cheshire, U.S.A.
Polyethylenglykol 6000	Fluka, Buchs, Schweiz
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Puromycin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
RPMI-1640 Medium	Sigma, St. Louis, U.S.A.
TEMED (Tetramethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, St. Louis

Uranylacetat
Xylenxyanol

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

2.1.2 Geräte und sonstige Materialien

Axisokop
Biomate 3 *Spectrophotometer*
Biometra *Powerpack P21*
Biometra *Powerpack P25*
Biometra UV Band Eluator
Biometra *Thermocycler*
Blotkammer

Branson *Sonifier 250*
CASY *Cellcounter & Analyzer*
Chamber slides
Cryoröhrchen
Elektroporationsküvetten (0,4 cm)
Eppendorf *Centrifuge 5415 D*
Eppendorf *Centrifuge 5810 R*
Eppendorf *Centrifuge 5417 R*
Eppendorf *Mastercycler gradient*
Eppendorf *BioPhotometer*
FACSan
Faltenfilter
GenePulser™
His *Bind Resin*
Hoefer *SwitchBack PC500*
Hybridisierungssofen
Hybridisierungsröhrchen
Invertoskop IDO3
J2-21 Zentrifuge
J2-HS Zentrifuge
MicroSpin TMS-300 HR

Mikrotiterplatten
Nuc *Trappush columns*
PerfectBlue Doppelsystem
PerfectBlue Gelsystem
Poly-Prep Chromatography Columns
Quick-Seal tubes
Röntgenfilme Biomax MS
Rotaphor™ Typ 5
Rotina 48
Rotorgene 3000
Spectra/Por regenerated cellulose
Ultraschallbad: Sonovex Super
Ultracentrifuge: L8 - 70M
UV-Stratalinker™ 1800
3 MM Whatman Papier
Zellkulturflaschen

Zeiss, Oberkochen
Waltham, U.S.A.
Biometra, Göttingen
Biometra, Göttingen
Biometra, Göttingen
Biometra, Göttingen
Phase (Phorese Analytic Separation),
Lübeck
G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Schärfe System, Reutlingen
Nunc, Roskilde, Dänemark
Nalgene, Neerijse, Belgien
BioRad, München
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Becton Dickinson, Heidelberg
Schleicher & Schüll, Dassel
Biometra, Göttingen
Novagen, Madison, U.S.A.
Hoefer, San Francisco, U.S.A.
Biometra, Göttingen
Biometra, Göttingen
Zeiss, Oberkochen
Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Amersham Bioscience, Little Chalfont,
U.K.
Nunc, Roskilde, Dänemark
Stratagene, LaJolla, U.S.A.
Peqlab, Erlangen
Peqlab, Erlangen
BioRad, München
Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Eastman Kodak, Rochester, U.S.A.
Biometra, Göttingen
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Corbett, Sydney, Australien
Spectrum Europe, Breda, Niederlande
Bandelin, Berlin
Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Schleicher & Schüll, Dassel
Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Kits

BigDye Terminator ReadyReaction Mix 3.0
DIG DNA Labeling and Detection
Easy Pure DNA Purification
MasterAmp™ PCR Failsafe
MasterAmp™ PCR Extra Long
MasterAmp™ PCR Optimization
Montage In-Gel-Digest
Prime-a Gene
Puregene DNA Purification
 Qiagen Plasmid 500 Maxi Kit
QuantiTect Reverse Transcription
RealMasterMix
 RNeasy Mini
 Roti-Quant universal

Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Millipore, Billerica, U.S.A.
 Promega, Madison, U.S.A.
 Genra System, Minneapolis, U.S.A.
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Eppendorf, Hamburg
 Qiagen, Hilden
 Roth, Karlsruhe

2.1.4 Membranen

Nylonmembran *Biodyne®Plus*, 0,45 µm
 PVDF-Membran Fluorotrans, 0,2 µm

Pall, Europe, Portsmouth, U.K.
 Pall, Europe, Portsmouth, U.K.

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase
 (calf intestine phosphatase, CIP)
 Klenow-Polymerase
 Proteinase K
 Restriktionsenzyme
 RNase A
 T4-Ligase
 Taq-Polymerase

New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 Sigma, St. Louis, U.S.A.
 New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
 Sigma, St. Louis, U.S.A.
 New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
 Promega, Madison, U.S.A.
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.

2.1.6 MarkerDNA-Längenstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
 250-10000 bp

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Yeast Chromosome PFG Marker
 225-1,900 kb

New England Biolabs, Beverly, U.S.A.

Low Range PFG Marker
 0,1-200 kb

New England Biolabs, Beverly, U.S.A.

Lambda HindIII Ladder
 125-23130 bp

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Protein-Molekulargewichts Marker

<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> 10-170 kDa	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder</i> 10-200 kDa	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Perfect Protein™ Marker</i> 15-150 kDa	Novagen, Madison, U.S.A.

2.1.7 Antikörper

anti-P300-IgG	Kohelia Choudhury, BNI, Hamburg
anti-P300-IgY	Kohelia Choudhury, BNI, Hamburg
anti-P300-IgG	Eurogentec, Seraing, Belgien
anti-Maus-IgG-AP	<i>Jackson ImmunoResearch</i> , Newmarket, U.K.
anti-Huhn-IgG-AP	<i>Jackson ImmunoResearch</i> , Newmarket, U.K.
anti-Kaninchen-IgG-AP	<i>Jackson ImmunoResearch</i> , Newmarket, U.K.
anti-DIG-AP	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.8 DNA-OligonukleotideSequenzierung der genomischen DNA-Fragmente der Cosmide:

CH-2	5'-CCGTGTGATATCAGATGGCCC-3'
M13 rev.	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Sequenzierung der subklonierten DNA-Fragmente in pUC19:

M13 fwd.	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13 rev.	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Sequenzierung der subklonierten DNA-Fragmente in pJC45:

pJC45 fwd.	5'-GGATAACAATTCCCCTCTAG-3'
φT2	5'-ATATAGTTCCTCCTTTCAGC-3'

Amplifizierung der Mycoplasmen 16S rRNA:

MGSO	5'-GAGGTTAACAGAGTGACAGATGGTGCA-3'
GPO-3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'

Amplifizierung des offenen Leserahmens von P300:

ORF-300-5- <i>Nde</i> I	5'-GGGCATATGGGGATCCTTCCCAGC-3'
ORF-300-3- <i>Eco</i> RI	5'-GGGGAATTCTACTGCATCGCGTAGG-3'

Amplifizierung der ersten 1000 bp des offenen Leserahmens von P300:

ORF-300-5- <i>Nde</i> I	5'-GGGCATATGGGGATCCTTCCCAGC-3'
ORF-300-1000	5'-GTGGCTGGCCCTTTGGTGAG-3'

Amplifizierung der ersten 1000 bp des offenen Leserahmens von P235:

ORF-235-5'-1000	5'-TGGGCGCGTTACCGAGTCG-3'
ORF-235-3'-1000	5'-CTGTGGGTCGTCCTCGAAG-3'

Amplifizierung der 5'-UTR des P300 offenen Leserahmens:P300-5UTR-*Acc65I* 5'-CCCCGGTACCTGAGCGACCTTGCAGGCG-3'P300-5UTR-*EcoRI* 5'-GGGGAATTCATTTAAATCTTCTGCCGTGGGCATCCAC-3'Amplifizierung der 3'-UTR des P300 offenen Leserahmens:P300-3UTR-*BamHI* 5'-GGGGATCCAGCTTCGTGTCGAGGAGC-3'P300-3UTR-*HindIII* 5'-GGGGAAGCTTGTTCATGGTCGAGAAGCAG-3'Amplifizierung der 5'-UTR des P235 offenen Leserahmens:P235-5UTR-*Acc65I* 5'-GGGGGTACCTTCAATACGTCTGGTTCG-3'P235-5UTR-*EcoRI* 5'-GGGGAATTCATTTAAATACGCGATGGTGCATTTACC-3'Amplifizierung der 3'-UTR des P235 offenen Leserahmens:P235-3UTR-*BamHI* 5'-GGGGATCCGACAACGGCGATGGGAGCGCGGGCAG-3'P235-3UTR-*HindIII* 5'-GGGGAAGCTTATTTAAATAAAGCGTGCGAGGAGCGGCAG-3'Amplifizierung der P300 cDNA:

P300-fwd: 5'-AGCGGAAAGGCAGATGCGTAGGAGC-3'

P300-rev: 5'-CGCCGTGTTGTTGCTGTTTCGAGTCG-3'

Amplifizierung der Actin cDNA (interner standard):

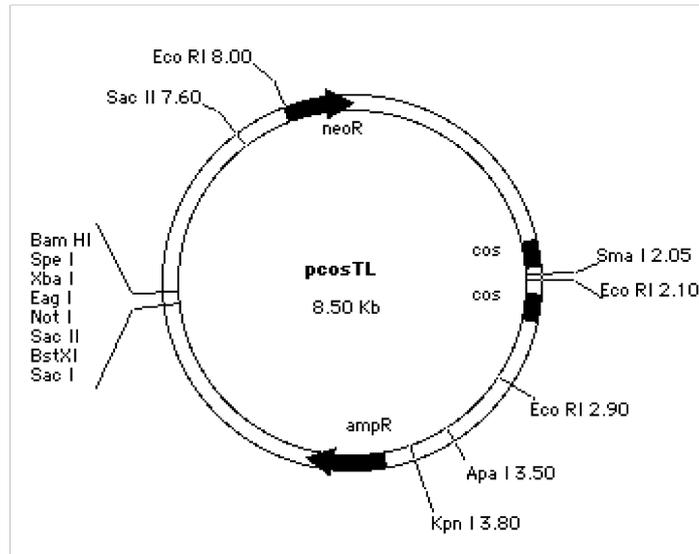
Actin-fwd: 5'-TGGCACCATACCTTCTACAACGAG-3'

Actin-rev: 5'-CGTCATCTTCTCACGGTTCTGC-3'

2.1.9 Vektoren

pcosTL:

Der Cosmid *shuttle* Vektor pcosTL wurde von J.M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London) zur Verfügung gestellt (Kelly J.M., 1994). Der 8,5 kb-Vektor, in den bis zu 40 kb große DNA-Fragmente eingebracht werden können, wurde zur Herstellung der genomischen *L. infantum* Cosmid-Genbank verwendet. Der Vektor vermittelt den Bakterien durch das β -Laktamase-Gen (*bla*) Ampicillin-Resistenz. Mittels des Neomycin-Phosphotransferase-Gens, das von den 5'- und 3'- untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi* flankiert wird, kann eine Geneticin (G418)-Selektion rekombinanter Leishmanien durchgeführt werden. Für die Konstruktion einer genomischen Cosmidbank wurde der Vektor mit *BamHI* und *SmaI* behandelt. Die Ligation der genomischen DNA, die zuvor einem partiellen Restriktionsverdau mit *Sau3A* unterzogen wurde erfolgte über die *BamHI*-Schnittstellen. Über die zwei *cos-sites* erfolgte die Verpackung des linearisierten Vektors in Phagenpartikel.



Karte 2: Cosmid *shuttle* Vektor *pcosTL*

Abgebildet sind einige Restriktionsstellen in der Vektorsequenz und die *multiple cloning site* (*mcs*). Die schwarzen Pfeile symbolisieren zu einem die Transkriptionsrichtung, und zum anderen die Gene der Antibiotika Selektionsmarker (*neoR*; *ampR*). Die beiden *cos*-sites sind schwarz markiert.

pIRmcs3+:

Dieser 8,5 kb-Vektor ist ein Derivat des Plasmids pIR1-SAT, das von S. Beverley (Washington University Medical School, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde. pIR1-SAT ermöglicht eine stadienspezifische Expression von subklonierten Genen in *Leishmania*. Durch die Entfernung einer *HindIII* Schnittstelle aus dem Originalplasmid entstand der Vektor pIRmcs3+ (J. Clos, unveröffentlicht). Dabei bezeichnet *mcs3+* die Orientierung der multiplen Klonierungsstelle. Der Vektor besitzt die 3'-untranslatierte Sequenz des *LPG 1* (Lipophosphoglykan 1 intergenische Region) Gens, das überwiegend in promastigoten Stadien exprimiert wird. Zusätzlich trägt das Plasmid die 3'-untranslatierte Sequenz des *CYS 2* (Cysteinproteinase 2)-Gens aus *L. mexicana mexicana*, das verstärkt in Amastigoten exprimiert wird. Durch die Klonierung von Genen in die Promastigoten bzw. Amastigoten-spezifische Klonierungsstelle wird eine stadienspezifische Expression der Gene möglich. Die Behandlung des Vektors mit der Restriktionsendonuklease *SwaI* führt zur Linearisierung des Konstrukts. Der linearisierte Vektor trägt an den Enden Sequenzen des *small subunit* rRNA locus aus *L. major*, und kann über homologe Rekombination stabil in den rRNA Locus ins *Leishmania*-Genom integrieren. Dieser Locus wird von der RNA-Polymerase I transkribiert. Eine effiziente Transkription des rekombinanten Gens ist somit gewährleistet. pIRmcs3+ trägt das β -Laktamase-Gen (*bla*), welches Ampicillin-Resistenz verleiht und eine Selektion in

Bakterien ermöglicht. Für die Selektion von rekombinanten Leishmanien, die mit Nourseothricin (150 $\mu\text{g/ml}$) erfolgt, besitzt der Vektor das SAT (Streptothricin-acetyltransferase)-Gen.

pJC45:

Der bakterielle Expressionsvektor pJC45 (Schlüter A., 2000) wurde zur Expression des *P300* verwendet. pJC45 (2,4 kb) ist ein *high copy number* Plasmid und ein Derivat von pJC40 (Clos J., 1994). Der Vektor trägt einen T7-Promotor und ein *lac*-Operon am 5'-Ende der multiplen Klonierungsstelle, um eine streng regulierte und effiziente Expression der rekombinanten Genen zu ermöglichen (2.2.3.1). Eine Koexpression von 10 Histidinen (*His-tag*) am N-Terminus des rekombinanten Proteins ermöglicht eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. pJC45 enthält das *pUC origin of replication* und das β -Laktamase-Gen (*bla*), welches Ampicillin-Resistenz verleiht und eine Selektion in Bakterien ermöglicht. In diesen Vektor wurde der offene Leserahmen von *P300* über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* eingefügt (3.4.5).

pJC25:

Der bakterielle Expressionsvektor pJC25 ist ein Derivat von pJC20 (Clos J., 1994). Im Unterschied zu pJC45 findet keine N-terminale Addition von 10 Histidinen an das rekombinant exprimierte Protein statt. In diesen Vektor wurde der offene Leserahmen von *P300* über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* eingefügt. Da das *P300*-Protein im C-terminalen Bereich (aa 2700-2707) über acht Histidine verfügt, wurde eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie des Proteins über diesen „internen“ *His-tag* versucht (3.4.5).

pRSET c:

Der bakterielle Expressionsvektor pRSET c (2,9 kb) von Invitrogen ist ein *high copy number* Plasmid und wurde verwendet, um eine verbesserte Expression des vollständigen *P300*-Proteins zu erreichen. Aus pJC45-*P300* wurde der offene Leserahmen von *P300* mit den Restriktionseendonukleasen *BamHI* und *EcoRI* ausgeschnitten, und in pRSET c über die Schnittstellen *BglII* und *EcoRI* eingefügt. Der Vektor besitzt neben einen T7-Promotor, das *pUC origin of replication* und das *bla*-Gen, welches den Zellen Ampicillin-Resistenz verleiht. Die exprimierten Proteine können aufgrund der Koexpression eines *His-tag*s (6x) am N-Terminus über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (3.4.5).

pUC19:

pUC19 (Yanisch-Perron C., 1985) ist ein häufig benutzter *E. coli* Plasmid-Klonierungsvektor. Dieses *high copy number* Plasmid hat eine Größe von 2686 Basenpaaren und besitzt das *bla*-Gen, das für die Ampicillin-Resistenz verantwortlich ist. Die multiple Klonierstelle liegt innerhalb der Sequenz des *lacZ*-Gens, welches für einen Teil des Enzyms β -Galaktosidase kodiert (α -Peptid). pUC19 wurde in dieser Arbeit für die Herstellung der Genaustausch-Konstrukte verwendet.

2.1.10 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5 α <i>subcloning efficiency</i>	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Gibco, BRL
DH5 α <i>library efficiency</i>	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco, BRL
BL21 (DE3) [pAP <i>lacI</i> ^Q]	pAP <i>lacI</i> ^Q	O. Fayet, Centre National DeLa Recherche Scientifique, Toulouse
C43 BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm lon</i>	(Miroux B., 1996)
BL21 CodonPlus(DE3)-RP	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r]	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen

Zur Etablierung von DNA in Klonierungsexperimenten wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α *subcloning efficiency* verwendet. Zur Etablierung von Cosmid-DNA kam der *E. coli*-Stamm DH5 α *library efficiency* zum Einsatz.

Zur Expression von *P300* wurde der *E. coli* BL21 (DE3) [pAP*lacI*^Q]-Stamm eingesetzt, der sich vom BL21 (DE3) Stamm (Novagen) ableitet, und uns freundlicherweise von O. Fayet zur Verfügung gestellt wurde. Der Unterschied zum BL21 (DE3)-Stamm besteht im Vorhandensein eines zusätzlichen Plasmids, auf dem sich ein weiteres Gen für den *lac*-Repressor und ein Gen für die Kanamycin-Resistenz befindet (2.2.3.1).

Zur Expression von *P300* wurde weiterhin der *E. coli*-Stamm C43 BL21 (DE3) verwendet. Dieser Stamm besitzt eine uncharakterisierte Mutation, die den Zelltod, ausgelöst durch die Überexpression von toxischen Proteinen, verhindert. Wie der Ursprungsstamm BL21 (DE3)

trägt dieser Stamm das Genom des lysogenen Bakteriophagen (DE3), und besitzt dadurch den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-RNA-Polymerase. Der *lacUV5*-Promotor ist durch IPTG induzierbar (3.4.5).

Die Expression des P300 wurde auch in dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RP durchgeführt. Die Expression von rekombinanten Proteinen wird manchmal durch t-RNAs, die in *E. coli* selten vorkommen begrenzt. Während einer starken Expression werden diese seltenen t-RNAs schnell aufgebracht und die Translation kommt zum Erliegen. Der Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RP enthält zusätzliche Kopien von Genen, die für t-RNAs kodieren (*argU* und *proL*) und die Translation von Proteinen aus G/C-reichen Organismen (*Leishmania*) ermöglichen. Diese zusätzlichen Genkopien liegen auf dem Plasmid pACYC vor, das auch das Gen für die Chloramphenicol Acetyl-Transferase trägt, welches für die Chloramphenicol Resistenz verantwortlich ist (3.4.5).

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS wurde ebenfalls zur Expression des *P300* herangezogen. Dieser Stamm enthält ein zusätzliches Plasmid, das das Lysozym-Gen aus dem T7-Phagen trägt. Lysozym ist ein bifunktionelles Enzym. Neben der Spaltung der Peptidoglykanschicht der Zellwand, kann es die T7-RNA-Polymerase hemmen, und ermöglicht eine noch effizientere Repression der Hintergrundexpression des Zielproteins. Die induzierbare Expression mit IPTG wird dadurch nicht beeinflusst (3.4.5).

2.1.11 *Leishmania*-Stämme

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde der *Leishmania infantum* Stamm MHOM/FR/91/LEM 2259 zymodeme MON-1 Klon 3511 verwendet. Dieser Stamm wurde aus dem Knochenmark eines HIV-Patienten mit VL isoliert, und wurde freundlicherweise von A. Sulahian (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université Paris VII) zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung der chromosomalen Lokalisation des *P300* kam zusätzlich der *Leishmania infantum* MCAN/ES/98/LLM-877 JPCM5 (Klon sp1h und Klon sp5h) zum Einsatz. Dieser Stamm wurde freundlicherweise von D.F. Smith (Immunology and Infection Unit, University of York) zur Verfügung gestellt. Dieses Isolat stammt ursprünglich aus einem Hund, und wurde für die Herstellung der *Leishmania infantum* GeneDB verwendet.

Weiterhin wurde der *Leishmania donovani* Stamm MHOM/SD/???/Lo8 eingesetzt, der ursprünglich aus dem Sudan stammt, und von Dan Zilberstein (Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa) zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.12 Makrophagen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
J774A.1	Makrophagen Zelllinie, Balb/c Hintergrund	ATCC TIB-67

2.1.13 Nährmedien

Für Leishmanien:

M199-Medium (pH 7,0)	10 % M199-Medium 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (30 min bei 56°C) 0,2 % Natriumhydrogencarbonat 20 µg/ml Gentamicin 2 mM L-Glutamin
modifiziertes M199 (pH 7,0)	10 % M199-Medium 20 % inaktiviertes fötales Kälberserum (30 min bei 56°C) 0,2 % Natriumhydrogencarbonat 20 µg / ml Gentamicin 2 mM L-Glutamin 40 mM HEPES (pH 7,4) 10 µg / ml Haem 100 µM Adenin 1,2 µg / ml 6-Biopterin

Für Bakterien:

LB (Luria Bertani)-Medium	2 % LB <i>Broth</i>
LB (Luria Bertani)-Agarplatten	2 % LB <i>Broth</i> 1, 5 % Agar

Für Makrophagen:

RPMI-Medium	1 x RPMI 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (30 min bei 56°C) 2 mM L-Glutamin mit PenStrept
-------------	---

2.1.14 Medienzusätze

Substanz	Stamm-Konzentration	Endkonzentration
Geneticin (G418)	100 mg/ml in M199	50 µg/ml
Ampicillin	10 mg/ml in A. dest.	50 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in A. dest.	10 µg/ml
Puromycin	1 mg/ml in M199	25 µg/ml
Hygromycin B	50 mg/ml in 1xPBS (pH 7,0)	50 µg/ml
Penicillin	5000 Einheiten/ml	100 Einheiten/ml
Streptomycin	5 mg/ml	100 µg/ml
Miltefosin	100 mM in M199	unterschiedliche Konz.
Pentamidin	100 mM in A. dest.	unterschiedliche Konz.
Antimon (SbIII)	10 mM in M199	unterschiedliche Konz.

2.1.15 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1 x PBS (pH 7,0 und pH 5,5)	2,6 mM KCL 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 136 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,5 x TBE	45 mM Tris 45 mM Borsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
1 x TAE	1 mM EDTA 40 mM Tris-Acetat
1 x TBS	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,2)
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
TE/RNase-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 20 µg/ ml RNase A
20 x SSC (pH7,0)	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O
2 x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH6,8) 100 mM DTT 4 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 20 % Glycerin

DNA-Ladepuffer	85 % Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 1 mg / ml Bromphenolblau 1 mg / ml Xylenyanol
----------------	--

Lösungen für Plasmid- bzw. Cosmidpräparationen:

Lösung 1	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
----------	--

Lösung 2	0,2 N NaOH 1 % SDS
----------	-----------------------

Lösung 3	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure
----------	------------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur von promastigoten Leishmanien

Promastigote *L. donovani*-Zellen wurden in M199-Medium, pH 7,0, in Polystyren-Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 25°C kultiviert. *L. infantum*-Promastigoten wurden in modifiziertem M199, pH 7,0 kultiviert. Bei rekombinanten *Leishmania*-Stämmen wurden dem Medium die jeweiligen Antibiotika in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. 2×10^7 Zellen/ml, wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in frischem Medium verdünnt, so dass ein logarithmisches Wachstum aufrechterhalten werden konnte. Die Zelldichten wurden mit Hilfe des CASY®1-Cell Counter +Analyzer bestimmt (Doppelbestimmung). Dabei wurden die Zellen in einem schwachen Elektrolyt (CASYton®-Lösung) verdünnt (1:1000) und in einem Messgerät durch eine Kapillare eingesaugt. Jede durchtretende Zelle verändert den Widerstand entlang der Kapillare und ist somit ein Maß für das Volumen der Zellen. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren. Die Signalauswertung erfolgte über Pulsflächenanalyse.

Rekombinate Leishmanien wurden stets unter Antibiotika-Selektion kultiviert. Für die Verwendung der rekombinanten Zellen in Experimenten (Wachstumskurven, Makrophagen-Infektionen) erfolgte die Entfernung des Antibiotikums aus dem Medium. Nach einer Sedimentation (10 min, 1258 x g, RT) wurde der Medium-Überstand abgenommen und das Zellsediment wurde mit frischem Medium gewaschen (10 min, 1258 x g, RT). Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in Medium ohne Antibiotika für 24 h bei 25°C.

2.2.1.2 Einfrieren von *Leishmania*-Stammkulturen

Einfriermedium

50 % inaktiviertes (30 min bei 56°C) fötales Kälberserum (FCS)

30 % M199-Medium mit 10 % FCS

20 % DMSO

Das Einfriermedium wird bei -20°C gelagert.

Leishmania-Promastigoten aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 min, 1258 x g, 4°C). Nach Entfernung des Medium-Überstandes wurden die Zellen in je einem Volumen eiskühlem M199-Medium und Einfriermedium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml vorlag. Auf Eis wurde die Zellsuspension in Cryoröhrchen

aliquotiert. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, erfolgte die Lagerung der Zellen für mind. zwei Stunden (maximal über Nacht) in einer Styroporbox bei -70°C . Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Transfektion von *Leishmania*-Promastigoten durch Elektroporation

Elektroporationspuffer

21 mM HEPES (pH 7,5)
137 mM NaCl
5 mM KCl
0,7 mM NaH_2PO_4
6 mM Glukose

Die Elektrotransfektion wurde nach Kapler (Kapler G.M., 1990) durchgeführt. Die Zellen werden zusammen mit der DNA einem elektrischen Feld bei hoher Spannung ausgesetzt. Dabei entstehen in der Zellmembran vermutlich Poren, durch die DNA-Moleküle in die Zelle gelangen können. Die Rückbildung der Poren kann verzögert werden, wenn die Zellen bei 0°C gehalten werden. *L. donovani*- und *L. infantum*-Promastigoten wurden mit den isolierten Cosmiden aus der Selektion und den Genaustausch-Konstrukten mittels Elektroporation transfiziert. Die zu transfizierenden Cosmide wurden mittels Maxi-Präparation (2.2.2.5), oder CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation (2.2.2.6) isoliert und gereinigt. Promastigoten aus der logarithmischen Wachstumsphase (Dichte: 1×10^7 Zellen/ml) wurden sedimentiert (10 min, $1258 \times g$, 4°C), zweimal mit eiskaltem $1 \times \text{PBS}$ (pH 7,0), und einmal mit eisgekühltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Sedimentationen erfolgten stets unter denselben Bedingungen. Schließlich wurden die Zellen in eiskaltem Elektroporationspuffer in einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml aufgenommen. $400 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension (4×10^7 Zellen) wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,4 cm) gegeben, in welche $50 \mu\text{g}$ Cosmid-DNA, bzw. $2 \mu\text{g}$ DNA für die homologe Rekombination vorgelegt wurde. Als Kontrolle diente ein Transfektionsansatz ohne DNA (Mock-Ansatz). Mit Hilfe des *Gene Pulser*TM erfolgte die Elektroporation durch drei Stromstöße pro Ansatz. Die Stromstärke und Kapazität betrug 1,5 kV bzw. $25 \mu\text{F}$, der Widerstand betrug 200 Ohm, die Zeitkonstante lag zwischen 0,5 und 0,9 ms. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration für 10 min auf Eis gehalten und nachfolgend in 10 ml modifiziertem M199, dem Penicillin (100U/ml) und Streptomycin ($100 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt wurden, überführt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 25°C wurden die Zellen sedimentiert (10 min, $1258 \times g$, RT) und in 10 ml frischen modifizierten M199 aufgenommen. Dem Medium wurden zur Selektion rekombinanter Zellen die entsprechenden Antibiotika (2.1.14) zugesetzt. Die Selektion auf rekombinante Leishmanien

war abgeschlossen, sobald die Kontroll-Zellen (Mock-Ansatz) tot waren. Dies war nach ca. 10-14 Tagen der Fall. Die rekombinanten Leishmanien wurden anschließend für Experimente eingesetzt und zur Langzeitlagerung eingefroren (2.2.1.2).

2.2.1.4 Vereinzeln von Leishmanien

Für die Anzucht von Einzelklonen wurden transfizierte Leishmanien in einer 96-well Mikrotiterplatte vereinzelt. Es wurde eine serielle Verdünnung der Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml bis 5 Zellen/ml durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte in modifiziertem M199 mit Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) und den entsprechenden Selektionsantibiotika (2.1.14). Jeder Napf wurde mit 200 µl Zellsuspension aus der letzten Verdünnung (5 Zellen/ml) befüllt, so dass sich rechnerisch eine Zelle pro Vertiefung befand. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm umschlossen und bei 25°C inkubiert, bis ein Anwachsen der Zellen beobachtet wurde. War ein Drittel bis die Hälfte der Mikrotiterplatte bewachsen, wurde von selektierten Einzelklonen ausgegangen. Diese wurden anschließend in ein größeres Kulturvolumen überführt und als Einzelklone kultiviert.

2.2.1.5 Selektion von Miltefosin-resistenten *L. infantum* Promastigoten

Für die Selektion von Miltefosin-resistenten Promastigoten wurde der *L. infantum* Wildtyp-Stamm mit einer genomischen Cosmidbank aus demselben Stamm transfiziert. Nach der Selektion von rekombinanten Parasiten mit G418 (50 µg/ml) in modifiziertem M199 wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und in einem 100 ml Ansatz mit 40 µM Miltefosin und G418 (50 µg/ml) bei 25°C kultiviert. Als Kontrolle wurde *Li* [pcosTL] unter denselben Bedingungen kultiviert. Die Zellzahl wurde regelmäßig ermittelt und die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Sobald eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml erreicht wurde, fand ein Mediumwechsel statt. Hierzu wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 1258 x g, RT), der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in frischem modifiziertem M199 mit 40 µM Miltefosin und G418 (50 µg/ml) aufgenommen. Die Selektion wurde beendet, sobald die Kontroll-Kultur, im Vergleich zu den rekombinanten Promastigoten, kein Wachstum zeigte. Die Cosmid DNA von rekombinanten Promastigoten, die die Selektion überlebten, wurde isoliert (2.2.2.7).

Die Miltefosin-resistenten Promastigoten wurden stets in modifiziertem M199 mit G418 (50 µg/ml) kultiviert. Da Leishmanien eine hohe genomische Plastizität besitzen und Rekombinations-Ereignisse häufig vorkommen, fand im Abstand von ca. sechs Monaten eine Überprüfung der Miltefosin-Resistenz vermittelnden Cosmide statt. Dazu wurde die Cosmid-DNA aus den Leishmanien isoliert und in *E. coli* DH5α library efficiency (2.1.10)

transformiert. Aus 12-24 Bakterienkolonien wurden Cosmide isoliert und einer Restriktionsanalyse mit *EcoRV* und *XbaI* unterzogen. Die resultierenden Fragmentmuster wurden mit den ursprünglichen Fragmentmustern der Cosmide verglichen.

2.2.1.6 Quantitative Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen. Die Zellen passieren einzeln in einem Flüssigkeitsstrom (hydrodynamische Fokussierung) einen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge. Dabei emittiert die Zelle Streulicht (*light scatter*). Durch Messung der Lichtbeugung und -streuung können Informationen über die Zelle abgeleitet werden (180° *forward scatter*: Größe der Zelle; 90° *side scatter*: Granularität der Zelle). Sind Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, kann die Fluoreszenz, die sie emittieren ebenfalls gemessen werden. Alle gemessenen Parameter lassen sich gegeneinander auftragen. Mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen, die an die Doppelhelix der DNA binden, können Zellzyklus- und Aneuploidie-Analysen (Messung des DNA-Gehalts) durchgeführt werden. Diese Farbstoffe können mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Dabei ist die Fluoreszenz einer Zelle proportional zum DNA-Gehalt. Während des Zellzyklus ändert sich der DNA-Gehalt einer Zelle. In der G₂M Phase besitzt die Zelle die doppelte Menge an DNA, im Vergleich zu einer postmitotischen Zelle (G₁ Phase). Während des programmierten Zelltods sinkt der DNA-Gehalt einer Zelle unter den einer normalen Zelle in der G₁-Phase. Man spricht von hypodiploiden Zellen. Die Färbung von DNA kann somit benutzt werden, um den programmierten Zelltod zu quantifizieren (Nicoletti I., 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung des DNA-Gehalts in Miltefosin-behandelten Promastigoten durchgeführt. Zur Färbung der DNA wurde Propidiumjodid verwendet. Dieser Farbstoff kann nur Zellmembranen von defekten Zellen durchdringen und interkaliert in die DNA. Gebundenes Propidiumjodid hat ein Absorptionsmaximum bei 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 617 nm.

Rekombinante Leishmanien wurden in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in modifiziertem M199 (ohne G418) mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen (0, 20, 40, 60 80 μ M) kultiviert. Nach 72 Stunden wurden jeweils 1 ml der Leishmanien-Kulturen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und sedimentiert (5 min, 3800 rpm, RT). Das Sediment wurde in 100 μ l 1 x PBS (pH 7,0) resuspendiert, und zum Fixieren und Permeabilisieren der Zellen mit 600 μ l eiskaltem 70%igem Ethanol versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Proben bei -20°C . Nach erneuter Sedimentation (5 min, 3800 rpm, RT) wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml 1 x PBS / 50 mM EDTA

resuspendiert und sedimentiert (5 min, 3800 rpm, RT). Da Propidiumjodid auch in die RNA interkaliert, folgte ein RNase-Verdau. Dazu wurde das Zellsediment in 400 μ l 1 x PBS / RNase 50 μ g/ml resuspendiert. Nach Zugabe von Propidiumjodid 5 μ g/ml (Endkonz.) wurden die Proben in spezielle Reaktionsgefäße für die Durchflusszytometrie überführt und mind. für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz von 10000 Zellen/Probe wurde in einem Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) ermittelt.

2.2.1.7 Kultivierung von J774-Makrophagen

Zur Kultivierung von J774-Makrophagen wurde RPMI-Medium verwendet. Die Zellen wurden in Polystyren-Zellkulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Begasung bis zur Konfluenz kultiviert. Dabei wurde das Medium in Abständen von zwei Tagen gewechselt. Die adhärennten Zellen wurden durch verstärktes auf- und abpipettieren gelöst und passagiert.

2.2.1.8 *In vitro*-Infektion von J774-Makrophagen mit Leishmanien

Konfluente J774-Makrophagen wurden durch verstärktes auf- und abpipettieren vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm; 0,0025 mm²) wurden die Zellen gezählt, und in RPMI-Medium in einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml aufgenommen. Je 400 μ l dieser Makrophagensuspension (2 x 10⁵ Zellen) wurden in eine Kammer der Glas-*chamber slides* überführt, und zur Adhäsion der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden, mindestens jedoch über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Medium-Überstand vorsichtig abgenommen. Für die Infektion wurden promastigote Leishmanien aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurden die Parasiten in modifiziertem M199-Medium kultiviert. Unter täglichem Mediumwechsel drei bis vier Tage vor der Infektion wurden die Leishmanien bis zu einer Dichte von 2 - 7 x 10⁷ Zellen/ml kultiviert. Die Parasiten wurden mit Hilfe des CASY-Cellcounters gezählt, und auf eine Zelldichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml in frischem M199 eingestellt. Je 400 μ l der Zellsuspension (2 x 10⁶ Zellen) wurden direkt zu den Makrophagen gegeben (Infektionsverhältnis 1:10), und für vier bis sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Ansätze wurden daraufhin mehrmals mit vorgewärmten M199 gespült, um nicht-phagozytierte Leishmanien zu entfernen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen mit 400 μ l M199-Medium und Miltefosin in den entsprechenden Konzentrationen überschichtet und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit vorgewärmten 1 x PBS (pH 5,5) zweimal gewaschen, zwei Minuten in Methanol fixiert, und anschließend mit GiemsaLösung gefärbt (2.2.1.9). Es folgte die mikroskopische Kontrolle (2.2.4.1) und die Auszählung der infizierten Makrophagen und intrazellulären Amastigoten.

2.2.1.9 Giemsa-Färbung

Mit der Giemsa-Färbung können u.a. Protozoen-Kerne dargestellt werden. Die Giemsalösung ist eine Mischung aus folgenden Farbstoffen: Azur B, Eosin und Methyleneblau. Die Färbung basiert auf der Bindung des basischen Farbstoffes Azur an das saure Chromatin, während der saure Farbstoff Eosin an basische Bestandteile der Zelle, wie das Zytoplasma bindet. Zur Analyse der Makrophageninfektionen wurden Giemsa-Färbungen durchgeführt. Die Infektion fand auf Glas-*chamber slides* statt (2.2.1.8). Nach Beendigung der Infektion wurden die Makrophagen für ein bis zwei Minuten bei RT in Methanol fixiert. Nachdem die Objektträger getrocknet waren erfolgte die Färbung der Zellen in einer 10%igen Giemsalösung (Azur-Eosin-Methyleneblaulösung von Merck, in Phosphatpuffer pH 7,2) für 10 Minuten. Die Objektträger wurden anschließend unter fließendem Leitungswasser gespült, getrocknet und lichtmikroskopisch untersucht (2.2.4.1).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte durch eine Calciumchlorid-Behandlung. Die Membran der Bakterien wird dabei durch einen noch unbekanntem Mechanismus durchlässig für z.B. Plasmid-DNA. 200 ml LB-Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin wurden mit *E. coli* BL21 (DE3) [pAP/*acl*^Q]-Zellen (2.1.10) angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt, bis eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml erreicht war (OD600: 0,3). Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 3220 x g, 4°C) sedimentiert. Im Kühlraum und auf Eis wurde das Sediment in 20 ml einer 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde das Sediment in 2 ml 50 mM CaCl₂, 50% Glycerin, und 7% DMSO aufgenommen. In 200 μl Aliquots wurden die Zellen dann in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in Trockeneis und Gefrieralkohol (100 % Ethanol) Schock gefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.2 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Plasmidvektoren wurden in *E. coli* DH5 α -Zellen *subcloning efficiency competent cells* (2.1.10) transformiert, Cosmidvektoren in *E. coli* DH5 α -Zellen *library efficiency competent cells* (2.1.10). Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 50 μl bzw. 100 μl der Zellen wurden mit 3 μl eines Ligationsansatzes, oder 2 μl einer Plasmid- bzw. Cosmid-Minipräparation (2.2.2.3), oder 0,5 μg DNA aus Maxipräparationen (2.2.2.5) gemischt, und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzschock erfolgte für 20 sek bei 37°C bzw. 45 sek bei 42°

C. Nach zweiminütiger Inkubation der Zellen auf Eis, wurden diese mit 1 ml LB-Medium versehen und für max. eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Sedimentation der Zellen (3 min, 1811 x g, RT). Der Überstand wurde bis auf 100-150 μ l abgenommen und das Zellsediment in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Jeweils 10 μ l und 100 μ l wurden auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Aufnahme der Plasmid-bzw. Cosmid-DNA besaßen die Bakterien ein Ampicillin-Resistenzgen, das ein Wachstum auf den Ampicillin-haltigen Platten ermöglichte.

In abweichender Form wurde mit kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) [pAP/*lacI*^Q]-Zellen, die ein zusätzliches Plasmid mit einem Kanamycin-Resistenzgen besitzen, verfahren. Für die Transformation wurden 20 μ l kompetente Zellen und 0,5 μ g Plasmid-DNA verwendet. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sek bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und einstündiger Inkubation bei 37°C, wurden 100 μ l der Zellsuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert, die 50 μ g/ml Ampicillin und 10 μ g/ml Kanamycin enthielten.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA durch alkalische Lyse (Mini-Präparation) nach Birnboim (Birnboim H. C., 1979)

Zur Analyse von Transformanten wurde Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli* isoliert. Dazu wurden Einzelkolonien in jeweils 2 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert (2 min, 18500 x g, RT) und das Zellsediment anschließend in 200 μ l Lösung 1 (2.1.15) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 400 μ l Lösung 2 (2.1.15) hinzugefügt. Die Proteine und das SDS in Lösung 2 wurden durch Zugabe von 300 μ l Lösung 3 (2.1.15) und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation (30 min, 18500 x g, 4°C) wurden Zelltrümmer, gefällte Proteine und SDS von der gelösten Plasmid bzw. Cosmid-DNA getrennt. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (10 min bei RT). Nach Zentrifugation (10 min, 18500 x g, RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 30 μ l TE/RNase A aufgenommen, und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse der isolierten Plasmide bzw. Cosmide erfolgte durch Restriktionsverdau (2.2.2.11) und Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.17).

2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Midi-Präparation)

Für eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie in 200 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterien erfolgte wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Dabei wurden die

Volumina der Plasmid-Lösungen wie folgt erhöht: 5 ml Lösung 1, 10 ml Lösung 2, und 7,5 ml Lösung 3. Die Sedimentation wurde in einer Beckman-Zentrifuge (Rotor JA-12, 30 min, 10000 rpm, 4°C) durchgeführt. Der Überstand wurde anschließend durch einen Faltenfilter filtriert und nach Zugabe von 40 µg/ml RNase A für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion (2.2.2.9). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 20-minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA gefällt. Nach Sedimentation (20 min, 3220 x g, RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 400 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation)

Plasmid bzw. Cosmid-DNA im großen Maßstab wurde mit Hilfe des Qiagen 500 Plasmid Maxi Kit isoliert und gereinigt.

Für Plasmide wurde eine 200 ml Bakterienkultur verwendet; für Cosmide eine 400 ml Zellkultur. LB-Medium (200 bzw. 400 ml) mit 50 µg/ml Ampicillin wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in einer Beckman-Zentrifuge, mit dem Rotor JA-10 sedimentiert (10 min, 5000 rpm, 4°C). Das Bakteriensediment wurde anschließend in 20 ml *Buffer 1* (entspricht Lösung 1; 2.1.15) vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml *Buffer 2* (entspricht Lösung 2; 2.1.15) wurde die Probe bei RT für fünf Minuten geschwenkt. Schließlich wurden 20 ml *Buffer 3* (entspricht Lösung 3; 2.1.15) hinzugefügt, und nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Sedimentation (Beckman-Zentrifuge Rotor JA-10; 30 min, 10000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter gegeben, mit 40 µg/ml RNase A versetzt und mindestens für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf eine Qiagen-Säule-100 gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die DNA bindet dabei an das Säulenmaterial. Die Säule wurde danach zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml QF-Puffer, der vorher auf 50°C erwärmt wurde, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Mit 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt (30 min, 3220 x g, RT). Das DNA-Präzipitat wurde nachfolgend mit 70%igem Ethanol gewaschen, und in 500 µl TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht gelöst. Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt (2.2.2.10), und auf 1 µg/µl eingestellt. Eine Qualitätskontrolle erfolgte in einem analytischen Agarosegel (2.2.2.17).

2.2.2.6 Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA (Sambrook J., 1989)

Die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde zur Isolierung von hochreiner superhelikaler Plasmid-DNA angewandt. Dabei handelt es sich um eine spezielle Form der Gleichgewichtszentrifugation (Isopyknische Zentrifugation), bei der die physikalische Trennung von Komponenten nach ihrer Schwebedichte erfolgt. Während einer lang andauernden Zentrifugation unter sehr hoher Geschwindigkeit wird ein CsCl-Dichtegradient ausgebildet. Am Boden des Zentrifugenröhrchens stellt sich eine höhere Konzentration des schweren Salzes ein, während die Konzentration nach oben hin abnimmt (kontinuierlicher Dichtegradient). Die einzelnen Komponenten bilden Banden an der Stelle des Dichtegradienten, die ihrer eigenen Dichte entsprechen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) lassen sich die verschiedenen Konformationen der DNA (superhelikale, lineare und *nicked* zirkuläre DNA) trennen. EtBr interkaliert besser in lineare als in superhelikale DNA. Dies führt zu unterschiedlichen Schwebedichten der beiden DNA-Konformationen und erlaubt eine Trennung im Dichtegradienten. Die Bande der superhelikalen DNA ist, aufgrund ihrer höheren Schwebedichte, weiter zum Boden des Zentrifugenröhrchens verschoben.

TEN-Puffer

0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)
0,01 EDTA (pH 8,0)
1 M NaCl

200 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in einer Beckman-Zentrifuge sedimentiert (Rotor JA-10, 10 min, 5000 rpm, RT) und das Bakteriensediment in 5 ml Lösung 1 (2.1.15) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 ml Lösung 2 (2.1.15) und fünfminütiger Inkubation auf dem Rollenmischer lysiert. Durch Zugabe von 7,5 ml Lösung 3 (2.1.15) und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteine und das SDS in Lösung 2 gefällt. Nach Sedimentation (20 min, 3220 x g, 4°C) und Filtration des Überstandes durch einen Faltenfilter, wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Fällung erfolgte die Zentrifugation der DNA (20 min, 3220 x g, RT), die daraufhin mit 70%igem Ethanol gewaschen wurde. Das DNA-Präzipitat wurde in 4 ml TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA-Lösung wurde mit 150 μl EtBr (10 mg/ml) und 4,9 g CsCl versetzt und gut gemischt, bis das CsCl vollständig gelöst war. *Quick-Seal*-Ultrasentrifugenröhrchen von Beckman (5 ml; 13 x 51 mm) wurden vorsichtig mit dem EtBr-CsCl-Gemisch befüllt. Die Röhrchen wurden durch

Zugabe von TE-Puffer bzw. 50%iger CsCl-Lösung auf 0,1 g genau austariert und luftblasenfrei verschweißt. Es folgte eine Zentrifugation über Nacht unter folgenden Bedingungen: Beckman Ultrazentrifuge; NVT-90-Rotor; 16 Stunden, 50000 rpm bei 25°C. Nach Beendigung des Zentrifugationslaufs wurde die Bande, welche die superhelikale Plasmid-DNA enthielt, mit einer Kanüle vorsichtig abgenommen. Um das EtBr zu entfernen wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 0,5-1 Volumen NH₄-Acetat-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt. Die DNA wurde anschließend mit zwei Volumen A. dest. und 0,1 Volumen 7,5 M NH₄-Acetat versetzt. Nach Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol wurde die DNA gefällt, sedimentiert (20 min, 3220 x g, 20°C), und das DNA-Präzipitat in 2 ml TEN-Puffer gelöst. Es folgte die Zugabe von 3 Volumen Ethanol und eine letzte Zentrifugation (20 min, 3220 x g, 20°C). Das DNA-Sediment wurde in 0,5-1 ml TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt (2.2.2.10) und auf 1 µg/µl eingestellt. Eine Qualitätskontrolle erfolgte in einem analytischen Agarosegel (2.2.2.17).

2.2.2.7 Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien

Zur Analyse der rekombinanten Leishmanien aus Selektions-Ansätzen, die unter hohen Miltefosin-Konzentrationen überleben konnten, wurde die Cosmid-DNA isoliert. Die Leishmanien (ca. 2 x 10⁹ Zellen) wurden zunächst für 10 Minuten bei 1258 x g und 4°C sedimentiert und zweimal mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen. Das Zellsediment wurde anschließend in 2 ml Lösung 1 (2.1.15) resuspendiert. Zur Lyse der Leishmanien wurde 4 ml Lösung 2 (2.1.15) hinzugefügt. Proteine und das SDS in Lösung 2 wurden durch Zugabe von 3 ml Lösung 3 (2.1.15) und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation bei 18500 x g für 30 Minuten bei 4°C wurden Zelltrümmer, gefällte Proteine und SDS von der gelösten Cosmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Es folgte ein RNase-Verdau des Eluats durch Zugabe von 40 µg/ml RNase A und Inkubation bei 37°C für mind. 30 Minuten. Danach wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion (2.2.2.9) durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 10-minütiger Inkubation bei RT gefällt (30 min, 3220 x g, RT). Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 40 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Qualität der isolierten Cosmid-DNA wurde in einem analytischen Agarosegel (2.2.2.17) überprüft. Anschließend erfolgte die Transformation der Cosmid-DNA in *E. coli* DH5α *library efficiency*-Zellen (2.2.2.2).

2.2.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien wurde das *Puregene DNA Isolation Kit* von Gentra Systems verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Dazu wurden $1 - 2 \times 10^8$ Leishmanien sedimentiert (10 min, $1258 \times g$, 4°C), zweimal mit $1 \times$ PBS (pH 7,0) gewaschen und durch Zugabe von $300 \mu\text{l}$ *cell lysis solution* lysiert. Die Lyse der Zellen findet in Anwesenheit eines DNA-Stabilisators statt, der die DNase-Aktivität einschränkt und so die DNA vor einem vorzeitigen Abbau bewahrt. Nach dem RNase-Verdau ($0,2 \text{ mg/ml}$ Endkonz., 5-60 min bei 37°C) erfolgte die Fällung der Proteine durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ *protein precipitation solution* und fünfminütiger Inkubation auf Eis. Nach Sedimentation (5 min, $18500 \times g$, RT) wird die im Überstand enthaltene DNA mit $300 \mu\text{l}$ Isopropanol gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, bevor es in $100 \mu\text{l}$ *hydratation solution* für eine Stunde bei 65°C gelöst wurde.

2.2.2.9 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde angewandt, um denaturierendes Protein aus isolierter Plasmid- bzw. Cosmid-DNA zu entfernen. Nach dem RNase A-Verdau wurde 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zu den jeweiligen Ansätzen gegeben. Die Ansätze wurden fünf Minuten ausgeschüttelt. Es folgte eine Sedimentation für 10 Minuten bei $3220 \times g$ und RT. Dabei entstanden drei Phasen: Die obere wässrige Phase enthielt die DNA, in der Interphase befanden sich die ausgefällten Proteine, und die untere Phase enthielt Chloroform. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 10 M NH_4 -Acetat versetzt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Volumen 100%igem Ethanol gefällt (10 min bei RT). Anschließend wurden die DNA sedimentiert (30 min, $3220 \times g$, RT) und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Qualität der gereinigten DNA wurde in einem analytischen Agarosegel überprüft (2.2.2.17).

2.2.2.10 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde in Quarzküvetten photometrisch (Eppendorf Biophotometer; 8,5 mm) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 einer Doppelstrang-DNA Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ (Sambrook J., 1989). Das Verhältnis von $\text{OD}_{260\text{nm}}$ zu $\text{OD}_{280\text{nm}}$ gibt die Reinheit der Nukleinsäure an. Reine DNA hat einen Wert von $\geq 1,8$. Unter Einbeziehung des OD-Wertes wurde die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wie folgt errechnet: $\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (DNA)} / 1000$

2.2.2.11 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen Basensequenzen, die aus vier, sechs oder acht Basenpaaren bestehen. Die Erkennungssequenz ist spezifisch für jedes Restriktionsenzym. Der Schnitt erfolgt meist innerhalb der Erkennungssequenz (Restriktionsenzyme Typ II).

Dabei können 3'- oder 5'-überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Zur Identifizierung und Charakterisierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA wurden Restriktionsverdauungen durchgeführt. In 20 μl Ansätzen wurden üblicherweise 2 μl DNA einer Minipräparation (2.2.2.3) oder 1 μg DNA einer Maxi-Präparation (2.2.2.5) und 8 bis 20 Einheiten Restriktionsenzym (je nach Enzymkonzentration) und dem entsprechenden 1 x Restriktionspuffer eingesetzt. Mit A. dest. wurde das Restriktionsvolumen auf 20 μl aufgefüllt. Die Probe wurde nach Herstellerangaben (*New England Biolabs*) mindestens 60 Minuten bei dem für das Restriktionsenzym beschriebene Temperaturoptimum inkubiert. Zur Analyse wurde der Restriktionsansatz mit Probenpuffer vermischt und in einem Agarosegel aufgetrennt. Präparative Restriktionsverdauungen von PCR-Fragmenten und Plasmiden bzw. Cosmiden wurden in 50 - 100 μl Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde 10-20 μg DNA eingesetzt. Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.16), konnte die DNA zu weiteren Versuchen eingesetzt werden.

2.2.2.12 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Bei der Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen an den Schnittstellen freie 3'-OH-Enden sowie freie 5'-Phosphatgruppen. Während einer nachfolgenden Ligation kann eine Rezirkulation des Vektors stattfinden. Um dieses zu verhindern kann die freie 5'-Phosphatgruppe an der Schnittstelle eines linearisierten DNA-Fragmentes enzymatisch abgespalten werden. Die Dephosphorylierung wurde mit alkalischer Phosphatase durchgeführt. Die Dephosphorylierung von DNA mit 5'-Überhang erfolgte in einem 100 μl Ansatz, in dem eine Einheit alkalischer Phosphatase pro μg DNA in dem dazugehörigen Puffersystem (1 x) eingesetzt, und insgesamt für 60 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Nach 30 Minuten wurde erneut Enzym hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EGTA (5 mM Endkonzentration) und einer fünfminütigen Inkubation bei 75°C beendet. Die Dephosphorylierung von DNA mit 3'-Überhang erfolgte für 15 Minuten bei 37°C. Nach Zugabe von frischem Enzym wurde die Temperatur auf 55°C erhöht. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion wie bereits beschrieben beendet. Die alkalische Phosphatase wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.9), oder mittels des *Easy Pure DNA Purification* Kit aus einem Agarosegel (2.2.2.16) entfernt.

2.2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligrationsreaktion wird zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit einem linearisierten Plasmid- bzw. Cosmid-Vektor eingesetzt. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen Phosphatresten am 5'-Ende von doppelsträngigen DNA-Molekülen und benachbarten 3'-Hydroxylgruppen. Vektor- und *Insert*-DNA wurden in

einem äquimolaren Verhältnis, mit 1 x T4-Ligationspuffer und 1 μl T4-Ligase (5 Weiss Einheiten) in einem Gesamtvolumen von 10 μl eingesetzt. Die Ligationsreaktion von überhängenden Enden erfolgte bei 4°C über Nacht, die von glatten Enden bei RT für vier Stunden. Die Ligationsansätze wurden anschließend zur Transformation von *E. coli* DH5 α - Zellen (2.2.2.2) verwendet.

2.2.2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der von Saiki (Saiki R.K., 1988) beschriebenen *polymerase chain reaction* (PCR) werden Abschnitte eines DNA-Moleküls, die von zwei Oligonukleotiden begrenzt sind, vervielfältigt. So können kleinste Mengen DNA spezifisch amplifiziert und nachgewiesen werden. Die gewünschte DNA-Sequenz wird mit exponentiell ansteigender Rate reproduziert. Die Vervielfältigung erfolgt in der Regel durch die DNA-Polymerase I von *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Diese ist hitzestabil und wird auch bei höheren Temperaturen nicht denaturiert. In einer zyklischen Abfolge von Hitzedenaturierung der Matrizen (*Template*)-DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide (*Primer-Annealing*) und DNA-Synthese (Elongation) erfolgt die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes.

Für den optimalen Verlauf der PCR ist die Pufferzusammensetzung von großer Bedeutung. Die Anwendung folgender Kits ermöglicht die Ermittlung der idealen Pufferbedingungen für jede individuelle PCR. Es wurde der *MasterAmpTM PCR Optimization Kit* (*Epicentre Technologies*, Biozym) verwendet, dessen 12 verschiedene 2 x Puffer neben konstanter Salz- und dNTP-Konzentration jeweils unterschiedliche Magnesiumchlorid- bzw. *MasterAmpTM Enhancer*-Konzentrationen aufweisen. Der *FailSafeTM PreMix Selection Kit* (*Epicentre Technologies*, Biozym) wurde ebenfalls verwendet. Die 12 *PreMixes* enthalten Tris-HCL, KCL und 400 μM von jedem dNTP. Die Magnesiumchlorid- und die *PCR Enhancer*-Konzentration variiert in den einzelnen *PreMixes*. Weiterhin kam der *MasterAmpTM high fidelity ExtraLong Kit* (*Epicentre Technologies*, Biozym) für die Amplifizierung des P300- (8500 bp) und des P235-ORFs (6500 bp) zum Einsatz. Ein 50 μl Ansatz enthielt: 1 – 2 μg genomische DNA bzw. 100-500 ng Cosmid- oder Plasmid-DNA; je 0,2 μM (Endkonzentration) vom *sense* und *antisense* Oligonukleotid; 1,25 – 2,5 Einheiten des Polymerase-Mix (*Epicentre Technologies*, Biozym) und 25 μl eines der 12 (2 x) *PreMixes*-Puffer. Mit HPLC-Wasser wurde das Volumen auf 50 μl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in einem automatischen *Thermocycler* üblicherweise unter folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung der DNA: 2 - 3 min bei 95°C
2. Denaturierung der DNA: 30 - 60 sek bei 95°C
3. Hybridisierung der Oligonukleotide (*Annealing*): 30 sek bei 55°C - 62°C
4. DNA-Synthese (Elongation): 1 min pro 1000 bp bei 72°C
5. Finale Elongation: 5 - 10 min bei 72°C

Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Oligonukleotide und liegt üblicherweise 4°C-10°C unter der errechneten Schmelztemperatur T_m

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

Die Anzahl der Zyklen lag je nach PCR zwischen 30 und 35. Nach Beendigung der Amplifizierung wurden je 1 μ l der PCR-Ansätze gelelektrophoretisch überprüft. Als Kontrollen dienten Ansätze die jeweils nur ein Oligonukleotid enthielten und Ansätze ohne DNA, um unspezifische Amplifikationen bzw. Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen. Präparative PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (2.2.2.16).

2.2.2.15 Semi-Quantitative *real-time* RT-PCR

Unter Anwendung dieser Methode wurde die Quantifizierung des mRNA Spiegels von *P300* in promastigoten Leishmanien durchgeführt. Dazu wurden 3×10^7 Leishmanien sedimentiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini* Kits nach Angaben des Herstellers. Es folgte die cDNA-Synthese unter Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription* Kits. Die gewonnene cDNA wurde, mit spezifischen Oligonukleotiden (2.1.8), auf die Transkripte von *P300* und Actin (interner Standard) untersucht. Dabei kam der *RealMasterMix* Kit, der den Farbstoff SYBR Green I enthält, zum Einsatz. Die Amplifizierung und Quantifizierung erfolgten in dem *real time* PCR *Cycler* Rotorgene 3000 (*software version* 6). Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Dorothea Zander durchgeführt.

2.2.2.16 Mykoplasmen-Kontrolle mittels PCR

Eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen wurde mittels PCR (2.2.2.14) ausgeschlossen. Mit Hilfe der Oligonukleotide MGSO und GPO-3 (2.1.8) lassen sich Sequenzen der 16S rRNA von verschiedenen Mykoplasmen-Arten amplifizieren (Ossewaarde J.M., 1996; van Kuppeveld F.J.M., 1992). Die Oligonukleotide wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,2 μ M in die PCR eingesetzt. Als Matrizen-DNA (*Template*) diente Zellüberstand, der für 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurde. Es wurde jeweils 1 μ l

dieser Zelllysate verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente eine mit Mykoplasmen verunreinigte Plasmodium-Kultur. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. Denaturierung der DNA: 3 min 95°C
2. Denaturierung der DNA: 20 sek 95°C
3. Hybridisierung der Oligonukleotide (*Annealing*): 30 sek 55°C
4. DNA-Synthese (Elongation): 30 sek 72°C
5. Finale Elongation: 5 min 72°C

Insgesamt fanden 35 Zyklen statt. Sind Mykoplasmen in einer Kultur vorhanden, wird ein ca. 270 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch überprüft (2.2.2.17).

2.2.2.17 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde der *Easy Pure DNA Purification* Kit von Biozym verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel unter langwelligem UV-Licht λ (=365 nm) ausgeschnitten. Das Gewicht des ausgeschnittenen Agarosestücks wurde bestimmt. Anschließend wurde es in drei Volumen *SALT*-Lösung vollständig bei 55°C gelöst. Es wurden 1 μ l / μ g + 5 μ l erwarteter DNA-Ausbeute der *BIND*-Lösung (Glasmilch) hinzugefügt. Die Glasmilch enthält eine Silikatmatrix, an der die DNA gebunden wird. Es folgte eine Inkubation mit gelegentlichem Schwenken bei RT für fünf Minuten. Nach einer Zentrifugation der Probe (5 sek, 18500 x g, RT) wurde das Sediment in 1 ml *WASH*-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 sek, 18500 x g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 20 μ l TE-Puffer oder A. dest. mindestens fünf Minuten bei RT gelöst. Danach erfolgte eine Sedimentation der Probe (1 min, 18500 x g, RT). Der Überstand mit der gelösten DNA wurde sofort abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 μ l der Probe wurde zur Überprüfung in einem Agarosegel analysiert (2.2.2.17).

2.2.2.18 Agarose-Gelelektrophorese

Ein Gemisch verschieden großer DNA-Moleküle kann mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren wandern sie zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit einzelner linearisierter DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Größe. Kleinere Moleküle können aufgetrennt werden, wenn die Poren des Agarosegels enger werden. Dies kann man durch Erhöhung der Agarosekonzentration erreichen. Bei niedriger Agarosekonzentration werden die Poren weitmaschiger und lassen eine Auftrennung größerer Moleküle zu. Entsprechend der

erwarteten Fragmentgrößen wurde 0,7% - 1% Agarose in 50 bis 150 ml 1 x TAE-Puffer (Abhängig von der Größe der Elektrophoresekammer; 2.1.15) durch Aufkochen komplett gelöst. Nach Abkühlung auf 50°C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen. Um Geltaschen für die aufzutragenden Proben zu erhalten, wurde ein Kamm in die noch flüssige Agarose eingesetzt. Nachdem die Agarose zu einem Gel polymerisiert war, wurde die Gelkammer mit 1 x TAE gefüllt, bis die Elektroden und das Gel vollständig bedeckt waren. Nach Entfernung des Kamms, wurden die DNA-Proben mit 0,2 Volumen Ladepuffer (2.1.15) versetzt und in die Geltaschen gegeben. Für den späteren Größenvergleich der aufgetrennten Moleküle wurde ein Längenstandard (2-3µl; 2.1.6) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm für 1-2 Stunden. Nach Beendigung des Gellaufs konnten die DNA-Banden, durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

2.2.2.19 Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE)

Um eine hohe Auflösung bei der Auftrennung von über 10 kb langen DNA-Molekülen zu erreichen, wurde die FIGE angewandt. Dabei wird die Polarität der Elektroden periodisch um 180° umgekehrt (Richtungswechsel des elektrischen Feldes). Die DNA-Moleküle wandern zunächst vorwärts, und dann bei umgekehrter Polarität rückwärts. Für den ständigen Richtungswechsel benötigen größere DNA-Moleküle mehr Zeit (Relaxierung und neu Orientierung), und wandern im Gel deshalb insgesamt langsamer. Eine „Netto-Vorwärtsbewegung“ wird erreicht, indem die Vorwärtsbewegung stets länger erfolgt als die Rückwärtsbewegung. Weiterhin kann der Einsatz von hohen Spannungen (Volt-Gradient) während der Vorwärtsbewegungen, bei gleich bleibender *pulse time* zur Netto-Vorwärtsbewegung führen. Es wurde 3 g Agarose in 300 ml 0,5 x TBE (2.1.15) durch Aufkochen vollständig gelöst. Die auf ca. 55°C abgekühlte flüssige 1%ige Agarose wurde in eine Gelkammer (*Gator™ Large Format Horizontal Systems, Owl; Model A5 20 x 25 cm*) gegossen und mit einem Kamm versehen. Nachdem die Agarose zu einem Gel polymerisiert war, wurde es mit 0,5 x TBE überschichtet und mit DNA-Proben und Längenstandards (2.1.6) beladen. Die Elektrophorese lief über 16 Stunden bei 4°C. Dabei kam folgendes *multi phase* Programm für den Größenbereich 5 - 250 kb zum Einsatz:

	<u>Programm 1</u>	<u>Programm 2</u>
Spannung:	200 Volt	200 Volt
Einlaufzeit:	10 min	/
Gesamtlaufzeit:	8 Stunden	8 Stunden
<i>Pulse time:</i>	1-20 sek	0,8-1,5 sek
<i>Mode:</i>	<i>reverse</i>	<i>reverse</i>
FIR:	3:1	3:1

Es wurde der Hoefer PC500 *SwitchBack Pulse Controller* verwendet. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel in 0,5 x TBE mit 10 µg/ml Ethidiumbromid für ca. 30 Minuten gefärbt, und für 10-15 Minuten in A. dest. entfärbt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

2.2.2.20 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Schwartz D. C., 1984)

Die FIGE stellt die einfachste Form der PFGE dar. Ein Nachteil der FIGE ist, dass die DNA-Moleküle einen Großteil der Zeit rückwärts wandern, was in einen langen Elektrophoreselauf resultiert. Eine Weiterentwicklung ist die *rotating field electrophoresis* (Rothaphor™; Biometra). Durch Rotierung der Elektroden kann das elektrische Feld in jeden gewünschten Winkel angelegt und variiert werden kann. Dies führt zu einer zickzack-Wanderung der DNA-Moleküle und resultiert in einem verbesserten Elektrophoreselauf und einer optimalen Auflösung. Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von hochmolekularen Nukleinsäuren, wie Chromosomen.

Große DNA-Moleküle werden bei einer herkömmlichen Isolierung und Reinigung häufig durch Scherkräfte zerkleinert. Um dies zu Verhindern, erfolgte die Isolierung von genomischer DNA für die PFGE in Agaroseblöckchen.

2.2.2.20.1 Herstellung von chromosomaler DNA in Agaroseblöcke für die PFGE

ESP-Puffer

0,5 M EDTA
1% Laurylsarcosin
2 mg/ml Proteinase K

Die Leishmanien wurden sedimentiert (10 min, 1258 x g, RT), und zweimal mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in 1 x PBS (pH 7,0) resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 1%iger InCert-Agarose (*low melting*), welches auf 55°C abgekühlt war, vermischt (Endkonzentration Agarose: 0,5%). Die Mischung wurde sofort und

luftblasenfrei in vorbereitete Giessförmchen (Biometra) gefüllt, kurz auf Eis, und zusätzlich für 5-10 Minuten bei 4°C inkubiert. Pro Block wurden $2,5 \times 10^7$ Zellen eingebettet. Nach Erstarrung der Blöcke wurden diese aus den Giessförmchen herausgenommen und zur Lyse der Leishmanien in ESP-Puffer überführt, und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Die Blöcke können in ESP-Puffer ohne Zusatz von Proteinase K bei 4°C gelagert werden.

2.2.2.20.2 Auftrennung von Chromosomen mittels PFGE

Zur Durchführung der PFGE wurde das Rotaphor-Gerät (Typ V von Biometra) verwendet. Es wurde ein 1%iges Agarosegel in 0,25 x TBE (2.1.15) hergestellt. Es wurden jeweils 1/2 Chromosomen-Blöckchen (entspricht $1,25 \times 10^7$ Leishmanien) und in Agarose eingebettete Längenstandards (2.1.6) in die Geltaschen überführt, und mit flüssiger 1%iger InCert-Agarose verschlossen. Die PFGE wurde bei max. 13°C in 0,25 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gesamtlaufzeit:	48 Stunden
Intervall in sek.:	150-30 log
Winkel in °:	130-115 lin
Spannung in Volt:	190-175 lin
Rotorgeschwindigkeit:	7

Anschließend erfolgte die Färbung des Gels in 0,25 x TBE mit 10 µg/ml Ethidiumbromid für 30-40 Minuten und eine Entfärbung in A. dest. für 20 Minuten. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Es folgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (2.2.2.20).

2.2.2.21 Transfer von DNA auf eine Membran (Southern Blot)

Denaturierungslösung=Transferlösung

0,2 M NaOH
1,5 M NaCl

Der *Southern Blot*, von E.M. Southern 1975 entwickelt, dient zum Nachweis von spezifischen DNA-Fragmenten und erfolgt nach dem Kapillar-Blot-Verfahren. Es wurde ein alkalischer *Southern Blot* durchgeführt nach einem modifizierten Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) (Sambrook J., 1989). Cosmid bzw. genomische DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Die entstanden DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese (ohne Ethidiumbromid) über Nacht bei 4°C und einer Spannung von 2 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht photographisch

dokumentiert (mit Lineal als Größenvergleich). Indem das Gel anschließend für 15-20 min in 0,2 N HCl-Lösung geschwenkt wurde, erfolgte die partielle Depurinierung der DNA. Dies erleichtert den Transfer von großen DNA-Fragmenten auf die Membran. Das Gel wurde mit A. dest. 2 - 3 mal gespült und anschließend für 60 Minuten in Denaturierungslösung geschwenkt. Der Blotaufbau geschah wie folgt: Eine Lage 3 MM Whatman Filter wurde in Transferlösung äquilibriert und als Salzbrücke auf den Träger der Blotkammer gelegt. Zwei Enden der Salzbrücke waren stets in Transferlösung getränkt. Danach wurde das denaturierte Gel (*upside down*) auf die Salzbrücke gelegt, gefolgt von einer positiv geladenen Nylonmembran (*Biodyne®Plus Membrane*, 0,45 μm), die zuvor in A. dest. rehydriert und in Transferlösung äquilibriert worden war. Vier weitere Lagen 3 MM Whatman Filter (vorher in Transferlösung äquilibriert) und eine dicke Schicht Zellstoffpapier wurden auf die Nylonmembran gelegt. Zum Schluss wurde der Blotaufbau mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Durch Kapillarkräfte wurde die Transferlösung von unten nach oben in den trockenen Zellstoffpapierstapel gesaugt; dadurch wurde die DNA auf die Membran übertragen. Der *Southern Blot* erfolgte über vier Stunden (Cosmide) oder über Nacht (genomische DNA, Chromosomen). Nach Beendigung des Transfers wurden die Orientierung und die Lage der Taschen auf der Nylonmembran gekennzeichnet, bevor diese vom Gel abgenommen wurde. Durch UV-*crosslinking* (1200kJ, UV Stratalinker™ 1800) der noch feuchten Membran von beiden Seiten, und Inkubation der Membran bei 80°C im Vakuumofen für 20 Minuten wurde die DNA immobilisiert (kovalent an die Membran gebunden). Die Hybridisierung der Membran mit DIG-markierten bzw. radioaktiv-markierten DNA-Sonden wurde wie unter 2.2.2.24 beschrieben durchgeführt.

Für den Transfer von Chromosomen auf eine positiv geladene Nylonmembran wurden, abweichend zum oben beschriebenen Protokoll, die Agarosegele für ca. 5 Minuten dem UV-Licht (302 nm) ausgesetzt. Die Denaturierung und der Transfer der DNA erfolgten in 0,4 M NaOH / 1 M NaCl-Lösung.

2.2.2.22 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden wurden im Rahmen einer *Southern Blot*-Analyse eingesetzt. DIG ist ein Steroid und kommt ausschließlich in Blättern und Blüten von *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata* vor. Aus diesem Grund können anti-DIG Antikörper an keine weiteren biologischen Moleküle binden, was zu einer hohen Spezifität und einem geringem Hintergrund führt. Die zu markierende DNA wurde mittels *random primed DNA labeling* (Feinberg A.P., 1983) markiert. Bei dieser Technik wird ein Gemisch von Hexanukleotiden (Zufalls-Oligonukleotide) eingesetzt. Diese hybridisieren an die denaturierte *Template*-DNA

und dienen der Klenow-Polymerase als Startstelle für die DNA-Synthese, in deren Verlauf auch DIG-dUTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird. Die Herstellung von DIG-markierten Sonden erfolgte unter Verwendung des *DIG DNA Labeling and Detection Kits*. DIG ist über einen *spacer* an Position C-5 von dUTP gekoppelt. In einem 20 μ l Ansatz war ca. 1 μ g der *Template*-DNA enthalten, die 10 Minuten in einem kochendem Wasserbad denaturiert und 5 Minuten auf Eis abgekühlt wurde. Es folgte die Zugabe von 2 μ l 10x Hexanukleotidgemisch, 2 μ l dNTPs (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,66 mM dTTP, 0,33 mM DIG-dUTP) und 2 Einheiten Klenow-Polymerase. Die Markierung wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die nicht-eingebauten dNTPs wurden am nächsten Tag durch Gelfiltration mit Hilfe von Nuc Trap \rightarrow *push columns* nach Herstellerangaben entfernt. Die aufgereinigten Sonden wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.23 Qualitätskontrolle der DIG-markierten Sonden (*spot test*)

Die *spot test*-Analyse diente zur Überprüfung der Markierungseffizienz der DIG-markierten Sonden. Dabei wurden die gereinigten Sonden mit einer DIG-markierten Kontroll-DNA (*DIG DNA Labeling and Detection Kit*) verglichen. Die Konzentration der Kontroll-DNA betrug 5 ng/ μ l. Es wurden serielle Verdünnungen der Kontroll-DNA, und von den zu testenden Sonden in TE-Puffer wie folgt hergestellt: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1: 100000. Jeweils 1 μ l der Verdünnungen wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200kJ, UV Stratalinker™ 1800) kovalent an die Membran gebunden. Der Nachweis der DIG-markierten DNA wurde wie in 2.2.2.25 beschrieben durchgeführt.

2.2.2.24 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte ebenfalls nach der *random primed DNA labeling* Methode (2.2.2.21). Es wurde der *Prime-a-gene® Labeling Kit* verwendet. Hierbei wurden 25 ng eines linearen DNA-Fragments in 10 μ l A. dest. für zwei Minuten bei 95°C aufgeköcht. Nach fünfminütiger Abkühlung auf Eis wurden der denaturierten DNA 1 x Labeling Buffer, 400 μ g/ml (Endkonz.) BSA, je 20 μ M (Endkonz.) dCTP, dTTP und dGTP, sowie 50 μ Ci ³²P-dATP (333 nM Endkonz.) und 5 Einheiten Klenow-Polymerase zugegeben. Die Markierung erfolgte für eine Stunde bei RT. Die nicht-eingebauten dNTPs wurden mittels Gelfiltration mit Hilfe von *MicroSpin TMS-300 HR Columns* entfernt. Überschüssige dNTPs blieben am Säulenmaterial gebunden, während die markierte Sonde im Durchlauf enthalten war.

2.2.2.25 Hybridisierung von Membranen mit DNA-Sonden

Southern Blot-Membranen (Nylonmembranen) wurden in Hybridisierungsröhrchen überführt, und eine Stunde bei 65°C im Hybridisierungsofen mit Hybridisierungslösung (*Puregene* Hyb-9) prähybridisiert. Währenddessen wurden DIG- oder radioaktiv-markierte Sonden bei 95°C für 5 – 10 Minuten denaturiert und mit frischer Hyb-9 Lösung zur Membran in die Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Da die Sonde mehrmals verwendet werden konnte, wurde sie am nächsten Tag abgenommen und bei –20°C aufbewahrt. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschriffe, um fehlerhafte Basenpaarungen zwischen Sonde und fixierter DNA aufzuheben, und um nicht hybridisierte Sonde zu entfernen. Hierzu wurde die Membran in verschiedenen Puffern mit steigender Stringenz bei 65°C wie folgt inkubiert:

2 x 5 min in 2 x SSC/0,5%SDS

1 x 20 min in 1 x SSC/0,5% SDS

1 x 30 min in 0,5 x SSC/0,5%SDS

1 x 30 min in 0,2 x SSC/0,5%SDS

Die markierte DNA auf der Membran wurde immunologisch (2.2.2.25) bzw. durch Autoradiographie (2.2.2.26) sichtbar gemacht.

2.2.2.26 Immunologischer Nachweis von DIG-markierter DNA

Blockierungslösung

1 x PBS

0,2 % I-Block

0,02 % Natriumazid

0,02 % Tween 20

Alkalische Phosphatase (AP) Puffer

100 mM Tris-HCl (pH 9,5)

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

Färbelösung

10 ml AP-Puffer

3,3 mg Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT in 70% Dimethylformamid gelöst)

2,5 mg BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid)

Für den Nachweis von DIG-markierter DNA auf Membranen wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-DIG Antikörper (2.1.7) verwendet. Die Membran wurde nach der Hybridisierung 5 min bei RT in 1 x PBS (pH 7,0) äquiliert und anschließend eine

Stunde in Blockierungslösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Behandlung der Membran mit dem anti-DIG Fab Fragment erfolgte für 1-2 Stunden (1:5000 Verdünnung in Blockierungslösung) auf dem Schüttler. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1 x TBS für jeweils 3 min und durch zweimaliges Waschen mit AP-Puffer für jeweils 1 min entfernt. Für den kolorimetrischen Nachweis wurde die Membran für 15 min in AP-Puffer äquilibriert. Die anschließende Behandlung der Membran mit der Färbelösung wurde im Dunkeln durchgeführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe eines EDTA-haltigen Puffers (TAE-Puffer) nach Entwicklung der Banden gestoppt und die Filter getrocknet.

2.2.2.27 Nachweis von radioaktiv-markierter DNA (Autoradiographie)

Die Membran wurde nach Hybridisierung und nach dem Waschen (2.2.2.24) in durchsichtiger Folie luftblasenfrei umwickelt und in eine lichtundurchlässige Filmkassette mit einem *intensifying screen* gelegt. Im Dunkeln wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt (Kodak Biomax MS Film) und die Kassette verschlossen. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde die Kassette bei -70°C gelagert. Die Expositionszeit variierte von 1 Stunde bis zu mehreren Tagen. Anschließend wurde der Film entwickelt. Die Belichtung des Röntgenfilms durch die von ^{32}P ausgehenden Betastrahlen führt zur Schwärzung des Films, und gibt die Position der markierten DNA auf der Membran wieder.

2.2.2.28 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mittels einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger F., 1977) durchgeführt. Während einer PCR werden neben dNTPs (2'-Desoxynukleotiden) auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (2',3'-Didesoxynukleotide) eingebaut. Dabei sind die vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe der ddNTPs kommt es beim Einbau eines ddNTPs zum Stop der DNA-Synthese. Es entstehen DNA-Fragmente von unterschiedlicher Länge. Die PCR-Produkte werden anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, und anhand der Reihenfolge der Fluoreszenzsignale kann die Sequenz der DNA ermittelt werden. Es wurde das *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* von Applied Biosystems verwendet. Für die Sequenzierung wurde hochreine DNA aus einer Maxipräparation (2.2.2.5) eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 1 μg *Template*-DNA, 10 pmol des *sense* oder *antisense* Sequenzier-Oligonukleotids und 4 μl des sogenannten *Ready Reaction Mix*. Dieser *Ready Reaction Mix* enthielt ddNTPs konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoffen, dNTPs, Tris-HCL pH 9,0, Magnesiumchlorid, thermostabile Pyrophosphatase und *Ampli-Taq*[®] DNA-Polymerase. Das Volumen der

Reaktionsansätze wurde mit HPLC-Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Die Sequenzierungsreaktion wurde im Biometra *Thermocycler* nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung: 10 sek bei 96°C

Hybridisierung der Oligonukleotide: 5 sek bei 50°C

DNA-Synthese: 4 min bei 60°C

25 Zyklen

Nach Beendigung der Sequenzierungsreaktion erfolgte die Fällung der DNA. Dafür wurden die Ansätze mit HPLC-Wasser auf 80 μ l aufgefüllt und mit 10 μ l 3 M NaAc (pH 4,6) und 250 μ l Ethanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 18500 x g, RT. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das DNA-Präzipitat mit 250 μ l 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA 10 min bei 37°C im Heizblock vollständig getrocknet, und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung (2.2.2.28) bei -20°C gelagert.

2.2.2.29 Auftrennung und Digitalisierung der Sequenzdaten

Ladepuffer

80% deionisiertes Formamid

50 mM EDTA (pH 8,0)

6% Polyacrylamidgel

6% Polyacrylamid/Bisacrylamid (19:1)

1 x TBE

8,3 M Harnstoff

0,03% APS

1/2500 Vol TEMED

Laufpuffer: 1 x TBE

Die weitere Behandlung des DNA-Sediments wurde freundlicherweise von Frau S. Ofori und von Frau H. von Tien übernommen. Das in Ladepuffer aufgenommene DNA-Sediment wurde in einem 6%igem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Bestrahlung mit einem Laser konnten die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe digitalisiert (ABI PRISM™ 377 DNA-Sequencer, Applied Biosystems), dokumentiert und den entsprechenden Nukleotiden zugeordnet werden (Sequencing Analysis, Version 3.0, Applied Biosystems).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Überexpression fremder Gene in *E. coli* zur Antigen-Gewinnung

Für die rekombinante Expression des P300-Genprodukts wurde der *P300*-ORF in die multiple Klonierungstelle (mcs) des Vektors pJC45 kloniert. Das Gen stand somit unter der Kontrolle des T7-Promotors und des *lac*-Operators. *E. coli* BL21 (DE3) [pAP/*lacI*^Q]-Zellen (2.1.10) wurden mit pJC45-*P300* Konstrukten transformiert.

In das Bakterienchromosom des lysogenen *E. coli* BL21 (DE3) [pAP/*lacI*^Q] Stammes ist das Genom des Bakteriophagen DE3 integriert. DE3 ist ein Derivat des λ -Phagen. Um eine Excision aus dem Genom bzw. eine Integration an anderer Stelle zu verhindern, ist ein DNA-Fragment im *int*-Gen des Phagen integriert. Dieses DNA-Stück trägt das *lacI*-Gen (kodiert für den *lac*-Repressor), den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-RNA-Polymerase. Die T7-RNA-Polymerase liegt unter der Transkriptionskontrolle des *lacUV5*-Promotors. Dieser ist durch Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) induzierbar. IPTG ist ein synthetisches Substratanalogon und wird nicht von der β -Galactosidase metabolisiert.

Ein weiteres Plasmid dieses Stammes trägt neben einem Kanamycin-Resistenzgen noch ein zusätzliches *lacI*-Gen. In *E. coli* Wildtypzellen macht der *lac*-Repressor nur 0,001% des Gesamtproteins aus. Diese Menge würde nicht ausreichen, um das Laktoseoperon, den *lac*-Operator im UV5-Promotor und den *lac*-Operator auf dem Vektor pJC45 mit funktionstüchtigen Repressoren zu versorgen. Im uninduzierten Zustand wird der *lacUV5*-Promotor negativ reguliert. Durch Bindung von IPTG an den *lac*-Repressor erfährt dieser eine Konformationsänderung und kann nicht mehr an den *lac*-Operator binden. Der *lacUV5*-Promotor wird aktiviert und es kommt zur Transkription der T7-RNA-Polymerase, die dann an den T7-Promotor bindet. Die Transkription des P300-ORF kann nun erfolgen.

2.2.3.2 Induktion der Proteinexpression

E. coli BL21 (DE3) [pAP/*lacI*^Q] Zellen wurden mit pJC45-*P300* Konstrukten transformiert (2.2.2.2). Als Kontrolle wurde der pJC45-Vektor ohne *insert* transformiert (Vektor-Kontrolle). Einzelkolonien der über Nacht gewachsenen Transformanden wurden in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin und 10 μ g/ml Kanamycin überführt. Für Test-Expressionen wurden 10 ml Kulturen verwendet; für präparative Proteinexpressionen 400 ml Ansätze. Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt, bis sie eine OD_{600nm} von 0,1 - 0,2 erreicht hatten. Je 1 ml der Bakterienkultur wurde als Negativ-Kontrolle (uninduzierte Probe) entnommen und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,4 mM IPTG (Endkonz.) wurden die Ansätze 1,5 h weiter bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden je 1 ml der induzierten Kulturen entnommen und die

OD_{600nm} gemessen. Uninduzierte und induzierte Proben wurden sedimentiert (5 min, 18500 x g, 4°C), zweimal mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen und in 1x SDS-Probenpuffer (2.1.15) aufgenommen, so dass die Proben vor und nach der Zugabe von IPTG die gleiche Dichte hatten. Es folgte eine fünfminütige Denaturierung der Proben bei 95°C. Die anschließende Behandlung der Proben in einem Ultraschallbad (5 min, 100% Output, max. Temp. 20°C) diente zur vollständigen Zerkleinerung der DNA, um die Viskosität der Probe zu verringern. Nach einer erneuten Sedimentation (3 min, 18500 x g, 4°C) wurden die Proben auf Eis gehalten bis sie in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden (2.2.3.7), oder wurden bei -70°C eingefroren.

2.2.3.3 Aufreinigung der Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

(1x) Bindungspuffer

5 mM Imidazol

0,5 M NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 7,9)

Während der Expression von Proteinen in pJC45 erfolgt die Addition von zehn Histidinen (Histidin-*tag*) am N-Terminus des rekombinant exprimierten Proteins. Dies erlaubt eine Aufreinigung der Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Bei dieser Methode bilden die rekombinanten Proteine über den Histidin-*tag* einen stabilen Koordinationskomplex mit den Nickelionen, die an die Säulenmatrix gekoppelt sind. Die Elution des Proteins erfolgt mit Imidazol-haltigem Puffer in einem Konzentrationsgradienten. Dabei konkurriert Imidazol mit dem Histidin um die Bindung an Nickel.

Es folgte die Sedimentation der restlichen induzierten Bakterienkultur (ca. 400 ml; Beckman Zentrifuge, JA-10 Rotor, 10 min, 5000 rpm, 4°C). Das Zellsediment wurde zweimal mit kaltem 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen, bevor es in 1 x Bindungspuffer (eiskalt) resuspendiert wurde. Die Zellen wurden anschließend durch Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen (7 x 20 sek, 45 % Output). Nach Sedimentation der Probe (Beckman Zentrifuge, JA-12 Rotor, 30 min, 10000 rpm, 4°C) befanden sich die *inclusion bodies* im Sediment der Probe, während die löslichen Proteine im Überstand zu finden waren. Proben vom Sediment und vom Überstand wurden -wie unter 2.2.3.2 bereits beschrieben- mit SDS-Probenpuffer versehen. Um zu überprüfen, ob sich rekombinant exprimiertes Protein in *inclusion bodies* befand, folgte die elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (2.2.3.7). Die Proteine lagen in *inclusion bodies* vor, und mussten demnach unter denaturierenden Bedingungen aus den *inclusion bodies* gelöst werden. Das Sediment wurde in 1 x

Bindungspuffer + 8 M Harnstoff (Endkonz.) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Sedimentation (Beckman Zentrifuge, JA-12 Rotor, 30 min, 10000 rpm, 4°C) wurde eine Probe aus dem Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt und es folgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proben vor und nach Behandlung mit Harnstoff im SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend wurde Säulenmaterial (2,5 ml His Bind Resin, 50 % „slurry“ von Novagen) auf eine leere Säule (Poly-Prep® *Chromatography Columns*) gegeben, das nach dem Absetzen mit A. dest. gespült und schließlich mit 50 mM NiSO₄ beladen wurde. Die Säule wurde mit 1 x Bindungspuffer + 8 M Harnstoff (Endkonz.) äquilibriert. Anschließend wurde lösliches Protein (gelöst aus *inclusion bodies*) auf die Säule gegeben, die daraufhin mit 1 x Bindungspuffer + 8 M Harnstoff (Endkonz.) und steigenden Imidazolkonzentrationen (5 mM, 20 mM, 60 mM Imidazol) dreimal behandelt wurde. Nach den Waschschritten erfolgte die Elution des rekombinant exprimierten Proteins mit 1 x Bindungspuffer + 8 M Harnstoff (Endkonz.) und 250 mM Imidazol. Dabei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.2.3.7) aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau (2.2.3.8) sichtbar gemacht.

2.2.3.4 Dialyse von Proteinlösungen

Nach der Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (2.2.3.3) wurden die eluierten Proteinfractionen gegen 1 x PBS (pH 7,0) dialysiert, um den Harnstoff aus den Proben zu entfernen. Hierzu wurde ein Dialyse-Schlauch (Spectra/Por RC, MW cut off 6-8000) in A. dest. für 20 Minuten äquilibriert, an einem Ende mit einer Magnetklammer verschlossen und anschließend mit den Fraktionen des aufgereinigten Proteins gefüllt. Das obere Ende des Schlauches wurde ebenfalls mit einer Klammer versehen. Der gefüllte Schlauch wurde nun in ein Becherglas mit 500 ml sterilem 1 x PBS (pH 7,0) überführt und bei 4°C auf einen Magnetrührer inkubiert. Die Dialyse wurde für mind. vier Stunden, meist jedoch über Nacht durchgeführt. Dabei wurde der Puffer (1 x PBS) mehrfach gewechselt. Nach Beendigung der Dialyse wurde der Inhalt des Schlauches in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.3.6). Die Langzeitlagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.3.5 Herstellung von Proteinextrakten aus *Leishmania*

Promastigote Leishmanien wurden mittels CASY 1-Cell Counter+Analyzer gezählt (2.2.1.1). Das gewünschte Volumen wurde sedimentiert, zweimal mit kaltem 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen (10 min, 1258 x g, 4°C) und auf eine Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/15 µl 1 x SDS-Probenpuffer (2.1.15) eingestellt. Die Proben wurden fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht.

Die anschließende Behandlung der Proben in einem Ultraschallbad (5 min, 100% Output, max. Temp. 20°C) diente zur vollständigen Zerkleinerung der DNA, um die Viskosität der Probe zu verringern. Nach einer erneuten Sedimentation (3 min, 18500 x g, 4°C) wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.7), oder bei -70°C eingefroren.

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (Bradford M.M., 1976)

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte nach dem Bradford-Test mit Hilfe des Roti-Quant Kits von Roth. Dabei handelt es sich um eine kolorimetrische Proteinbestimmung. Die Bindung des Coomassie-Brilliant-Blau G-250 Farbstoffes an Proteine in saurer Lösung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm. Die ungebundene kationische Form des Farbstoffes hat eine rotbraune Farbe, während die anionische Form durch Komplexbildung mit Proteinen stabilisiert wird, und zu einer blauen Färbung führt. Da der Farbstoff vorwiegend an basische Aminosäuren bindet, sollte die Eichkurve mit einem Protein durchgeführt werden, welches annähernd denselben Gehalt an basischen Aminosäuren aufweist. Rinderserum-Albumin hat sich als anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt.

20 µl der Proteinprobe wurde mit 1 ml 1x *staining solution* vermischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Messung der Extinktion gegen den Leerwert (1x *staining solution*) bei OD_{595nm} in einem Photometer (Biomate 3). Anhand einer Eichkurve, die zuvor mit Rinderserum-Albumin in verschiedenen Konzentrationen (1000 µg/ml bis 100 µg/ml) erstellt wurde, erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in µg/ml.

2.2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli U.K., 1970). Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Die Proteine werden durch die Einlagerung von SDS-Anionen denaturiert und mit einer identischen Ladungsdichte versehen. SDS wird im Überschuss zur Proteinprobe gegeben und aufgeköcht (95°C). Dadurch werden die Proteine von negativ geladenen SDS-Molekülen „umhüllt“, und die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Disulfidbrücken werden durch die Zugabe von DTT reduziert (SDS-Probenpuffer 2.1.15). Dies führt zur vollständigen Entfaltung der Proteine. Die Eigenladung, die Faltung und die Struktur der Proteine können die Beweglichkeit der Moleküle im Gel nicht mehr beeinflussen. Die Herstellung von Proteinextrakten für die SDS-PAGE ist unter 2.2.3.5 beschrieben. Durch

die identische Ladungsdichte ist nun ein ladungsunabhängiges Auftrennen der Proteine nur nach ihrer Molekülgröße und der Porengröße des Polyacrylamidgels möglich. Im Gel wandern die Proteine unter elektrischer Spannung mit einer Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Größe zur Anode. Für die Herstellung des Trenn- und Sammelgels wurden unterschiedliche Puffer verwendet. Dies führt im großporigem Sammelgel (schwächer konzentriert) zu einer Konzentrierung der Proteine, was später im eigentlichen Trenngel (stärker konzentriert) in scharfen und klaren Proteinbanden resultiert.

6 % Trenngel

6 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (Vernetzungsgrad 37,5 : 1)
380 mM Tris-HCl (pH 8,8)
0,1 % SDS
0,1 % APS
0,0008 Volumen TEMED

4 % Sammelgel

4 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (Vernetzungsgrad 37,5 : 1)
125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
0,1 % SDS
0,1 % APS
0,001 Volumen TEMED

(1x) SDS-Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)
250 mM Glycin
0,1 % SDS

In eine Gelkassette, die aus zwei mit Ethanol gereinigten Glassplatten und einem Abstandhalter bestand, wurde ein 6%iges Trenngel nach o.g. Rezeptur gegossen. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde dieses mit einem 4%igem Sammelgel überschichtet, in das sofort ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt wurde. Das Sammelgel dient zu Beginn der Elektrophorese der Fokussierung der Proteine, wodurch eine schärfere Trennung erzielt wird. Sobald das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde die Gelkassette in eine vertikale Gelkammer von peqlab eingebaut. Die Gelkammer wurde mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt bis das Gel vollständig überschichtet war, der Probenkamm aus dem Sammelgel entfernt und die vorbereiteten Proteinproben, die bereits in SDS-Probenpuffer gelöst waren in die Taschen des Polyacrylamidgels gegeben. Zur späteren Bestimmung der Molekulargewichte wurden Größenstandards (2.1.6) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 15 V/cm. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (2.2.3.8) bzw. auf eine Membran transferiert (2.2.3.13).

2.2.3.8 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blau

Coomassie-Brilliant-Blau Färbelösung

0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R-250
40 % Ethanol
10 % Essigsäure
50 % A. dest.

Coomassie-Brilliant-Blau Entfärbelösung

40 % Ethanol
10 % Essigsäure
50 % A. dest.

Durch die Färbung mit dem Triphenylmethan Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 können in einem Polyacrylamidgel bis zu ca. 0,1 μg Protein nachgewiesen werden. Der Farbstoff lagert sich an basische Seitenketten der Aminosäuren und färbt dadurch unspezifisch fast alle Proteine.

Die Färbung der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel wurde mindestens zwei Stunden, meist über Nacht durch Schwenken bei RT in der Färbelösung durchgeführt. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels die Farbe wieder abgegeben hatte, und nur noch die blau gefärbten Proteinbanden zu erkennen waren. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Nach der Entfärbung wurde das Gel mit A. dest. gespült, digitalisiert und zwischen zwei Zellophanfolien zur Langzeitaufbewahrung getrocknet.

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

Eine wichtige Anwendung dieser Methode ist die Proteinidentifizierung mittels *Peptide mass fingerprint*. Die zu untersuchende Probe wird mit Trypsin verdaut und auf einem metallischen Träger in eine Matrix gebettet. Da Trypsin Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin spaltete, können die Massen der entstehenden Peptid-Fragmente vorhergesagt werden. Die Probe wird durch Laserbeschuss ionisiert. Die entstandenen gasförmigen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen durch ein Hochvakuum bis sie auf einen Detektor treffen. Je nach ihrer Masse haben die Ionen unterschiedliche Flugzeiten (*time of flight*-TOF). Die Flugdauer bis zum Auftreffen auf den Detektor wird gemessen und auf diese Weise können die Massen der Fragmente errechnet werden. Der massenspektrometrische „Fingerabdruck“ einer Probe ermöglicht die Identifizierung des Proteins in entsprechenden Datenbanken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MALDI TOF Analyse zur Identitätskontrolle der exprimierten Proteine durchgeführt. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Dr. Joachim Clos übernommen. Proteinbanden

wurden aus Coomassie-Brilliantblau-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben und mit Kit Komponenten durchgeführt. Die Proben wurden auf eine sogenannte ZipPlate (Montage In-Gel-DigestZP Kit, Millipore) überführt. Es folgte die Entfärbung, die Behandlung mit Trypsin, die Aufreinigung mittels einer C18 Revers-Phasen-Minisäulen-Chromatographie, und schließlich die Elution der Peptide. Die Peptide wurden auf eine 378 well Platte (400 μm Anchor Plate, Bruker Daltonics, Bremen) überführt. Zu jeder Probe wurde Matrix-Lösung (20 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50 % Acetonitril; 0,1 % Trifluor-Essigsäure) zugegeben. Die Messungen wurden in einem *Autoflex Mass Spectrometer* (Bruker Daltonics, Bremen) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reflektiermodus
Ionenquelle 1 Voltzahl: 19 kV
Ionenquelle 2 Voltzahl: 16,5 kV
Reflektor Voltzahl: 20 kV
Linsen-Voltzahl: 8 kV
Puls Extraktion: 40 ns
Matrix-Suppression: <400 kDa

Die experimentell erhaltenen Massenspektren wurden mit dem *Xmass analysis software package* (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet, und mit dem theoretischen Massenspektrum des 300 kDa Proteins, welches zuvor mit Hilfe des *MS-Digest software package* ermittelt wurde, verglichen.

2.2.3.10 Immunisierung einer Maus und Antikörpergewinnung

Zur Herstellung von P300 Antikörpern wurde eine Maus mit dem rekombinant exprimiertem ca. 65 kDa Protein (N-Terminus des P300) immunisiert. Das Antigen wurde zuvor durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (2.2.3.3) aufgereinigt. Um den Harnstoff aus dem Protein-Eluat zu entfernen erfolgte im Anschluss die Dialyse gegen 1 x PBS (2.2.3.4). Es wurde ca. 120 μg rekombinantes Protein mit komplettem Freund'schem Adjuvanz (cFA) im Verhältnis 1:1 gemischt, und einer NMRI-Maus subkutan in den Rückenbereich injiziert (Tag 0). Freund'sches Adjuvanz (cFA) ist eine Öl-in-Wasser Emulsion, die hitzeinaktivierte Mykobakterien enthält, und zur verstärkten Immunantwort dient (verstärkte Aufnahme durch Makrophagen und erhöhte Induktion von Ko-Stimulatoren in Makrophagen). *Incomplete* Freund'sches Adjuvanz (iFA) enthält dagegen keine abgetöteten Mykobakterien mehr. cFA wurde nur für die Erstimmunisierung (*Priming*) verwendet, während iFA für die nachfolgenden Immunisierungen (*boost*) am Tag 14, Tag 28 und Tag 35 zum Einsatz kam. Für die *booster* Immunisierungen wurden jeweils 120 μg rekombinantes Protein und iFA im

Verhältnis 1:1 verwendet. Eine Woche nach der dritten *booster* Immunisierung wurde der Maus das gesamte Blut (ca. 1,5 ml) entnommen. Es folgte eine Sedimentation für 15 Minuten bei 6000 x g und 4°C. Dabei wurde das Antikörper-haltige Serum von den Zellen des Blutes getrennt. Das gewonnene Antiserum wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Qualität des Antiserums wurde in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.14) überprüft.

2.2.3.11 Immunisierung eines Huhns und Antikörpergewinnung (IgY)

Zur Gewinnung von P300-Antikörpern wurde ein Huhn mit rekombinanten Protein (ca. 65 kDa) immunisiert. Legehennen reichern Antikörper im Eidotter an, somit ist keine Blutentnahme zur Isolierung von Antikörpern erforderlich. Zuvor wurde Präimmenserum -wie nachfolgend beschrieben wird- aus den Eiern der Hühner gewonnen, um dieses in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.14) gegen *Leishmania*-Lysate zu testen. Konnten keine Immunreaktionen beobachtet werden, kamen die Hühner für eine Immunisierung in Frage. Für die Erstimmunisierung wurde 120 µg rekombinantes Protein mit komplettem Freund'schem Adjuvanz im Verhältnis 1:1 gemischt und dem Huhn in den Halsbereich subkutan injiziert (Tag 0). Am Tag 12 und Tag 19 folgten die *booster* Immunisierungen, die mit der gleichen Menge Antigen und *incomplete* Freund'schem Adjuvanz im Verhältnis 1:1 durchgeführt wurden. Am Tag 40 wurde aus dem Eidotter schließlich der Antikörper durch fraktionierende Polyethylenglykol (PEG)-Fällung isoliert (Polson A., 1980; Polson A., 1985).

Kaliumphosphat Puffer

10 mM K₂PO₄ (pH 7,2)

100 mM NaCl

Das Eigelb wurde vom Eiweiß getrennt, mit A. dest. gespült, und nach Entfernung der Dotterhaut mit 1 Volumen Kaliumphosphat Puffer gemischt. Die Eigelb-Emulsion wurde anschließend mit 1 Volumen Kaliumphosphat Puffer mit 7% PEG 6000 versetzt (Endkonz. PEG 3,5%), und für 30 min bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Dabei wurden kontaminierende Lipidverbindungen ausgefällt. Es folgte eine Sedimentation für 10 min bei 10000 rpm und 4°C (Beckman-Zentrifuge JA-12 Rotor). Der Überstand wurde filtriert, und durch den Zusatz von PEG 6000, bis zu einer Endkonzentration von 12%, wurden die Antikörper unter ständigem Mischen gefällt. Nach Sedimentation der Antikörper (Beckman-Zentrifuge JA-12 Rotor, 10 min, 10000 rpm, 4°C) wurden diese in 1 Volumen Kaliumphosphat Puffer resuspendiert. Es folgte eine erneute Fällung der Antikörper durch die Zugabe von Kaliumphosphat Puffer mit 24% PEG 6000 (Endkonz. PEG 12%). Die Probe wurde für 10 min bei 10000 rpm und 4°C (Beckman-Zentrifuge JA-12 Rotor) sedimentiert, in

5 ml Kaliumphosphat Puffer gelöst und ein letztes mal, zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen, zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge JA-12 Rotor; 30 min, 10000 rpm, 4°C). Der Überstand (Antiserum) wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,02% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Qualität des Antiserums wurde in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.14) überprüft.

2.2.3.12 Peptidimmunisierung von Kaninchen

Die Herstellung von zwei Peptidantikörpern gegen P300 wurde bei *Eurogentec* (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben. Um die Chancen auf gute Antikörper zu erhöhen, wurden die Tiere gleichzeitig mit zwei Peptiden immunisiert. Die Peptide, die für die Immunisierung synthetisiert wurden, stammen aus Position aa 72-86 (RHRSMEQRRGKGGVG) und aa 383-398 (QRLRSRSGQPQQSQSG) der P300-Aminosäuresequenz, und wurden nach ausgedehnten Sequenzanalysen und auf Vorschlag von *Eurogentec* ausgewählt. Die synthetischen Peptide wurden an ein KLH-Carrier Protein gekoppelt. Präimmunseren von fünf SPF-(*specific pathogen free*) Kaninchen wurden in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.14) gegen *Leishmania*-Proteine getestet. Nach Auswahl von zwei Kaninchen, deren Präimmunseren nicht mit *Leishmania*-Lysaten reagierten, wurden diese mit einem Gemisch der gekoppelten Peptide immunisiert. Insgesamt fanden vier Immunisierungen der Kaninchen statt: Tag 0, Tag 14, Tag 28 und Tag 56. Es wurden vier Blutentnahmen durchgeführt: Tag 0 (Präimmunserum 2 ml), Tag 38 (2 ml), Tag 66 (22 ml) und Tag 87 (Entblutung 50-70 ml). Nach Erhalt der Antiseren erfolgte die Überprüfung der Qualität in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.14) gegen *Leishmania*-Proteine und gegen das rekombinant exprimierte ca. 65 kDa Protein. Die Peptidantikörper wurden für die Langzeitaufbewahrung bei -70°C gelagert.

2.2.3.13 Transfer von Proteinen auf eine Membran (*Western Blot*) (Renart J., 1979; Towbin H., 1979)

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidifluorid-Membranen (PVDF) übertragen. Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg im *semi dry blot* Verfahren (Kyse-Andersen J., 1984). Das elektrische Feld ist dabei senkrecht zum Gel, welches mit der Membran und den Filtern wie ein „Sandwich“ zusammengelegt ist, ausgerichtet. Dadurch bleibt das Proteinmuster der Auftrennung erhalten. Durch Methanol-haltige Puffer wird das SDS aus den Protein-SDS-Komplexen entfernt und gleichzeitig werden dadurch Wechselwirkungen der Proteine mit der Membranoberfläche verstärkt. Die Bindung der Proteine an die Membran basiert auf hydrophobische Wechselwirkungen.

Transferpuffer

48 mM Tris
39 mM Glycin
0,037 % SDS
20 % Methanol

Die PVDF-Membran (Fluorotrans Membran, 0,2 μm) und 8 Lagen 3 MM Whatman Filter wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde zunächst in Methanol angefeuchtet, mit A. dest. gespült und anschließend, wie die Whatman Filter, in Transferpuffer äquilibriert. Auf die Kathode der Blotkammer wurden 4 Lagen Whatman Filter gelegt, gefolgt vom SDS-Polyacrylamidgel. Die PVDF-Membran wurde danach luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht, und abschließend wurden 4 Lagen Whatman Filter draufgelegt. Die obere Elektrodenplatte (Anode) der Blotkammer wurde aufgesetzt, und der Stapel zusätzlich mit einem Gewicht beschwert. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 1 mA/cm² über 60-90 Minuten. Nach Beendigung des *Western Blots* wurde die Membran direkt für den immunologischen Nachweis der Proteine eingesetzt, oder zwischen Whatman Filter bis zur weiteren Verwendung getrocknet. Trockene Membranen mussten wieder mit Methanol angefeuchtet werden, bevor der immunologische Nachweis erfolgen konnte.

2.2.3.14 Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen (Immuno-Blot)

Blockinglösung

5 % Milchpulver
0,1 % Tween
0,02 % Na-Azid
in 1 x TBS

Waschlösung

0,05 % Tween
1 x TBS

AP-Puffer siehe 2.2.2.25

Färbelösung siehe 2.2.2.25

Die auf die Membran transferierten Proteine konnten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Hierzu erfolgte zunächst die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit einem oberflächen-aktiven Reagenz, das keine Bindung mit dem Antikörper eingehen kann. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die Membran in Blockinglösung für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem spezifischen Primär-Antikörper (Anti-P300 aus Maus 1:300, 1:500; Anti-

P300 aus Huhn 1:500; Anti-P300 aus Kaninchen 1:100, 1:200, 1:500; 2.1.7) in Blockinglösung für mind. eine Stunde bei RT, meist jedoch über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Ungebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen der Membran entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blockinglösung verdünnt (Anti-Maus-IgG-AP bzw. Anti-Huhn-IgY-AP bzw. Anti-Kaninchen-IgG-AP, je 1:2500; 2.1.7) und für eine Stunde mit der Membran bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiger sek. Antikörper durch Waschen (3x) entfernt, und die Membran wurde in AP-Puffer ca. 5 Minuten äquilibriert. Da die sekundären Antikörper mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert waren, konnte der enzymatische Nachweis der Proteine wie unter 2.2.2.25 bereits beschrieben erfolgen. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von EDTA-haltigem Puffer (meist 1xTAE) beendet. Die entwickelte Membran wurde zwischen Whatman Filter getrocknet und anschließend digitalisiert.

2.2.4 Mikroskopie

2.2.4.1 Lichtmikroskopie

Das Wachstum von Leishmanien-Populationen in axenischer Kultur wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops beobachtet. Mit der einfachen Lichtmikroskopie können u.a. eukaryotische Zellen bis zu einem Größenbereich von 0,2 μm sichtbar gemacht werden. Die 10-20 μm großen Promastigoten wurden bei einer 32-fachen Vergrößerung in einem konfokalen Zeiss ID03 Mikroskop beobachtet. Die mikroskopische Kontrolle und die Auszählung von infizierten Makrophagen und intrazellulären Amastigoten erfolgte an einem Zeiss Axioskop mit 63-facher Vergrößerung.

2.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Miltefosin-behandelte und unbehandelte Promastigoten wurden einer REM-Analyse unterzogen. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Andrea MacDonald übernommen. Es wurden 1×10^8 Leishmanien sedimentiert (10 min, 1258 x g, 4°C) und zweimal mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen in 2% Glutaraldehyd in Natriumcacodylat-Puffer und eine Nachfixierung in 1% Osmium. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% Ethanol) entwässert. Nach der *critical point*-Trocknung wurden die Proben mit Gold behandelt und in einem Philips SEM 500 mikroskopisch untersucht.

2.2.4.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Miltefosin-behandelte und unbehandelte Promastigoten wurden einer TEM-Analyse unterzogen. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Manfred Krömer durchgeführt. Es wurden 1×10^7 Leishmanien sedimentiert (10 min, 1258 x g, RT) und zweimal mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen. Die Zellen wurden zur Stabilisierung der Proteinstrukturen für 30 Minuten in 2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift in 1 x PBS (pH 7,0) erfolgte eine 10-minütige Nachfixierung in 2% Osmiumtetroxyd zur Festigung der Membranen. Die Proben wurden in 1 x PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% Ethanol) für eine Stunde entwässert. Die Zellen wurden anschließend in einer aufsteigenden Reihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) eines Propylenoxid-Epon Gemisches eingebettet. Die Aushärtung erfolgte drei Tage bei 60°C. Durch die Imprägnierung der zellulären Strukturen wird verhindert, dass diese im Vakuum des Elektronenmikroskops kollabieren. Die Herstellung der Ultradünnschnitte (50 nm) wurde nach Aushärtung der Blöcke mit Hilfe des Ultramikrotoms (Leica, Diamantmesser) durchgeführt. Die Schnitte wurden auf Objektträger, bestehend aus Kupfernetzchen, sogenannte *grids* überführt und getrocknet. Die Kontrastierung der Präparate erfolgte am nächsten Tag durch die 10-minütige Behandlung mit einer gesättigten Uranylacetatlösung (in A. dest.). Nach drei Waschschriften und Trocknung der Präparate wurden diese mikroskopisch mittels eines Philips TEM 301 Geräts untersucht.

2.2.5 Elektronische Bildbearbeitung

Fotografien von Agarosegelen, Coomassie-Brilliantblau gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen, Membranen von *Western-* und *Southern-Blots*, und Autoradiogramme wurden mit einem Flachbettscanner (Scan Maker 8700, Microtek) digitalisiert. Fotos von Makrophageninfektionen, TEM- und REM-Bilder wurden mit Hilfe des Nikon Super Coolscan 4000 35 mm-Film Scanner digitalisiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte in Adobe Photoshop 7.0.1. Die Bilder wurden im JPEG-Format importiert und in Intaglio 2.9.2 mit Beschriftungen versehen. Schemazeichnungen wurden ebenfalls in Intaglio 2.9.2. angefertigt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Komplementationsgenetik, Gene in *Leishmania* identifiziert werden, die durch Erhöhung ihrer Kopienzahl Miltefosin-Resistenz hervorrufen können. Für die folgende Arbeit wurde eine Cosmidbank genomischer DNA der viszerotropen Spezies *Leishmania infantum* verwendet. Diese Cosmid-Genbank wurde freundlicherweise von Dr. Katja Mellenthin zur Verfügung gestellt. Die aus *L. infantum* Wildtyp (*Li* WT) Promastigoten isolierte genomische DNA wurde einem Partialverdau mit *Sau3AI* unterzogen und die resultierenden Fragmente in den Cosmid *shuttle vector* pcosTL (Kelly J.M., 1994); 2.1.9) ligiert. Die Cosmid-Genbank wurde anschließend auf ihre Repräsentativität und Heterogenität hin überprüft und entsprach den Anforderungen hinsichtlich ihrer Komplexität (Mellenthin, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch Elektroporation wurde die Cosmid-Genbank in *Li* WT-Promastigoten transfiziert (2.2.1.3). Nachfolgend wurden die rekombinanten Leishmanien einer Selektion mit G418 unterzogen. Der Cosmid *shuttle vector* pcosTL wurde als Negativ-Kontrolle ebenfalls in *Li* WT transfiziert.

3.1 *In vitro* -Selektion Miltefosin-resistenter Promastigoten

3.1.1 Bestimmung der IC₉₅ (*inhibition concentration*) für Miltefosin

Die Selektion sollte bei einer Miltefosin-Konzentration erfolgen, bei der die Kontrolle *Li* [pcosTL] fast vollständig am Wachstum gehindert wird. Hierfür wurde die IC₉₅ für Miltefosin ermittelt. Logarithmisch wachsende *Li* [pcosTL]-Zellen wurden mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellzahlen bestimmt. Abbildung 1 zeigt die Dosis-Hemmkurve für Miltefosin und *Li* [pcosTL]. Aus den gewonnenen Daten ergibt sich eine IC₉₅ von ca. 40 µM für Miltefosin in dem verwendeten Parasitenisolat.

3.1.2 Erste Selektion auf Miltefosin-resistente Promastigoten

Die Selektion auf Miltefosin-resistente Promastigoten und die anschließende Identifizierung der Cosmidtypen ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die rekombinanten Parasiten wurden mit einer Zelldichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml (Z/ml) und 40 µM Miltefosin (IC₉₅) sowie 50 µg/ml G418 in modifiziertem M199 kultiviert. Als Kontrolle wurde *Li* [pcosTL] unter identischen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden einem Mediumwechsel unterzogen, sobald eine Zelldichte von 1 x 10⁷ Z/ml erreicht wurde. Die Selektion wurde beendet, als die Kontroll-Kultur im Vergleich zu den rekombinanten Parasiten kein Wachstum mehr zeigte. Dies war nach ca. 10-12 Tagen der Fall (2.2.1.5). Aus überlebenden Parasiten wurde Cosmid-DNA isoliert (2.2.2.7) und in *E. coli library efficiency* transformiert (2.2.2.2). Aus 50 Bakterienkolonien erfolgte eine Cosmid-DNA-Minipräparation (2.2.2.3).

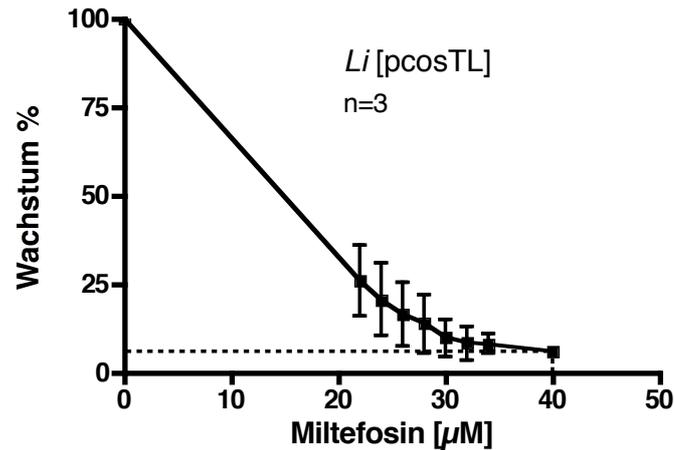
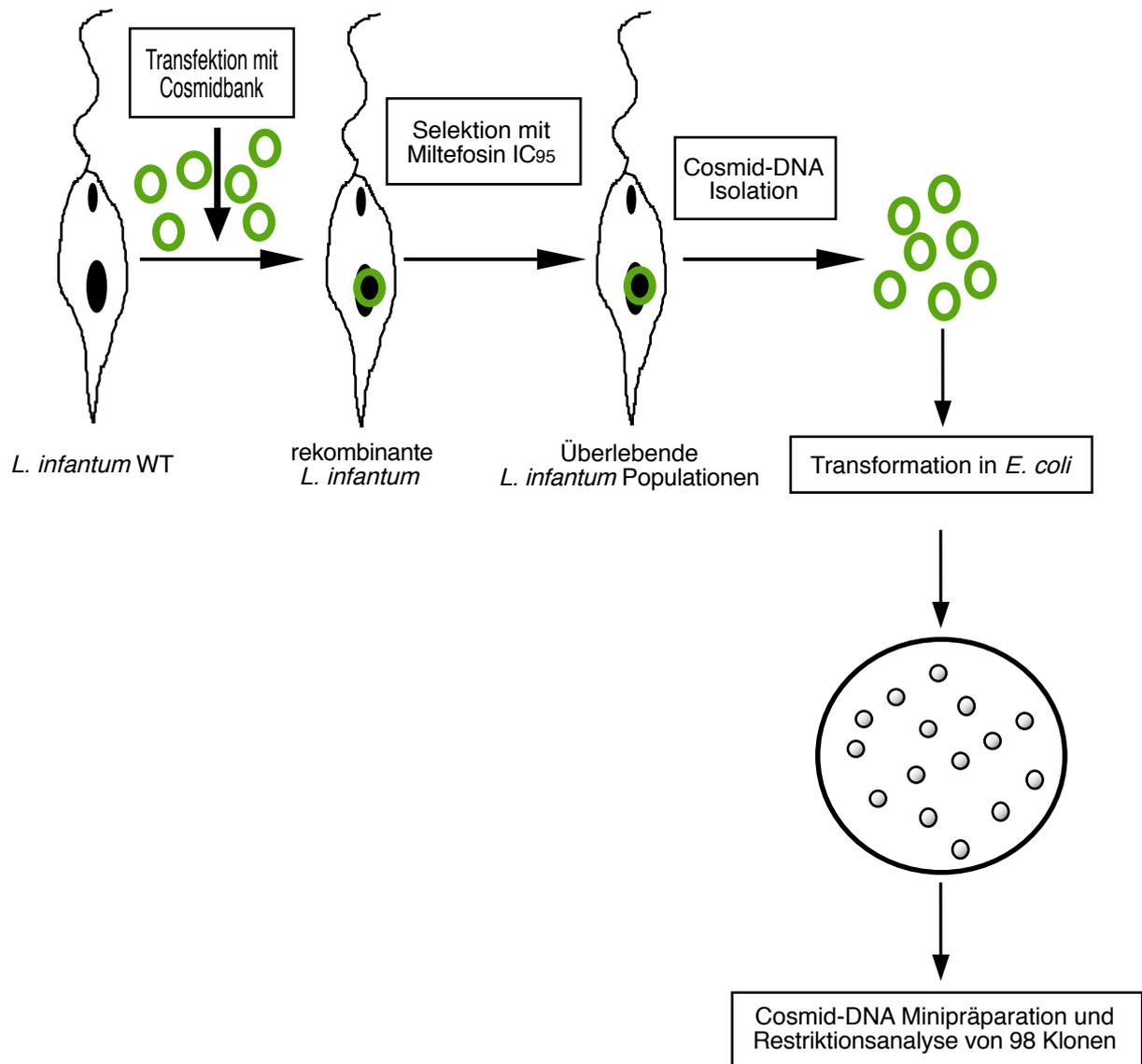


Abbildung 1: Bestimmung der IC₉₅ für Miltefosin von *Li [pcosTL]*

5×10^6 *Li [pcosTL]*-Promastigoten wurden mit G418 und unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellzahlen mittels des *CASY-Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Es wurde die Miltefosin-Konzentration ermittelt, bei der das Wachstum der Zellen um 95% gehemmt wird. Die Abbildung stellt die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an

Die isolierten Cosmide wurden einer Restriktionsanalyse mit *EcoRV* und *XbaI* (2.2.2.11) unterzogen. Anschließend folgte die Auftrennung der resultierenden Fragmente mittels Gelelektrophorese (2.2.2.17). Die Identifizierung und Zuordnung der Cosmidtypen erfolgte anhand des Fragmentmusters. Die primäre Selektion wurde zweimal durchgeführt. Das Ergebnis beider Selektionsexperimente ist zusammengefasst in Abbildung 3 zu sehen. Es wurde nur eine begrenzte Anzahl von Cosmidtypen isoliert, und in beiden Selektionen wurden identische Cosmidtypen identifiziert. Eine Dominanz bestimmter Cosmidtypen ist deutlich zu erkennen. Dies deutet daraufhin, dass der Selektionsdruck stark war, so dass nur Parasiten mit bestimmten Cosmid-Spezies die Selektion überlebten.

Die erhöhte Kopienzahl der Gene, die sich auf den Cosmiden befinden, trägt offensichtlich zur Resistenz der Parasiten gegenüber Miltefosin bei. Die vier am häufigsten vertretenen Cosmidtypen wurden pcosM1, pcosM2, pcosM3 und pcosM4 genannt (M: Miltefosin), und ihr Anteil am Gesamtisolat wurde bestimmt (Tab. 2).

**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Selektion und der Identifizierung der Cosmide**

Li WT-Promastigoten wurden mit der genomischen *L. infantum*- Cosmidbank transfiziert. Rekombinante Promastigoten wurden mit 40 μ M Miltefosin (IC₉₅) kultiviert. Nach 10 Tagen Kultivierung bei 25°C wurde die Selektion beendet. Cosmid-DNA wurde aus überlebenden Promastigoten isoliert, die anschließend zur Transformation von *E. coli* eingesetzt wurde. Von 98 Bakteriekolonien wurde die Cosmid-DNA isoliert und es erfolgte eine Restriktionsanalyse mit *EcoRV* und *XbaI*.

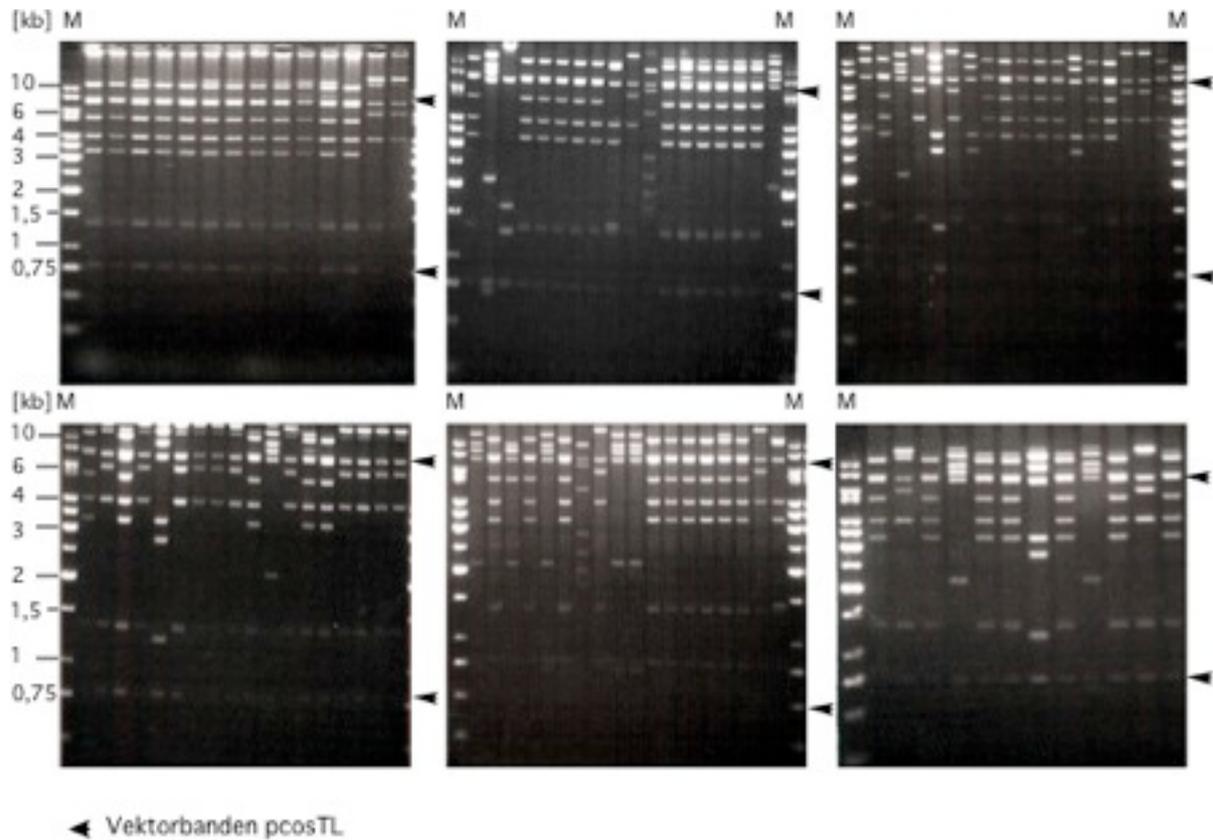


Abbildung 3: Restriktionsanalyse der isolierten Cosmide

Die aus *E. coli* isolierte Cosmid-DNA wurde mit *EcoRV* und *XbaI* behandelt. Die resultierenden Fragmente wurden in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Bahnen, in die der 1-kb DNA-Längenstandard aufgetragen wurde, sind mit M gekennzeichnet. Am linken Bildrand sind die Positionen der DNA-Marker abgebildet. Die Pfeile zeigen auf die vektorspezifischen Banden von pcosTL.

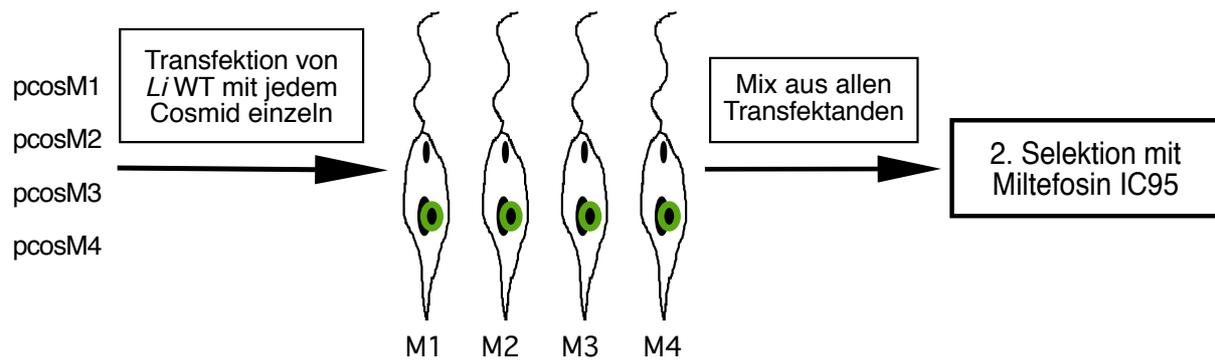
Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der dominanten Cosmide

Dominante Cosmide	Anteil [%]
pcosM1	55
pcosM2	22
pcosM3	9
pcosM4	5

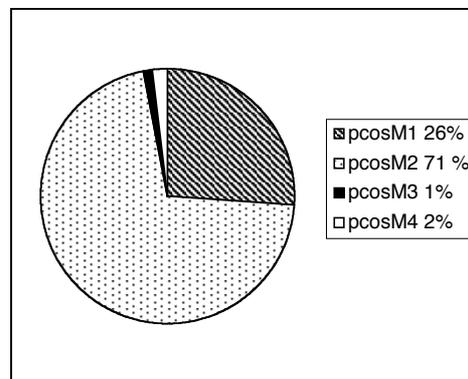
3.1.3 Kompetitive Selektion

Als nächstes wurde untersucht, welches der vier dominant vertretenen Cosmide den Promastigoten die höchste Miltefosin-Resistenz vermittelt. Hierzu wurde jedes Cosmid einzeln in *Li* WT transfiziert, so dass vier rekombinante Zelllinien entstanden (Abb. 4A). Promastigoten jeder Zelllinie wurden zu gleichen Teilen gemischt und einer weiteren Selektion unterzogen. Als Kontrolle diente erneut *Li* [pcosTL]. Nach Beendigung der Selektion erfolgte die Identifizierung der Cosmidtypen wiederum anhand ihres *EcoRV/XbaI*-Fragmentmusters.

A

Rekombinante *L. infantum* Stämme

B

**Abbildung 4: Kompetitive Selektion der dominanten Cosmide**

- (A) Die vier Cosmidtypen, die nach der primären Selektion am häufigsten isoliert wurden, wurden einzeln in *Li* WT transfiziert, so dass vier definierte rekombinante Zelllinien entstanden. Promastigoten von jeder Zelllinie wurden zu gleichen Teilen gemischt und einer zweiten Selektion mit Miltefosin unterworfen. Die Identifizierung der Cosmidtypen aus überlebenden Parasiten erfolgte wie bereits beschrieben.
- (B) Die Abbildung zeigt die Cosmidverteilung nach der kompetitiven Selektion.

Die kompetitive Selektion wurde ebenfalls zweimal durchgeführt und das Ergebnis ist in Abbildung 4 B zusammengefasst dargestellt. Alle vier Cosmidtypen konnten auch nach der zweiten Selektionsrunde reisoliert werden, jedoch zu sehr unterschiedlichen Anteilen. Das Cosmid pcosM2 wurde zu 71% reisoliert und ist damit das am stärksten vertretene Cosmid, gefolgt von pcosM1, dessen Anteil 26% betrug. Dies lässt den Schluss zu, dass die Erhöhung der Kopienzahl der Gene auf diesen beiden Cosmiden den Parasiten einen deutlichen Vorteil bei hohen Miltefosin-Konzentrationen verschafft. Die Cosmide pcosM1 und pcosM2 enthalten demzufolge Kandidatengene, die für die Miltefosin-Resistenz verantwortlich sind.

3.1.4 Erhöhte IC₅₀-Werte für Miltefosin von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2]

Es folgte die Überprüfung und Quantifizierung der Miltefosin-Resistenz von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2]. Dazu wurden logarithmisch wachsende *Li* [pcosTL]-, *Li* [pcosM1]- und *Li* [pcosM2]-Promastigoten mit G418 und unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für drei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellzahlen bestimmt (2.2.1.1). Das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 5 zusammengefasst.

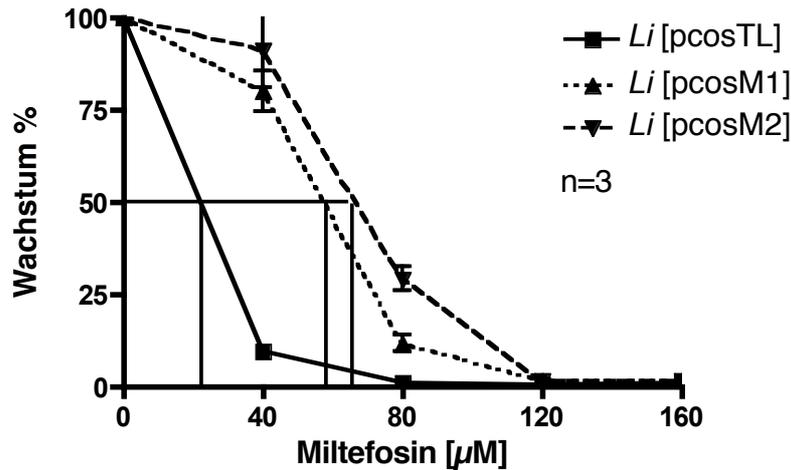


Abbildung 5: Effekt von Miltefosin auf die Vermehrung von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2]

Li [pcosTL]-, *Li* [pcosM1]- und *Li* [pcosM2]-Promastigoten wurden jeweils auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit G418 und unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 h wurden die Zelldichten mit Hilfe des CASY-Cellcounter & Analyzer bestimmt. Die dargestellten Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Wie zu erkennen ist, besitzen *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] einen deutlich erhöhten IC₅₀-Wert für Miltefosin. *Li* [pcosM1] hat einen 3-fach höheren IC₅₀-Wert (60 µM) als die Kontrolle *Li* [pcosTL] (20 µM), und *Li* [pcosM2] weist sogar einen 3,5-fach höheren IC₅₀-Wert (70 µM) auf. Bei einer Miltefosin-Konzentration von 40 µM ist der Unterschied zwischen der Kontrolle und den rekombinanten Zellen am deutlichsten zu erkennen. Das Wachstum der *Li* [pcosTL]-Promastigoten ist bei dieser Konzentration fast vollständig gehemmt, während die *Li* [pcosM1]- und *Li* [pcosM2]-Promastigoten in ihrem Wachstum kaum eingeschränkt sind. Dabei zeigen die *Li* [pcosM2]-Parasiten die stärkste Miltefosin-Resistenz. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis der kompetitiven Selektion, bei der pcosM2 am häufigsten reisoliert wurde und somit den Parasiten den deutlichsten Vorteil vermittelte.

3.1.5 Schutz gegen Miltefosin-induzierte morphologische Veränderungen in Promastigoten

Als nächstes wurde untersucht, ob und welche morphologischen Veränderungen Miltefosin auslöst, und ob das Cosmid pcosM2 dagegen Schutz verleiht. *Li* [pcosTL] und *Li* [pcosM2] wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit $0 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ und $80 \mu\text{M}$ Miltefosin für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie (REM; 2.2.4.2) präpariert. In Abbildung 6 sind REM-Aufnahmen der Promastigoten dargestellt.

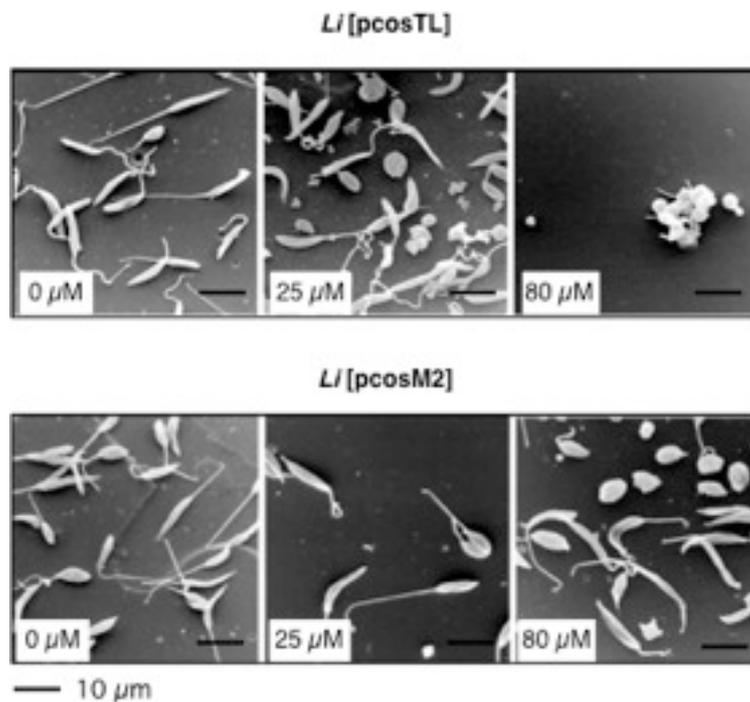


Abbildung 6: REM-Analyse von Miltefosin-behandelten *Li* [pcosTL] und *Li* [pcosM2] Promastigoten

Li [pcosTL]- und *Li* [pcosM2]-Promastigoten wurden unter den angegebenen Miltefosin-Konzentrationen für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Die Aufnahmen entstanden mit 1250-facher Vergrößerung.

Unbehandelte Zellen von *Li* [pcosTL] und *Li* [pcosM2] zeigen die typische Promastigotenform. Die Zellen sind länglich, schlank und begeißelt. Die Behandlung von *Li* [pcosTL] mit $25 \mu\text{M}$ Miltefosin führt zu deutlichen morphologischen Veränderungen. Im Vergleich zu unbehandelten Promastigoten sind die meisten Zellen kleiner und haben eine abgerundete Form. Bei sehr hohen Miltefosin-Konzentrationen ($80 \mu\text{M}$) wurden keine intakten Promastigoten gefunden. Im Gegensatz dazu zeigen *Li* [pcosM2]-Parasiten, die mit $25 \mu\text{M}$ Miltefosin kultiviert wurden, keine Veränderungen ihrer Gestalt. Selbst bei hohen Miltefosin-Konzentrationen ($80 \mu\text{M}$) ist noch ein großer Anteil von äußerlich intakten

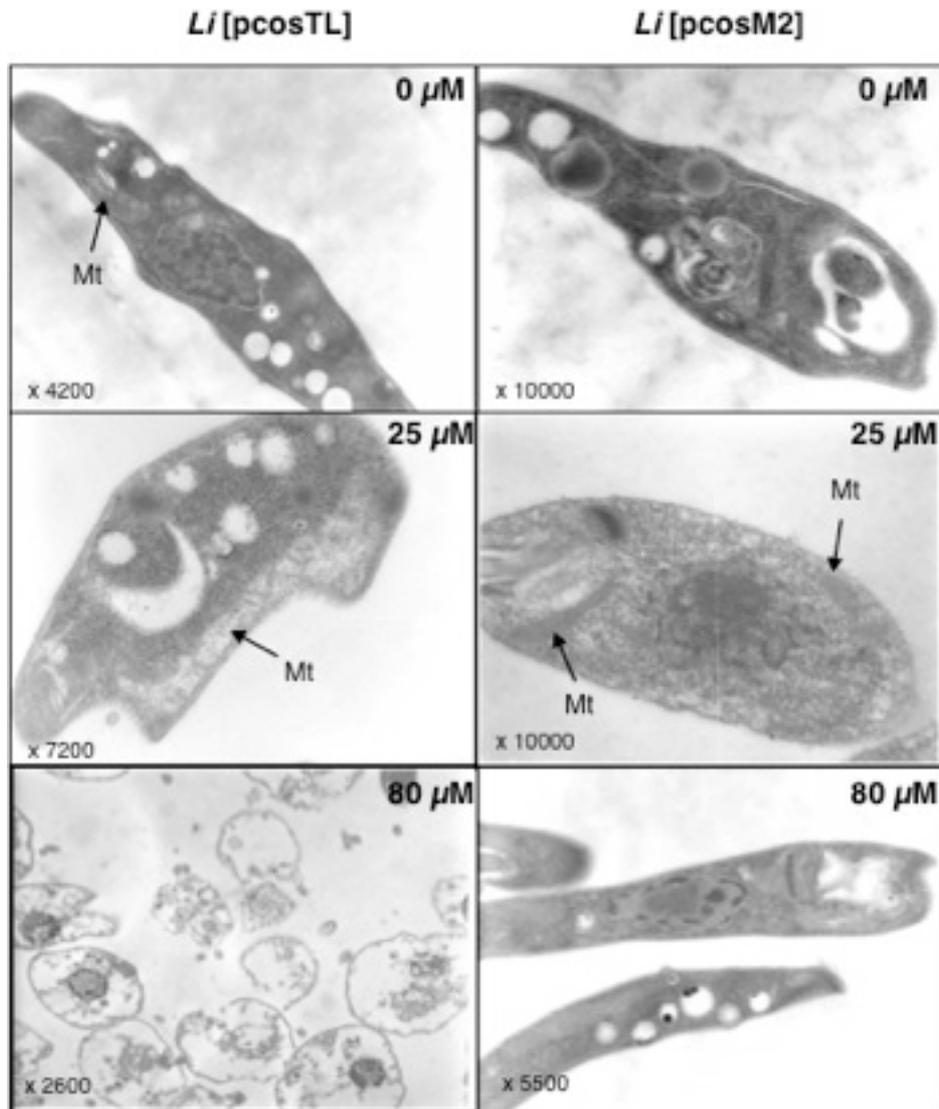


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *Li [pcosTL]* und *Li [pcosM2]*

Li [pcosTL]- und *Li [pcosM2]*-Promastigoten wurden für drei Tage mit den angegebenen Miltefosin-Konzentrationen kultiviert und anschließend für eine Transmissions-Elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert. Links unten sind die Vergrößerungen angegeben, mit denen die Aufnahmen entstanden sind. Die Pfeile deuten auf die Mitochondrien (Mt).

Promastigoten zu beobachten. Parallel zu den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)-Analysen (2.2.4.3) durchgeführt. Repräsentative Ausschnitte der TEM-Aufnahmen werden in Abbildung 7 gezeigt. Schon bei einer geringen Miltefosin-Konzentration ($25 \mu\text{M}$) sind bei *Li [pcosTL]* ultrastrukturelle Schäden zu erkennen. Insbesondere die Mitochondrien scheinen geschädigt zu sein. In *Li [pcosM2]*-Parasiten, die mit $25 \mu\text{M}$ und sogar mit $80 \mu\text{M}$ Miltefosin behandelt wurden, sind dagegen keine offensichtlichen Schäden zu erkennen.

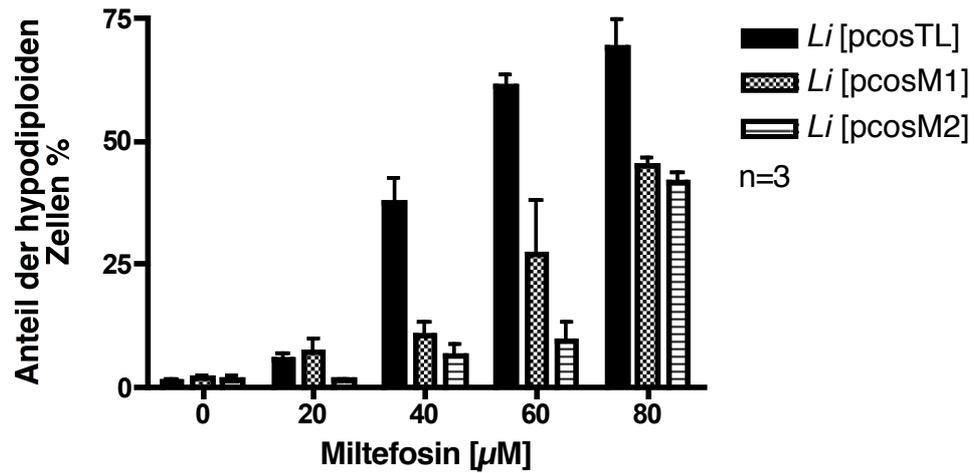
Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Erhöhung der Genkopienzahl auf *pcosM2* die Promastigoten vor Miltefosin-induzierten morphologischen Veränderungen schützt.

3.1.6 Schutz gegen Miltefosin-induzierte DNA-Degradation in Promastigoten

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen hatten gezeigt, dass schon geringe Miltefosin-Konzentrationen zur Zellschrumpfung und zur Schädigung des Mitochondriums in *Li* [pcosTL] führen können. Diese Veränderungen einer Zelle treten unter anderem während des programmierten Zelltods (*programmed cell death*: PCD) in multizellulären Organismen auf (Vaux D.L., 1996). Die DNA-Degradation in der Zelle ist ein weiteres Kennzeichen von PCD. Es wurde berichtet, dass Miltefosin einen PCD-ähnlichen Zelltod in *Leishmania*-Promastigoten und -Amastigoten induziert (Paris C., 2004; Verma N.K., 2004; Verma N.K., 2007). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Cosmide pcosM1 und pcosM2 die Promastigoten vor einem Miltefosin-induzierten Abbau der DNA schützen können. Dazu wurde eine Bestimmung des DNA-Gehaltes in Miltefosin-behandelten *Li* [pcosTL]-, *Li* [pcosM1]- und *Li* [pcosM2]-Promastigoten durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid markiert. Im Zuge von PCD-assoziiertes DNA-Degradation sinkt der DNA-Gehalt unter den Wert diploider Zellen, somit werden die Zellen hypodiploid. Daher ist die Zahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt $<2n$ ein Maß für PCD. Die Analyse und die Quantifizierung des Anteils an hypodiploiden Zellen erfolgten mittels Durchflusszytometrie (2.2.1.6). Abbildung 8 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

Wie zu erkennen ist, steigt bei *Li* [pcosTL] der Anteil an hypodiploiden Zellen mit höheren Miltefosin-Konzentrationen drastisch an. Schon bei einer Miltefosin-Konzentration von $40 \mu\text{M}$ sind ca. 40% der *Li* [pcosTL]-Zellen hypodiploid. Im Unterschied dazu beträgt der Anteil von hypodiploiden Zellen bei der gleichen Miltefosin-Konzentration bei *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] nur 10-15%. Diese Tendenz bleibt über den gesamten Konzentrationsbereich bestehen. Dieses Experiment zeigt, dass *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] vor einer Miltefosin-induzierten DNA-Degradation geschützt sind. Die Erhöhung der Kopienzahl der Gene auf pcosM2 ruft auch hier die ausgeprägteste Resistenz hervor.

Die erhöhten IC_{50} -Werte von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] für Miltefosin, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die DNA-Degradations-Analyse bestätigen, dass die selektierten Cosmide pcosM1 und pcosM2 Resistenz vermitteln. Die ausgeprägteste Resistenz wird von pcosM2 hervorgerufen. Die Selektion auf Miltefosin-Resistenz vermittelnde Cosmide war somit erfolgreich.

**Abbildung 8: DNA-Degradations-Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Promastigote Stadien von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 Z/ml eingestellt und mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen kultiviert. Nach 72 h wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und anschließend in einem Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt die Anteile der hypodiploiden Zellen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

3.2 Identifizierung des Miltefosin-Resistenz vermittelnden Gens

3.2.1 Überlappende Sequenzen von pcosM1 und pcosM2

Als nächstes stellte sich die Frage, welches bzw. welche Gene auf pcosM1 und pcosM2 den rekombinanten *L. infantum* einen Selektionsvorteil bei hohen Miltefosin-Konzentrationen verschaffen. Bei der Identifizierung der Cosmide fiel auf, dass sich die Fragmentmuster von pcosM1 und pcosM2 ähneln. Abbildung 9 zeigt die *EcoRV/XbaI*-Bandenmuster der selektierten Cosmide und der Kontrolle pcosTL. Neben den Vektorbanden sind bei pcosM1 und pcosM2 zwei weitere Banden (bei ca. 1,35 kb und bei 3,7 kb) vorhanden, die sich in ihrer Größe ähneln (Bahn 1 und 2). Diese Banden tauchen nicht in den Fragmentmustern von pcosM3 und pcosM4 auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass pcosM1 und pcosM2 überlappende Sequenzen besitzen, und dass diese gemeinsamen Bereiche den rekombinanten Promastigoten eine erhöhte Miltefosin-Resistenz vermitteln.

Eine *Southern Blot*-Analyse (2.2.2.20) sollte klären, ob die selektierten Cosmide tatsächlich überlappende Sequenzen besitzen. Hierzu wurde die Cosmid-DNA von pcosM1, pcosM2, pcosM3, pcosM4 und pcosTL mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *XbaI* behandelt. Um eine hohe Auflösung der aufzutrennenden Fragmente zu erreichen, wurde die Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE; 2.2.2.18) angewandt.

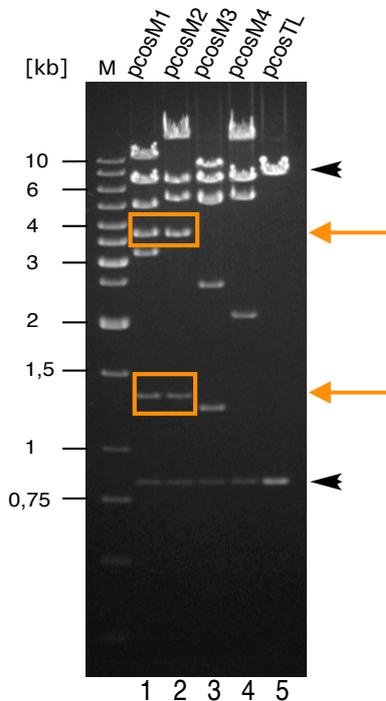


Abbildung 9: Restriktionsmuster der dominanten Cosmide
Die dominanten Cosmide (pcosM1-pcosM4) und der Vektor pcosTL wurden einem Restriktionsverdau mit *EcoRV* und *XbaI* unterzogen. Die resultierenden Fragmente wurden in einem 1% igem Agarosegel, mittels Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die dunklen Pfeile markieren die vektorspezifischen Banden; die helleren Pfeile deuten auf Banden von pcosM1 und pcosM2 mit ähnlichen Größen hin. Bahn M wurde mit dem 1-kb DNA-Längenstandard beladen, dessen Größen links angezeigt werden.

Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Die Herstellung der Digoxigenin-markierten (DIG) DNA-Sonden erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.21 beschrieben. Die Hybridisierung wurde mit einer DIG-markierten pcosM2- und pcosTL-Sonde durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Die DIG-pcosM2-Sonde hybridisiert fast vollständig mit pcosM1 (Bahn 1), erkennt von pcosM3 und pcosM4 jedoch nur die Vektorbanden, wie die Hybridisierung mit der DIG-pcosTL-Sonde bestätigt (Bahn 3 und 4). Die markierten Banden sind demnach identisch, und nur pcosM1 und pcosM2 besitzen überlappende Sequenzen. Ein Vergleich der überlappenden Bereiche würde eine Eingrenzung der in Frage kommenden Gene auf den Cosmiden erleichtern.

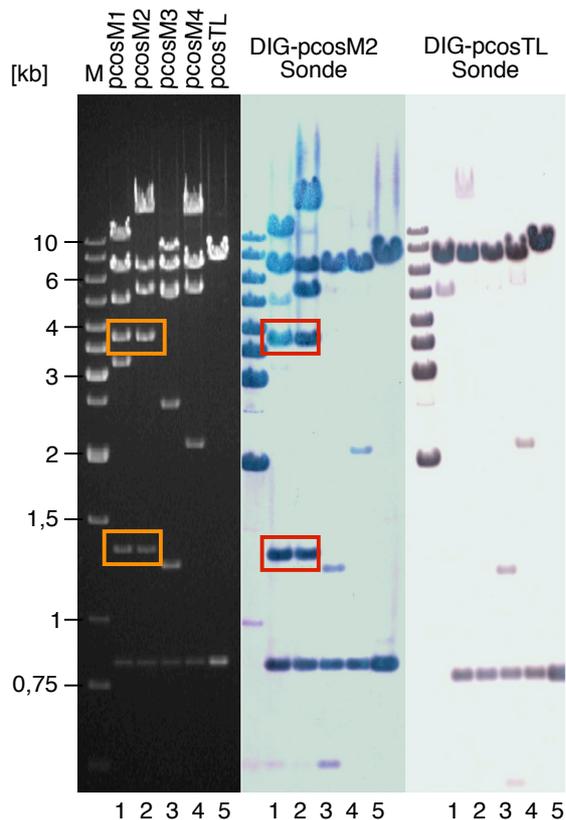


Abbildung 10: Southern Blot-Analysen der dominanten Cosmide

Die Cosmide pcosM1-pcosM4 und der Vektor pcosTL wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *XbaI* behandelt. Die resultierenden Fragmente wurden in einem 1%igem Agarosegel in einer Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE) aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die DNA-Fragmente wurden auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde anschließend mit einer Digoxygenin-markierten pcosM2-Sonde bzw. pcosTL-Sonde über Nacht hybridisiert. Der Nachweis erfolgte mit einem anti-Digoxygenin Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Als Längenstandard diente der 1-kb DNA-Marker (Bahn M). Die Positionen des Markers sind am linken Bildrand zu sehen.

3.2.2 Sequenzanalyse von pcosM1 und pcosM2

Eine Sequenzanalyse der Cosmide sollte Aufschluss über die sich darauf befindenden Gene und über die Ausdehnung der Überlappung geben. Die vollständige Sequenzierung von pcosM2 wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Richard Reinhardt am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt. Durch mechanische Scherung wurde das Cosmid pcosM2 in kleinere Fragmente zerlegt. Die Fragmente wurden in einen Plasmidvektor kloniert. Diese Plasmid-Bank wurde sequenziert und das Contig wurde *in silico* zusammengesetzt. Die dem Cosmidinsert entsprechende Chromosomen-Region wurde durch einen Vergleich mit den Sequenzen in der *Leishmania Gene Database* (www.genedb.org/leish) identifiziert.

Die Größe des *insert* von pcosM2 beträgt 31397 bp. Die DNA-Sequenz des *insert* wurde mit Hilfe der *software*-Pakete *MacMolly* und *MacVector* auf das Vorhandensein von putativen offenen Leserahmen untersucht. Dabei wurden nur Sequenzabschnitte untersucht, die eine Mindestlänge von 350 bp und einen G/C Gehalt von $\geq 60\%$ aufwiesen, da kodierende Sequenzen in *Leishmania* einen durchschnittlichen G/C Anteil von bis zu 62% besitzen (Peacock CS, 2007). Diese Sequenzen wurden wiederum mit den putativen Protein-kodierenden Sequenzen in der *Leishmania Gene Database* verglichen. Auf diese Weise konnten vier offene Leserahmen auf pcosM2 lokalisiert werden. Der Anteil der putativen Protein-kodierenden Sequenzen beträgt insgesamt 54% (16956 bp).

Von pcosM1 wurden die Enden des *insert* mit den Oligonukleotiden CH-2 und M13rev. (2.1.8) sequenziert. Die erzielten Sequenzen wurden mit den Sequenzen in der *Leishmania Gene Database* verglichen. Hierdurch konnte der in pcosM1 integrierte Chromosomen-Abschnitt eingegrenzt werden. Die Größe des *insert* von pcosM1 beträgt demnach 33449 bp und der Anteil an offenen Leserahmen macht 47% (15734 bp) aus. Insgesamt wurden auf pcosM1 fünf putative offene Leserahmen gefunden.

Es wurde eine Analyse der DNA-Sequenzen der offenen Leserahmen und der Proteinsequenzen in der *Leishmania Gene Database* und der *NCBI Protein/Protein Datenbank* durchgeführt. In Tabelle 3 ist eine Übersicht der identifizierten offenen Leserahmen dargestellt.

Alle auf pcosM1 und pcosM2 vorhandenen Gene kodieren für Proteine mit bislang unbekannter Funktion. Aus Tabelle 3 wird außerdem deutlich, dass pcosM1 und pcosM2 zwei identische offene Leserahmen besitzen, die jeweils für ein ca. 300 kDa (P300) und für ein ca. 235 kDa Protein (P235) kodieren. Durch einen Sequenzvergleich von pcosM1 und pcosM2 konnte die Ausdehnung der Überlappung exakt ermittelt werden. Aus Abbildung 11 geht hervor, dass die Cosmide in nur einem offenen Leserahmen (P300) vollständig überlappen. Dies lässt vermuten, dass die Erhöhung der Kopienzahl von P300, das auf beiden Cosmiden vorhanden ist, für die Miltefosin-Resistenz der rekombinanten Parasiten verantwortlich ist.

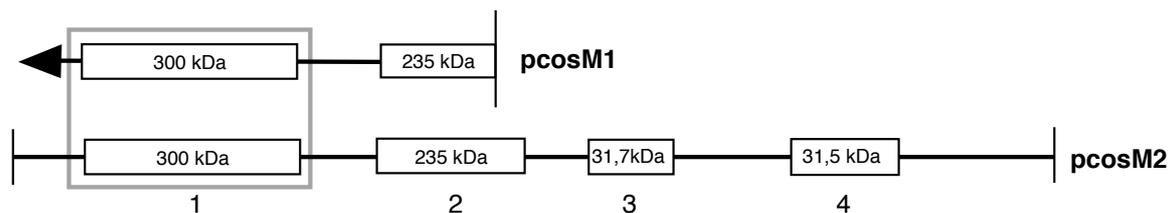
Tabelle 3: Sequenzanalyse von *pcosM1* und *pcosM2*Cosmid *pcosM1*

ORF Nr.	Größe in [bp]	Theor. MW in [kDa]	E-Wert	Chromosom	
1	501	19	5,2 ⁻⁹⁴	8	hypothetisches Protein
2	1551	54,2	4,3 ⁻²⁴⁵	8	hypothetisches Protein
3	432	15,9	4,0 ⁻⁸⁰	8	hypothetisches Protein
4	8511	299 (~ 300)	0	8, 29	hypothetisches Protein
5	4964	234,5 (~235)	0	8, 29	hypothetisches Protein

Cosmid *pcosM2*

ORF Nr.	Größe in [bp]	Theor. MW in [kDa]	E-Wert	Chromosom	
1	8511	299 (~ 300)	0	8, 29	hypothetisches Protein
2	6651	234,5 (~ 235)	0	8, 29	hypothetisches Protein
3	903	31,7	8,0 ⁻²⁰⁰	8, 29	hypothetisches Protein
4	891	31,5	4,2 ⁻¹⁹⁷	8, 29	hypothetisches Protein

Zur Identifizierung von putativen offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) wurde die DNA Sequenz beider Cosmide mit Hilfe der *MacMolly* und *MacVector software* untersucht. Anschließend wurden die Proteinsequenzen mit Sequenzen aus der *NCBI Protein/Protein* Datenbank und der *Leishmania Gene Database* (BLAST-P) verglichen. Angegeben ist die Größe der offenen Leserahmen, das theoretische Molekulargewicht der Polypeptide, der E-Wert (*expectation value*: Wahrscheinlichkeit, dass eine Sequenz vorhanden ist, die eine ähnliche oder bessere Übereinstimmung mit der zu untersuchenden Sequenz aufweist), und die chromosomale Lokalisation der ORF's

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Sequenzüberlappung von *pcosM1* und *pcosM2*

Anhand eines Sequenzvergleiches von *pcosM1* und *pcosM2* konnte die Überlappung der Cosmidinserts bestimmt werden. Die vollständige Insertsequenz von *pcosM2* ist dargestellt; von *pcosM1* sind die überlappenden Bereiche abgebildet. Die Kästchen symbolisieren die offenen Leserahmen. Die Molekulargewichte der putativen Genprodukte sind in [kDa] angegeben.

3.2.3 Klonierung des P300-Gens mit flankierenden Sequenzen

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob durch eine Erhöhung der Kopienzahl des P300-Gens Miltefosin-Resistenz in *L. infantum* vermittelt werden kann. Zu diesem Zweck musste *P300* in *Li* WT überexprimiert werden. Hierzu sollte *P300* in einen Plasmidvektor eingefügt werden, der nach Linearisierung über homologe Rekombination eine Integration des Gens in das *Leishmania*-Genom ermöglicht. Positive *Leishmania*-Klone sollten anschließend auf ihre Miltefosin-Resistenz hin untersucht werden.

Aufgrund der beträchtlichen Größe des *P300*-ORFs (8500 bp) und des ebenfalls 8500 bp großen *Leishmania*-spezifischen Vektors pIRmcs3+ (2.1.9), ist die Klonierung auch nach mehreren Versuchen nicht gelungen. Ein weiteres Hindernis für eine erfolgreiche Klonierung stellten die zahlreichen Restriktionsschnittstellen dar, die im *P300*-ORF enthalten sind. Aus diesem Grund sollte das Ziel durch eine Deletion der restlichen offenen Leserahmen im Cosmid pcosM2 erreicht werden, durch die lediglich der *P300*-ORF mit seinen flankierenden Sequenzen erhalten blieb. Nach Transfektion in *Li* WT sollte dieses Konstrukt als Episom in den Zellen vorliegen, und zur Erhöhung der Kopienzahl des P300-Gens führen.

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, sind zwei *Sna*BI-Restriktionsschnittstellen in der *insert*-Sequenz von pcosM2 vorhanden, die eine Deletion der offenen Leserahmen 2-4 ermöglichen. Die pcosM2-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sna*BI behandelt. Die zwei resultierenden DNA-Fragmente waren von nahezu gleicher Größe und ließen sich nicht über ein Agarosegel auftrennen. Deshalb wurden die Fragmente zusammen über ein Agarosegel aufgereinigt (2.2.2.16) und in die Ligation (2.2.2.13) eingesetzt. Durch die Ligation des *P300*-tragenden Fragmentes mit sich selbst sollte das gewünschte Konstrukt (pcos*P300*) entstehen (Abb. 12). Es folgte die Transformation in *E. coli library efficiency*, die zur Ausbeute von sieben Transformanden führte. Für die Identifizierung von positiven Klonen wurde mittels DNA-Minipräparation Cosmid-DNA isoliert, die anschließend für Restriktionsanalysen mit *Ap*al, *Eco*RI und *Hind*III eingesetzt wurde. Insgesamt konnten zwei positive Klone identifiziert werden. Eine nachfolgende Sequenzanalyse der positiven Klone bestätigte das Ergebnis der Restriktionsanalysen. Das Cosmid pcos*P300* besitzt eine *insert*-Größe von 11212 bp und trägt nur das P300-Gen mit einem 3'-untranslatiertem Bereich von 783 bp. Die Klonierung des P300-Gens war somit erfolgreich.

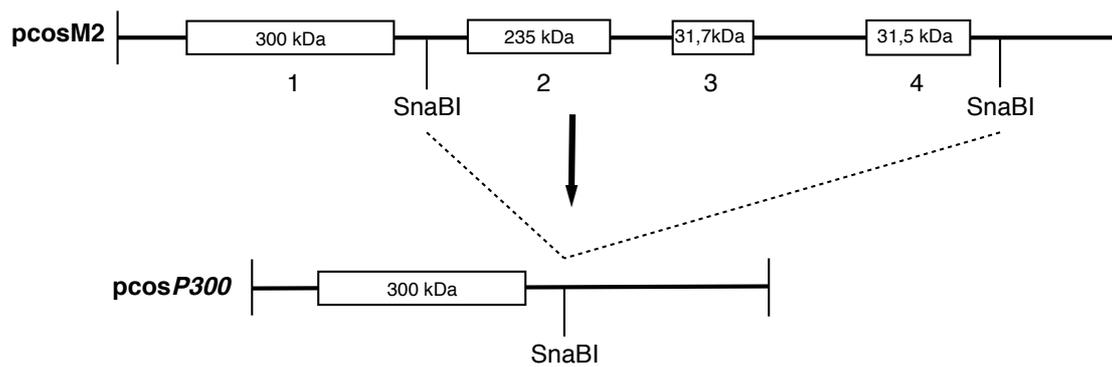


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des P300-Gens

Dargestellt sind die *inserts* der Cosmide *pcosM2* und *pcosP300*. Die *SnaBI*-Restriktionsschnittstellen in *pcosM2* sind gekennzeichnet. Durch den Verdau von *pcosM2* mit *SnaBI* wurden ORF 2, 3 und 4 deletiert. Es fand eine Religation des ORF 1-tragenden Fragmentes mit sich selbst statt. Da ORF 1 für ein ca. 300 kDa Protein kodiert, wurde dieses Cosmid *pcosP300* genannt. Die Kästchen symbolisieren die putativen offenen Leserahmen und die Molekulargewichte der Genprodukte sind in [kDa] angegeben.

3.2.4 Erhöhte Kopienzahl des P300-Gens vermittelt Miltefosin-Resistenz in *L. infantum*-Promastigoten

Als nächstes wurde die Frage geklärt, ob durch eine Erhöhung der Kopienzahl von *P300* Miltefosin-Resistenz in *L. infantum* hervorgerufen werden kann. Nach erfolgreicher Transfektion von *Li* WT mit *pcosP300* wurde der Effekt von Miltefosin auf die Vermehrung der Parasiten untersucht. Dazu wurden promastigote Stadien von *Li* [*pcosTL*], *Li* [*pcosM1*], *Li* [*pcosM2*] und *Li* [*pcosP300*] mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für drei Tage kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellzahlen ermittelt. Das Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 13 dargestellt. Wie die Resultate aus vorangegangenen Experimenten erwarten ließen, konnten sich die *Li* [*pcosM1*]- und *Li* [*pcosM2*]-Promastigoten im Vergleich zur Kontrolle *Li* [*pcosTL*], bei hohen Miltefosin-Konzentrationen vermehren. Sie besitzen einen fast 3-fach ($60\text{--}65\ \mu\text{M}$) höheren IC_{50} -Wert für Miltefosin als die Kontrolle ($22\ \mu\text{M}$). Die *Li* [*pcosP300*]-Parasiten zeigten ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten wie *Li* [*pcosM1*] und *Li* [*pcosM2*], und konnten sich in Gegenwart von hohen Miltefosin-Konzentrationen deutlich vermehren. Mit einem 2,5-fach höheren IC_{50} -Wert ($55\ \mu\text{M}$) für Miltefosin liegt ihr Wert nur knapp unter den IC_{50} -Werten von *Li* [*pcosM1*] und *Li* [*pcosM2*]. Da das Cosmid *pcosP300* nur das P300-Gen trägt, bestätigt dieses Ergebnis die Annahme, dass durch die Erhöhung der Kopienzahl des P300-Gens Miltefosin-Resistenz in rekombinanten *L. infantum* Promastigoten hervorgerufen wird. Dieses Gen ist auf allen drei Cosmiden vorhanden, die den Parasiten einen Schutz bei hohen Miltefosin-Konzentrationen verleihen (Abb. 14).

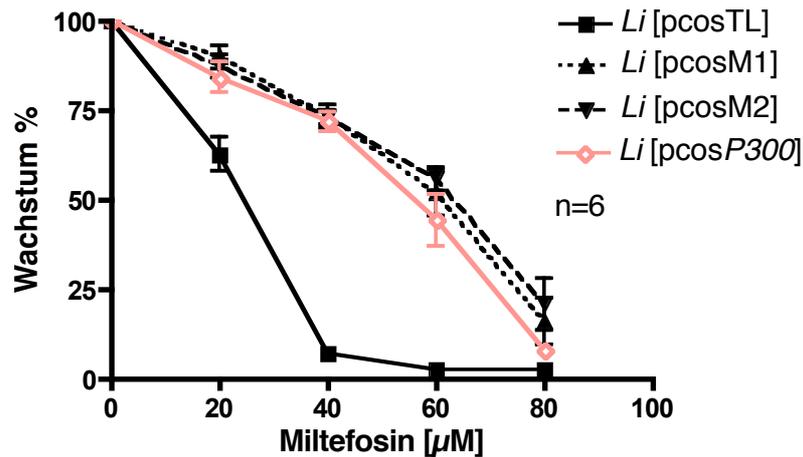


Abbildung 13: Erhöhter IC_{50} -Wert von *Li* [pcosP300] für Miltefosin

Promastigote Leishmanien wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und für 72 h mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen kultiviert. Die Zellzahlen wurden mittels des CASY-Cellcounter & Analyzer bestimmt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

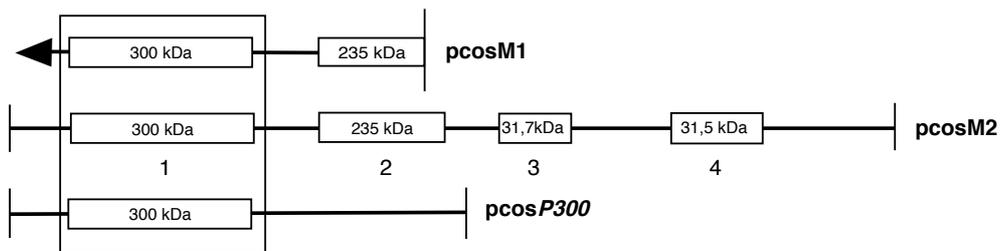


Abbildung 14: Schematische Darstellung der P300-tragenden Cosmide

Abgebildet sind die Insertsequenzen der Cosmide pcosM2 und pcosP300. Von Cosmid pcosM1 ist nur der überlappende Bereich dargestellt. Die Kästchen symbolisieren die putativen offenen Leserahmen und die Molekulargewichte der Genprodukte sind in [kDa] angegeben. Das P300-Gen ist auf jedem Cosmid vorhanden.

Um zu überprüfen, ob dieser Schutz möglicherweise auf ein verbessertes *in vitro*-Wachstum der rekombinanten Promastigoten basiert, wurden die Wachstumsraten ermittelt. Hierfür wurden logarithmisch wachsende *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300]-Promastigoten ohne Miltefosin für 72 Stunden kultiviert. Dabei wurde alle 24 Stunden die Zelldichte bestimmt. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis von sechs unabhängigen Versuchen. Wie man erkennen kann, unterscheidet sich die Kontrolle *Li* [pcosTL] nur gering in ihrer Wachstumsrate von den rekombinanten Promastigoten. Der Unterschied ist hier zu vernachlässigen. Die Erhöhung der P300-Kopienzahl führt bei Promastigoten nicht zu einer Steigerung der Teilungsrate unter axenischen Kultivierungsbedingungen. Aus diesem und dem vorangegangenen Experiment lässt sich der Schluss ziehen, dass die von P300 vermittelte Miltefosin-Resistenz nicht auf ein verbessertes *in vitro*-Wachstum der rekombinanten Parasiten zurückzuführen ist. Dies wird weiterhin durch die Ergebnisse der

DNA-Degradations-Analyse (3.1.6) bestätigt, die deutlich zeigten, dass die Zellen der Kontrolle *Li* [pcosTL] am Absterben sind (hoher Anteil von hypodiploiden Zellen), während die rekombinanten Parasiten vor einer Miltefosin-induzierten DNA-Degradation geschützt sind.

P300 konnte als das Miltefosin-Resistenz-vermittelnden Gen identifiziert werden. Über die Funktion und die Eigenschaften des *P300*-Genprodukts lieferten die ersten Datenbank-Recherchen nur unzureichende Informationen. In den folgenden Untersuchungen sollte das *P300*-Genprodukt näher charakterisiert werden.

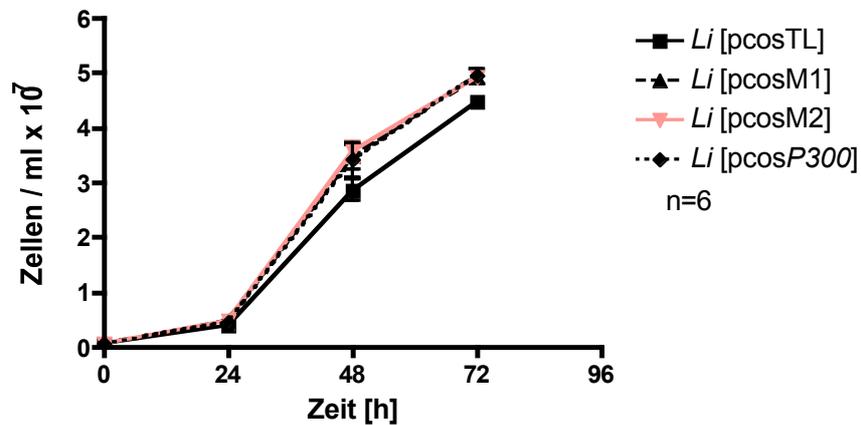


Abbildung 15: Wachstumsanalyse von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300]

Promastigote Leishmanien wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und für drei Tage ohne Miltefosin kultiviert. Alle 24 h erfolgte die Bestimmung der Zelldichten mittels des CASY-Cellcounter & Analyzer. Die Abbildung stellt die Durchschnittswerte von sechs unabhängigen Experimenten dar.

3.3 Charakteristika des P300-Genprodukts

Die ersten Sequenzanalysen des *P300*-Genprodukts lieferten nur allgemeine Daten zum Molekulargewicht und zum isoelektrischen Punkt. Um Anhaltspunkte über die biologische Funktion von P300 zu erhalten, wurden die Datenbank-Recherchen ausgedehnt. Zunächst wurde eine Homologiesuche durchgeführt (BLAST-P: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>; <http://www.ebi.ac.uk/Tools>; <http://www.genedb.org>), die jedoch zu keiner signifikanten Übereinstimmung mit einem bereits bekannten Protein führte. Die einzig signifikante Sequenzähnlichkeit (Score-Wert: 320; E-Wert: $2,2^{-73}$) besteht zu P235, welches vom zweiten offenen Leserahmen auf *pcosM2* kodiert wird (Abb. 11, Tab. 3). P235 ist ein weiteres hypothetisches Protein in *Leishmania*, mit einer molekularen Masse von 234500 und unbekannter Funktion. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von P300 und P235 mit Hilfe der *software MacVector*, ergab eine Gesamt-Aminosäuresequenzähnlichkeit von 31%, die sich zusammensetzt aus einer Sequenzidentität von 19% und einer Sequenzähnlichkeit von 12%. Dabei weisen die N-Termini beider Proteine eine Aminosäuresequenzidentität von bis zu 54% auf.

In *L. major*, *L. infantum* und *L. braziliensis* sind Homologe, mit nahezu identischen molekularen Massen zu P300 und auch zu P235 vorhanden. Die Sequenzübereinstimmung von P300 in *L. infantum* und seinem Homolog in *L. major* und in *L. braziliensis* beträgt 99% bzw. 74%. Die Suche nach P300-Homologen in anderen Organismen ergab, dass nur in *Trypanosoma* ein Protein mit signifikanter Übereinstimmung vorhanden ist. Dieses Protein besitzt eine molekulare Masse von ca. 90.000 und seine Funktion ist ebenfalls nicht bekannt.

Die bisherigen Ergebnisse der Recherchen lieferten noch immer keine Hinweise auf die Funktionen beider Proteine. Deshalb wurden die Aminosäuresequenzen von P300 und P235 nach möglichen GPI-Ankern, Transmembrandomänen, Signalsequenzen und Hinweisen zur intrazellulären Lokalisation durchsucht. Dies erfolgte unter Verwendung folgender Programme: DGPI (<http://dgpi1.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>), Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) Motif Scan in a Protein Sequence (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) und PROSITE Database of protein domains, families and functional sites (<http://expasy.org/prosite>). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefasst. Beide Proteine besitzen demzufolge weder Transmembrandomänen noch Signalsequenzen noch GPI-Anker. Dies lässt den vorläufigen

Schluss zu, dass es sich um zytosolische Proteine handelt. Auffallend ist der C-Terminus von P300, der mehrfache *repeats* der Aminosäuren Histidin, Glutamin und Prolin enthält.

Tabelle 4: Charakteristika des 300 kDa und des 235 kDa Proteins in *L. infantum*

Eigenschaften	P300	P235
Molekulare Masse	299000	234500
Isoelektrischer Punkt	pH 7,42	pH 7,2
Alanin-reiche Region	2	1
Glutamin-reiche Region	2	0
Histidin-reiche Region	1	0
Prolin-reiche Region	1	0
Serin-reiche Region	1	0
Signalsequenzen	keine	keine
Transmembrandomänen	keine	keine
GPI-Anker	keine	keine
Homologien zu bekannten Proteinen	keine	keine
Biologische Funktion	unbekannt	unbekannt

Aufgelistet sind verschiedene Charakteristika von P300 und P235. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine wurden mit Hilfe von mehreren spezialisierten Computer-Programmen auf bekannte strukturelle Protein-Motive und funktionelle Domänen untersucht.

Die Untersuchung der genomischen Organisation ergab, dass in *Leishmania* und zum Teil auch in *Trypanosoma* die entsprechenden Gene auf Chromosom 8 lokalisiert sind (BLAST-N: <http://www.genedb.org>). Nur in *L. infantum* ist eine weitere Kopie beider Gene auf Chromosom 29 gelegen (Tab. 3). Die Sequenzanalyse der Cosmidinserts von pcosM1 und pcosM2 zeigte bereits, dass es sich um benachbarte Gene handelt (Abb. 11). Dies ist der Fall in *L. major* und *L. infantum*, jedoch nicht in *L. braziliensis*. Dabei muss berücksichtigt werden, dass das *L. braziliensis* Genomprojekt noch nicht abgeschlossen, und die Datenbank deshalb unvollständig ist. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine spätere Recherche zu einem anderen Ergebnis, bezüglich der Anordnung der Gene, führen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass P300 nur zu P235 Sequenzähnlichkeit aufweist. Beide Proteine und ihre Homologe existieren nur in *Leishmania* und *Trypanosoma*, und sind vermutlich im Zytosol lokalisiert. Die spärlichen Informationen der Datenbank-Recherchen und *in silico*-Analysen lassen jedoch bezüglich der biologischen Funktion der Proteine keine Vorhersagen zu.

3.4 Rekombinante Expression von P300 in *E. coli*

Ziel der Selektion war es, das Miltefosin-Resistenz-vermittelnde Gen zu identifizieren. Für die Charakterisierung des Genprodukts sollte das identifizierte Gen in *E. coli* überexprimiert werden. Um spezifische Antikörper zu gewinnen, sollte bakteriell exprimiertes Antigen zur Immunisierung verwendet werden. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sollte unter anderem die subzelluläre Lokalisation des Proteins in *Leishmania* bestimmt werden. Da Amastigoten das pathogene Stadium darstellen, sollte weiterhin untersucht werden, ob P300 in Amastigoten synthetisiert wird. Dies sollte in Immuno-Blot-Analysen mit P300-spezifischen Antikörpern erfolgen. Für die Überexpression von *P300* in *E. coli* wurde der bakterielle Expressionsvektor pJC45 (Schlüter A., 2000); 2.1.9) verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Koexpression von zehn Histidinen (Histidin-tag) am N-Terminus des rekombinant exprimierten Proteins. Dies erlaubt eine Aufreinigung des Proteins durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.

3.4.1 Klonierung von *P300* in pJC45

Zunächst erfolgte die Klonierung des *P300*-Gens in den pJC45-Vektor. Hierfür wurde der *P300*-ORF aus dem Cosmid pcosM2 mit spezifischen Oligonukleotiden (2.1.8) mittels PCR (2.2.2.14) amplifiziert. Dabei wurde am 5'- und 3'-Ende des entstandenen PCR-Produktes eine *NdeI* bzw. *EcoRI* Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt und anschließend in den mit *NdeI* und *EcoRI* linearisierten pJC45-Vektor ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 α *subcloning efficiency* erfolgte die Plasmid-DNA Isolation aus den Transformanten. Mittels Restriktionsanalyse konnten neun positive Klone identifiziert werden. Von zwei Klonen wurden zusätzlich die Plasmidinserts mit den Oligonukleotiden pJC45 *forward* und Φ T2 (2.1.8) von den Enden her ansequenziert. Die Ergebnisse der partiellen Sequenzanalyse zeigten, dass der *P300*-ORF korrekt in den Vektor ligiert wurde, und dass dabei das Start-Codon unverändert blieb. Für die Antigen-Gewinnung wurde als nächstes die Überexpression von *P300* in *E. coli* durchgeführt.

3.4.2 Überexpression eines 65 kDa Proteins in *E. coli*

Das aus der Klonierung hervorgegangene Plasmid pJC45-*P300* wurde in *E. coli* BL21(DE3) [pAP/*lacI*^q] (2.1.10) transformiert. Anschließend wurde die Expression von *P300* durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (2.2.3.2) induziert. Nach 1,5 Stunden unter IPTG-Induktion wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Lysate wurden in einem 6%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.7) und durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (2.2.3.8) sichtbar gemacht. Das Ergebnis der Expression ist in Abbildung 16 zu

sehen. Es wurden Proteinproben vor und nach IPTG-Zugabe aufgetragen. Man erkennt deutlich, dass nach Induktion eine prominente Bande in der Größe von ca. 65 kDa in der Proteinprobe auftaucht (Bahn 2). In der Höhe des erwarteten rekombinanten Proteins (300 kDa) ist nach Induktion keine Bande zu sehen. Die Wiederholung der Expression mit weiteren Klonen von pJC45-*P300* führte stets zur Synthetisierung eines 65 kDa Proteins. Dies lässt vermuten, dass während der Amplifizierung des *P300*-ORF's ein Stop-Codon in die Sequenz eingebaut wurde, und deshalb das vollständige Protein nicht exprimiert wird.

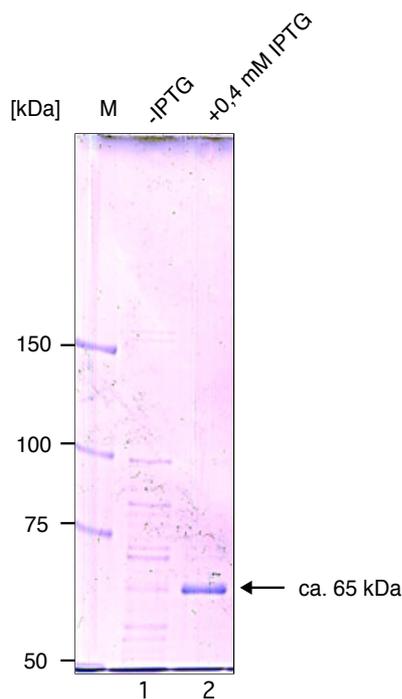


Abbildung 16: Expression eines 65 kDa Proteins in *E. coli*

Dargestellt ist ein 6%iges SDS-Polyacrylamidgel, in dem Proteinproben von rekombinanten *E. coli* aufgetragen wurden. *E. coli* BL21(DE3)[pAP/*lacI*^Q] wurde mit dem Expressionsplasmid pJC45-*P300* transformiert. Rekombinante *E. coli* wurden bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,1-0,2 kultiviert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG. 1,5 h nach Induktion wurden die Bakterien sedimentiert und in SDS-Probenpuffer lysiert. Aufgetragen wurden Proteinproben die vor (Bahn 1) und nach (Bahn 2) Induktion entnommen wurden. Die Größen des Proteinstandards (Bahn M) sind links abgebildet.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem 65 kDa Protein um den N-Terminus von P300 handelt, erfolgte eine *matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight-mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS)-Analyse (2.2.3.9). Die MALDI-Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Joachim Clos durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der Molekülmasse frei fliegender Ionen im Hochvakuum. Dafür wurden aus der entsprechenden Proteinbande Proben ausgestochen und mit Trypsin verdaut. Da Trypsin Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, konnten die Massen der entstandenen Peptid-Fragmente des P300 vorhergesagt werden. Die berechneten Peptidmassen des P300 wurden mit den experimentell ermittelten Peptidmassen aus der MALDI-Analyse verglichen. Es lagen ausreichend hohe Übereinstimmungen der Massen vor, so dass das 65kDa Protein als N-Terminus von P300 identifiziert werden konnte. Zur Gewinnung von P300-spezifischen Antikörpern sollte eine Immunisierung mit dem N-Terminus des P300-Proteins ausreichend

sein. Für die Immunisierung war es notwendig, dass rekombinant exprimierte Protein vorher aufzureinigen.

3.4.3 Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins zur Antigen-Gewinnung

Das koexprimierte Histidin-tag am N-Terminus des 65 kDa Proteins, erlaubte die Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Dazu wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen und zentrifugiert. Im Überstand konnte kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden (Abb. 17, Bahn 3). Dies deutet auf die Bildung von *inclusion bodies* hin. Diese unlöslichen Aggregate werden häufig bei der Überexpression von Proteinen in Bakterienzellen gebildet (Ausubel F.M., 1989); pET System Manual 6th Edition, Novagen, 1995). Die rekombinanten Proteine liegen in den Aggregaten in einem nicht-nativen Zustand vor. Unter denaturierenden Bedingungen können *inclusion bodies* extrahiert werden. Durch Inkubation mit 8 M Harnstoff wurden die *inclusion bodies* aufgelöst (Bahn 4). Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.

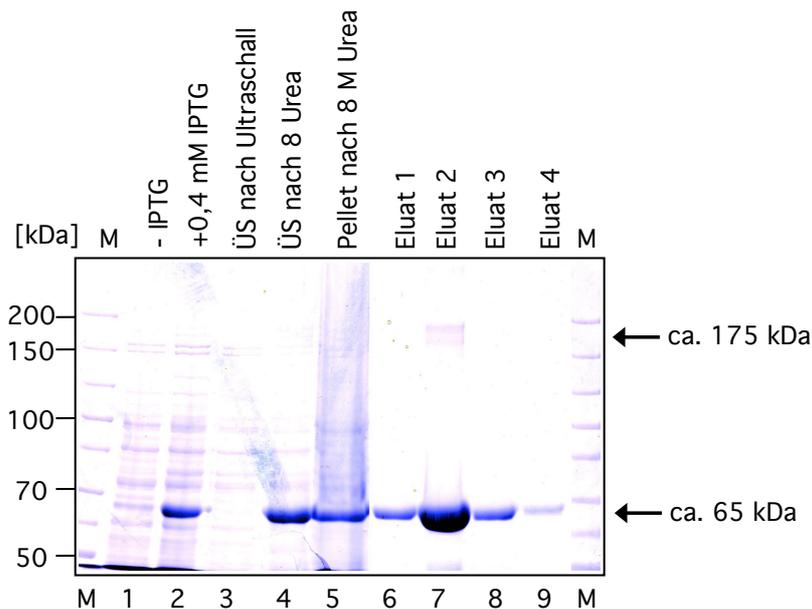


Abbildung 17: Aufreinigung des 65 kDa Proteins durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die Abbildung zeigt ein 6%iges SDS-Polyacrylamidgel, in dem die Fraktionen aus der Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennt wurden. *E. coli* BL21(DE3)[pAP/*lacI*^Q] wurde mit dem Expressionsplasmid pJC45-*P300* transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von IPTG. Die Aufreinigung wurde wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Aufgetragen wurden Proteinproben rekombinanter *E. coli* vor und nach der Induktion mit IPTG (Bahn 1 und 2), der Überstand vor und nach Extraktion mit 8 M Harnstoff (Bahn 3 und 4) sowie das Pellet nach Behandlung mit 8 M Harnstoff (Bahn 5). Die Eluate wurden durch Behandlung mit 250 mM Imidazol erhalten (Bahn 6 - 9). Bahn M wurde mit Proteinmarker beladen. Die Positionen des Größenstandards sind links in [kDa] angegeben. ÜS=Überstand

Das über das Histidin-tag an die Nickel-Säule gebundene rekombinante Protein wurde mit 250 mM Imidazol eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem 6%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 17). Man erkennt, dass sich in den Eluatn fast ausschließlich das 65 kDa Protein befindet (Bahn 6-9). Im Haupteluat ist eine weitere schwache Bande bei ca. 175 kDa zu sehen (Bahn 7). Um den Harnstoff aus den Eluatn zu entfernen, wurden diese einer Dialyse gegen PBS unterzogen (2.2.3.4). Das so gewonnene Antigen konnte nun für die Immunisierung eingesetzt werden.

3.4.4 Gewinnung von Antikörpern

Für die Erzeugung von P300-spezifischen Antikörpern wurde eine Maus mit gereinigtem Antigen immunisiert (2.2.3.10). Insgesamt fanden vier Immunisierungen in einem Zeitraum von sechs Wochen statt. Nach Isolierung des Antikörpers, wurde dieser in Immuno-Blot-Analysen (2.2.3.13 und 2.2.3.14) auf seine Spezifität hin untersucht. Der Antikörper reagierte nur schwach mit 1-0,5 µg des rekombinanten Proteins (Daten nicht gezeigt). Geringere Antigen-Konzentrationen wurden vom Antikörper nicht erkannt. Dagegen reagierten *Leishmania*-Lysate sehr stark mit dem Antikörper. Es konnte jedoch keine Spezifität festgestellt werden, da der Antikörper das gesamte Zellysate erkannte. Demnach ist der Antikörper unspezifisch und für subzelluläre Lokalisationsstudien des P300 nicht verwendbar.

Es wurden weitere Versuche unternommen, um P300-spezifische Antikörper zu erhalten. Die Immunisierung eines Huhns (2.2.3.11) mit dem 65 kDa Protein-Fragment führte ebenfalls zur Isolierung von unspezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt).

Die Herstellung von zwei Peptidantikörpern gegen P300 wurde bei *Eurogentec* in Auftrag gegeben (2.2.3.12). Es wurden zwei Peptidsequenzen des P300 ausgewählt, die zum N-Terminus gehören, und die nicht in weiteren *Leishmania*-Proteinen vorkommen. Nach Herstellung der Peptide wurden zwei Kaninchen mit einem Gemisch dieser Peptide immunisiert. In Immuno-Blot-Analysen wurden die Antiseren gegen *Leishmania*-Lysate und das aufgereinigte Protein getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 A und B dargestellt.

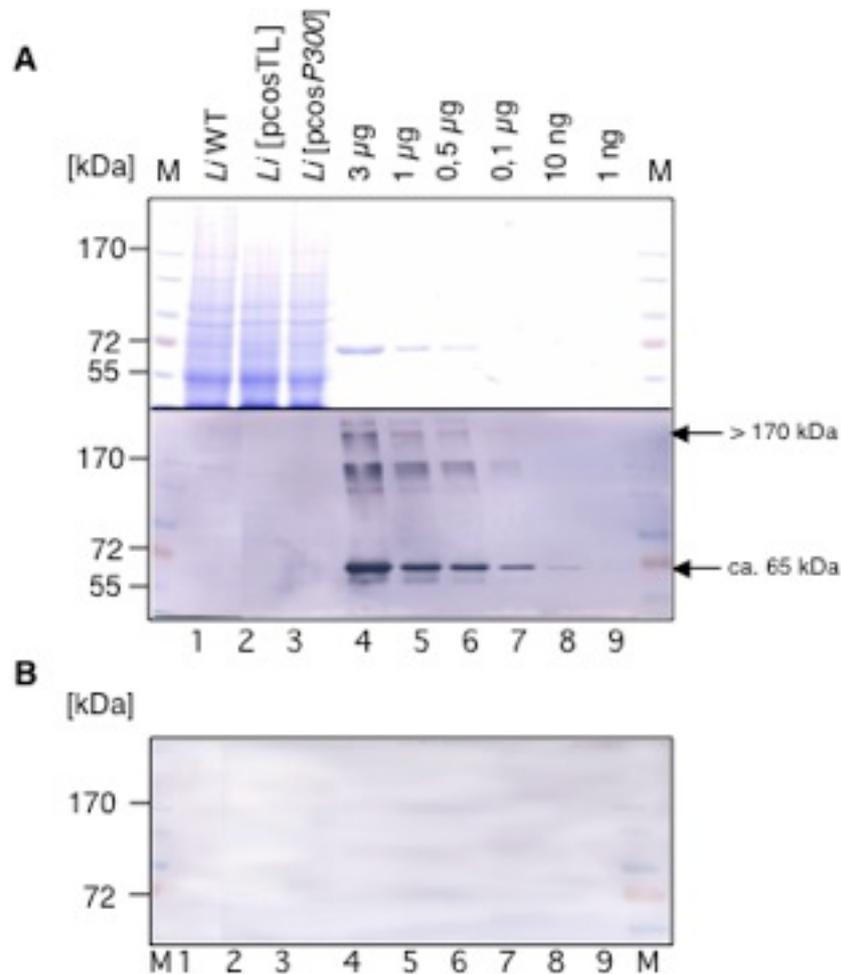


Abbildung 18: Nachweis der Spezifität der P300-Peptidantikörper gegen rekombinant exprimiertes Protein und *Leishmania*-Lysate

- (A) Dargestellt ist ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes 6%iges SDS-Polyacrylamidgel und der entsprechende Immuno Blot. 1×10^7 Zellen von *Li* WT, *Li* [pcosTL] und *Li* [pcosP300] wurden sedimentiert und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Lysate (Bahn 1-3) und rekombinant exprimiertes Protein in abnehmenden Konzentrationen (Bahn 4-9) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine eines identisch zu dem abgebildeten SDS-Polyacrylamidgels wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis erfolgte immunologisch mit anti-P300. Die Positionen des Größenstandards (Bahn M) sind links in [kDa] angegeben.
- (B) Ein identisches wie in (A) dargestelltes SDS-Polyacrylamidgel wurde für eine weitere Immuno Blot-Analyse verwendet. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Präimmunserum. Links sind die Größen des Proteinstandards in [kDa] angegeben.

Mit Hilfe der Peptidantikörper konnte das Protein bis zu einer Konzentration von 10 ng nachgewiesen werden (Abb. 18A, Bahn 8). Weiterhin wurden Proteine mit größeren Massen erkannt (Bahn 4-7), die im SDS-Polyacrylamidgel nicht zu sehen sind. *Leishmania*-Proteine in den Zelllysaten wurden von den Peptidantikörpern jedoch nicht erkannt (Bahn 1-3). Dies schließt eine Verwendung der Peptidantikörper zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des P300 in *Leishmania* aus. Abbildung 18 B zeigt die Immuno-Blot-Analyse mit Präimmunserum des entsprechenden Kaninchens. Es wurden keine *Leishmania*-Proteine nachgewiesen.

Bisher konnten durch Immunisierung mit dem N-Terminus von P300 keine spezifischen Antikörper hergestellt werden. Eine Immunisierung mit dem vollständigen Protein (300 kDa) könnte möglicherweise zur Produktion von spezifischen Antikörpern führen. Dazu ist die Expression des vollständigen Proteins eine notwendige Voraussetzung.

3.4.5 Erneute Klonierung und Expression von P300 in *E. coli*

Die Klonierung des P300-ORF's in pJC45 führte nur zur Expression des N-Terminus (65 kDa) von P300 (3.4.2). Es wurde angenommen, dass während der Amplifizierung des P300-ORF's ein Stop-Codon, durch *frameshift* Mutation (Verschiebung des Leserasters) oder Punktmutation, bei ca. 1842 bp eingefügt wurde.

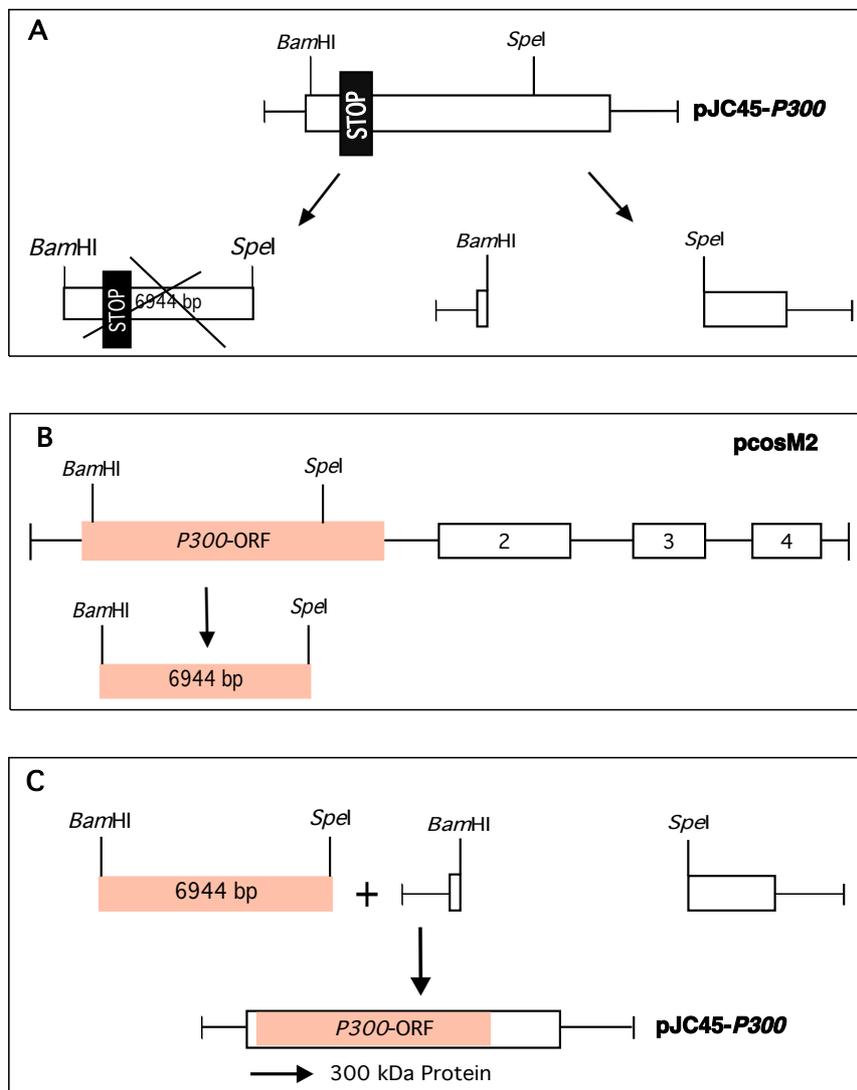


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des P300-ORFs in pJC45

- (A) Verdau des aus der ersten Klonierung (3.4.1) hervorgegangenen Expressionsplasmids pJC45-P300 mit *Bam*HI und *Spe*I.
- (B) Verdau des Cosmids pcosM2 mit *Bam*HI und *Spe*I.
- (C) Ligation des 6944 bp - Fragmentes aus pcosM2 (B) mit dem linearisierten Expressionsplasmid pJC45-P300 aus (A).

Zunächst wurde versucht, den *P300*-ORF aus neu durchgeführten PCRs, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, in pJC45 und andere Expressionsvektoren zu klonieren. Dies ist auch nach mehreren Versuchen nicht mehr gelungen. Eine direkte Klonierung des PCR-Produktes in einen Expressionsvektor wurde deshalb aufgegeben. Aus den vorangegangenen Abschnitten ist bekannt, dass *P300* auf dem Cosmid pcosM2 lokalisiert ist, und dass *Li* [pcosM2]-Parasiten resistent gegenüber Miltefosin sind. Dies deutet darauf hin, dass der *P300*-ORF auf pcosM2 seine Funktion ausüben kann. Durch einen Austausch des vermeintlichen Stop-Codon-tragenden Fragmentes im *P300*-ORF von pJC45-*P300* mit dem entsprechenden Fragment aus dem *P300*-ORF von pcosM2 sollte der vermutlich fehlerhafte DNA-Abschnitt entfernt werden. Mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Spe*I wurde aus dem *P300*-ORF von pJC45-*P300* ein 6944 bp großes DNA-Fragment rausgeschnitten (Abb. 19A). Da dieser DNA-Abschnitt das vermeintliche Stop-Codon enthielt, wurde er verworfen. Aus pcosM2 wurde mit denselben Restriktionsenzymen das äquivalente Fragment aus dem *P300*-ORF rausgeschnitten (Abb. 19B). Es folgte die Ligation des isolierten 6944 bp Fragments aus pcosM2 in das mit *Bam*HI und *Spe*I linearisierte Konstrukt pJC45-*P300* (Abb. 19C).

Nach Transformation der DNA in *E. coli* wurden zehn positive Klone identifiziert. Aus zwei positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert. Für die Expression des P300 wurde diese anschließend in *E. coli* BL21(DE3)[pAP/*lacI*^Q] transformiert. Die Expression erfolgte wie bereits beschrieben (2.2.3.2). Die Zellysate wurden in einem 6%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.7). Abbildung 20 A zeigt das Ergebnis der Expression. Nach Induktion ist keine prominente Bande in der Größe von 65 kDa vorhanden (Bahn 2). Dagegen ist eine Bande zu erkennen, die deutlich größer ist als 200 kDa (Bahn 2). Diese Bande tritt weder vor Induktion (Bahn 1), noch bei der Vektorkontrolle auf (Bahn 3 und 4). Eine Peptidmassen Analyse durch MALDI-TOF bestätigte, dass es sich bei dieser Bande um ein Produkt des P300-Gens handelt. Das vollständige Protein P300 wurde demnach erfolgreich exprimiert. Dies beweist weiterhin, dass es sich bei dem klonierten DNA-Abschnitt tatsächlich um einen offenen Leserahmen handelt. Neben der 300 kDa Bande, treten zahlreiche weitere Banden mit geringeren Molekulargewichten auf (Bahn 2). Möglicherweise sind dies Bruchstücke des 300 kDa Proteins. Auffallend ist weiterhin, dass die Expression des vollständigen Proteins nicht sehr stark ist. Für die Gewinnung von P300-spezifischen Antikörpern sollte eine Immunisierung mit gereinigtem vollständigem Protein erfolgen. Die nachfolgende Aufreinigung des Antigens durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie lieferte jedoch kein gereinigtes Antigen. Es wurden neben dem 300 kDa Protein stets auch Proteine mit geringeren Molekulargewichten aufgereinigt (Abb. 20B, Bahn 6-8).

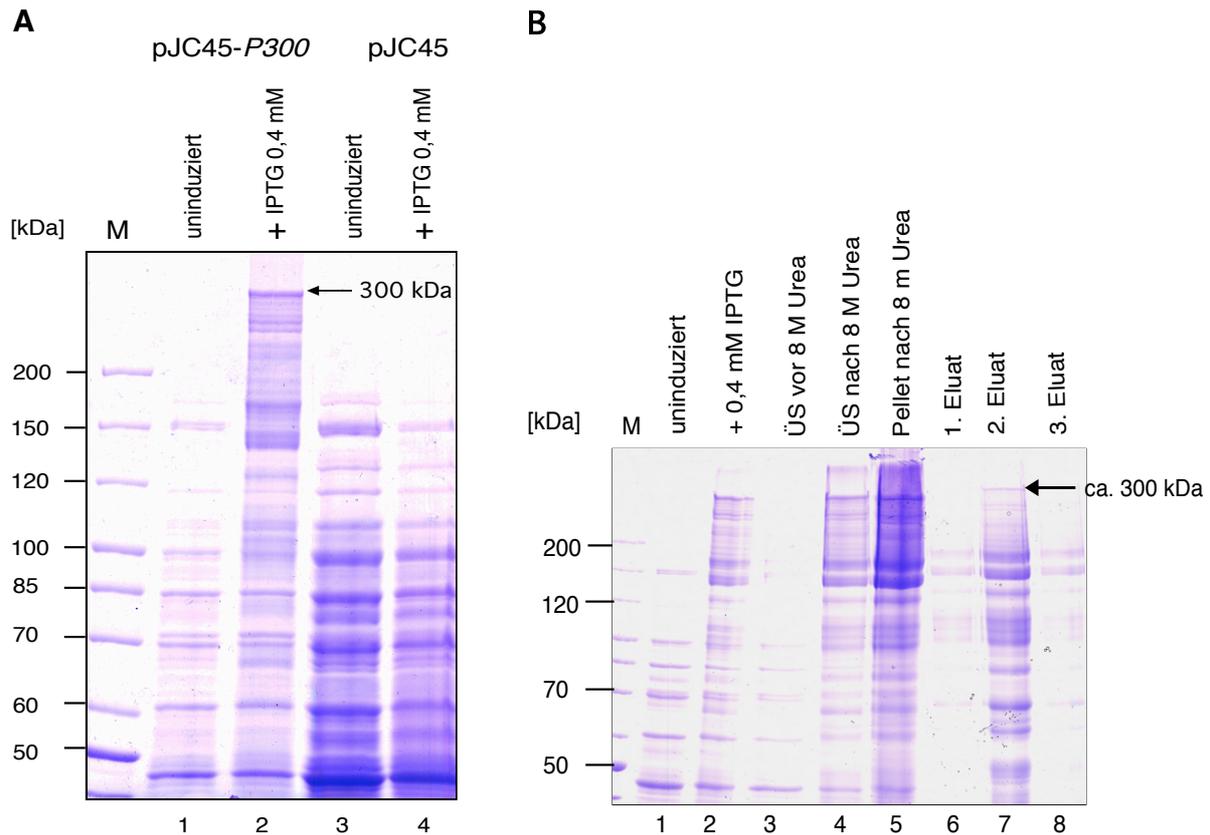


Abbildung 20: Expression und Aufreinigung des 300 kDa Proteins

(A) *E. coli* BL21(DE3)[pAP_{lacI}^Q] wurde mit dem Expressionsplasmid pJC45-*P300* und dem Vektor pJC45 transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG. Nach Induktion wurden die Bakterien sedimentiert und in SDS-Probenpuffer lysiert. Es wurden Proteinproben vor und nach Induktion in einem 6%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

(B) Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben. Die Abbildung zeigt ein 6%iges SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden Proteinproben rekombinanter *E. coli* vor und nach Induktion mit IPTG (Bahn 1 und 2), der Überstand vor und nach Extraktion mit 8 M Harnstoff (Bahn 3 und 4) sowie das Pellet nach Behandlung mit 8 M Harnstoff (Bahn 5). Die Eluate wurden durch Behandlung mit 250mM Imidazol erhalten (Bahn 6 - 8). In Bahn M wurde der Proteinmarker aufgetragen, dessen Positionen links angezeigt werden.

Um eine verstärkte Expression des 300 kDa Proteins zu erreichen, wurde der *P300*-ORF aus pJC45-*P300* in weitere Expressionsvektoren kloniert (pJC25, pRSET c; 2.1.9); die Expression wurde in verschiedenen *E. coli* Stämmen (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS; *E. coli* BL21 (DE3) C43; *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP; 2.1.10) durchgeführt und die Aufreinigung in modifizierten Formen mehrfach wiederholt. Trotzdem ist es nicht gelungen, dass rekombinant exprimierte 300 kDa Protein aufzureinigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Immunisierungen mit dem N-Terminus des P300 zur Gewinnung von unspezifischen Antikörpern führten. Peptidantikörper von kommerziellen Anbietern erkannten keine *Leishmania*-Proteine in Zelllysaten. Trotz erfolgreicher Expression des 300 kDa in *E. coli*, konnte eine Immunisierung mit dem

vollständigen Protein nicht durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine P300-spezifischen Antikörper gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde weder die subzelluläre Lokalisation, noch die Expression von *P300* in Immuno-Blot-Analysen untersucht.

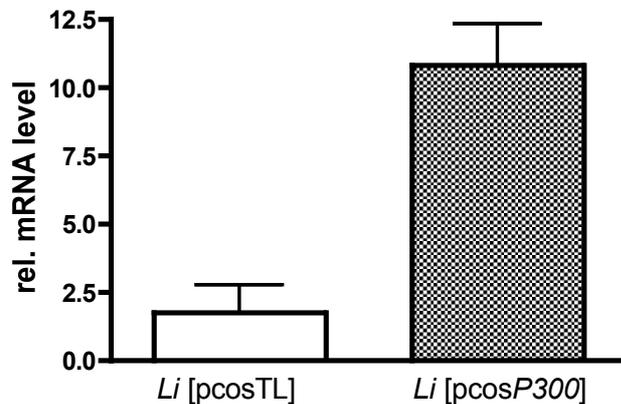


Abbildung 21: P300-Genexpression von *Li [pcosTL]* und *Li [pcosP300]*

Aus 3×10^7 Promastigoten erfolgte die Isolierung von mRNA, die für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Die gewonnene cDNA wurde mit Hilfe von P300 spezifischen Oligonukleotiden mittels semi-quantitativer *real time* RT-PCR amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde die Amplifizierung von Actin durchgeführt, da es in beiden Zelllinien eine stabile Expression aufweist.

Eine Überprüfung der P300-Genexpression von *Li [pcosTL]* und *Li [pcosP300]* wurde mit Hilfe der semi-quantitativen *real time* RT-PCR durchgeführt (Abb. 21; 2.2.2.15). Es ist eine deutliche Erhöhung (6-fach) des *P300*-mRNA Levels in *Li [pcosP300]* zu erkennen. Dies zeigt, dass eine Korrelation zwischen der *P300*-Überexpression und der Miltefosin-Resistenz der Promastigoten existiert.

3.5 *P300* vermittelt Antimon-Resistenz in Promastigoten

Für die weitere Charakterisierung von *P300* war von Interesse, ob die Erhöhung der Kopienzahl auch zur Resistenz gegenüber anderen anti-*Leishmania*-Wirkstoffen führen kann. Pentavalente Antimonpräparate zählen nach wie vor zu den *first-line drugs* für die Behandlung von VL. Untersuchungen haben gezeigt, dass fünfwertiges Antimon (SbV), im Gegensatz zu dreiwertigem Antimon (SbIII), nicht oder nur gering toxisch auf Promastigoten wirkt (Sereno D., 1998; Shaked-Mishan P., 2001). Daher wird davon ausgegangen, dass erst die Umwandlung vom fünf- zu dreiwertigen Antimon die zytotoxische Wirkung verursacht (Loiseau P.M., 2006; Ouellette M., 2004). Pentamidin (PEN) ist ein weiterer anti-*Leishmania*-Wirkstoff und kommt hauptsächlich bei Antimon-resistenten Infektionen zum Einsatz. Daher zählt PEN zu den *second-line drugs* (Croft S.L., 2002). Beide Wirkstoffe unterscheiden sich chemisch und strukturell gänzlich von Miltefosin.

Im Folgenden wurde der Effekt von PEN und SbIII auf die Vermehrung der rekombinanten Parasiten untersucht. Dazu wurden *Li [pcosTL]*, *Li [pcosM1]*, *Li [pcosM2]* und *Li [pcosP300]*-

Promastigoten jeweils auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit unterschiedlichen SbIII- bzw. PEN-Konzentrationen kultiviert. Nach 72 h wurden die Zelldichten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 A und B dargestellt. Das Wachstum der rekombinanten Parasiten in Gegenwart von PEN ist dem Wachstum der Kontrolle *Li* [pcosTL] sehr ähnlich (Abb. 22A). Es ist keine signifikante Erhöhung der IC_{50} -Werte der rekombinanten Promastigoten für PEN zu erkennen. Die IC_{50} -Werte von *Li* [pcosTL] ($4 \mu\text{M}$) und den rekombinanten Parasiten ($4\text{-}4,8 \mu\text{M}$) für PEN liegen dicht beieinander. Dagegen unterscheidet sich die Vermehrung der rekombinanten Leishmanien in Gegenwart von SbIII deutlich von der Vermehrung der Kontrolle (Abb. 22B). *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300] besitzen einen 2-fach höheren IC_{50} -Wert für SbIII ($300\text{-}350 \mu\text{M}$) im Vergleich zu *Li* [pcosTL] ($150 \mu\text{M}$). Die *Li* [pcosM2]-Promastigoten zeigten die geringste Empfindlichkeit gegenüber SbIII, gefolgt von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosP300]. Diese Beobachtung korreliert mit Ergebnissen aus vorangegangenen Experimenten (3.1.4. und 3.2.4.).

Die Überexpression von *P300* führt offensichtlich zu einer SbIII-, jedoch nicht zu einer PEN-Resistenz in Promastigoten.

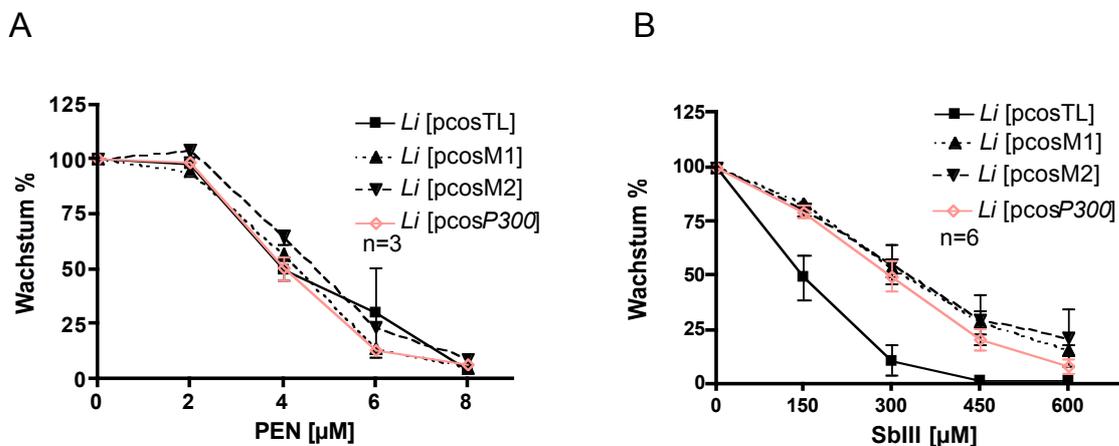


Abbildung 22: Effekt von PEN und SbIII auf die Vermehrung rekombinanter Promastigoten

Promastigote Leishmanien wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit unterschiedlichen PEN-Konzentrationen (A) bzw. SbIII-Konzentrationen (B) für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellzahlen mittels des CASY-Cellcounter & Analyzer ermittelt. Jeder Wert repräsentiert den Durchschnittswert von drei bzw. sechs unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.6 P300 vermittelt Miltefosin-Resistenz in intrazellulären Amastigoten

Die bisherigen Experimente wurden mit promastigoten Stadien von *L. infantum* durchgeführt. Die Symptome einer *Leishmania*-Infektion werden jedoch von der Amastigoten-Form des Erregers hervorgerufen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob P300 in Amastigoten ebenfalls Miltefosin-Resistenz vermitteln kann. Die Experimente wurden mit intrazellulären Amastigoten in Makrophagen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 2×10^5 J774 Makrophagen-ähnliche Zellen im Verhältnis 1:10 mit Promastigoten von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300] infiziert (2.2.1.8). Nach Phagozytose der Promastigoten findet die Differenzierung zu Amastigoten in den Phagolysosomen der Makrophagen statt. Vier bis sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Makrophagen in Methanol fixiert und nach Giemsa gefärbt (2.2.1.9). Es folgte die mikroskopische Auszählung von jeweils 50 infizierten Makrophagen. Dabei wurden die Makrophagen auf intakte intrazelluläre Amastigoten untersucht.

Die Resultate von vier unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 23 zusammengefasst. Bereits bei einer Miltefosin-Konzentration von 10 μM ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Resistenzen der rekombinanten Amastigoten *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2], und der Kontrolle *Li* [pcosTL] zu erkennen. Die rekombinanten Amastigoten besitzen einen 2,4-fach (19 μM) bzw. einen 3,25-fach (24 μM) erhöhten IC_{50} -Wert für Miltefosin.

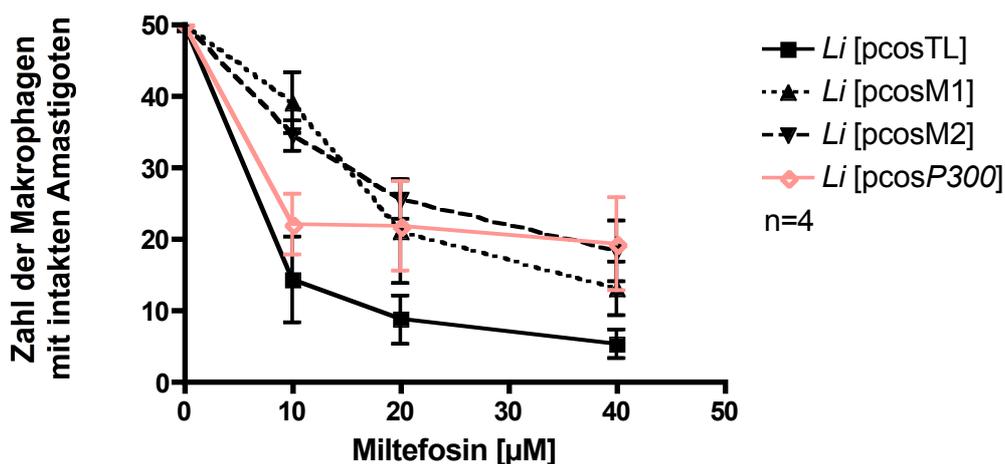


Abbildung 23: Miltefosin-Resistenz von rekombinanten *L. infantum* in Makrophagen

J774 Makrophagen wurden *in vitro* mit promastigoten Stadien von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM1] *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300] im Verhältnis 1:10 infiziert. Die infizierten Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Für die mikroskopische Auswertung erfolgte im Anschluss die Fixierung der Zellen und die Färbung nach Giemsa. Es wurden jeweils 50 infizierte Makrophagen auf intakte intrazelluläre Amastigoten untersucht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

Dagegen zeigen die *Li* [pcosP300]-Amastigoten bei einer Inkubation mit 10 μM Miltefosin eine ähnliche Miltefosin-Sensitivität wie *Li* [pcosTL]. Die IC_{50} -Werte für Miltefosin dieser beiden Zelllinien liegen dicht beieinander (9 μM bzw. 8 μM). Erst bei einer Miltefosin-Konzentration von 20 μM wird ein signifikanter Unterschied zwischen den *Li* [pcosP300]- und den *Li* [pcosTL]-Parasiten deutlich. Die Anzahl der Makrophagen mit intakten *Li* [pcosP300]-Amastigoten bleibt ab 10 μM annähernd gleich. Die Ergebnisse der Makrophagen-Infektionen lassen den Schluss zu, dass die Cosmide auch in intrazellulären Amastigoten Miltefosin-Resistenz hervorrufen können. Dabei vermittelt pcosM2 wiederum die ausgeprägteste Resistenz.

Nach erfolgreicher Transfektion der Cosmide pcosTL, pcosM2 und pcosP300 in *Leishmania donovani* (*Ld*) WT, wurde das oben beschriebene Experiment analog wiederholt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 24 gezeigt. Wie zu erkennen ist, bleibt die Anzahl der Makrophagen mit intakten *Ld* [pcosTL]-Amastigoten immer unter der von *Ld* [pcosM2]- und *Ld* [pcosP300]-Amastigoten. *Ld* [pcosTL] besitzt den niedrigsten IC_{50} -Wert für Miltefosin (8 μM). Im Vergleich zu *L. infantum* (Abb. 23) ist *L. donovani* bei hohen Konzentrationen empfindlicher gegenüber Miltefosin. Die stärkste Resistenz wird von Cosmid pcosM2 in Amastigoten von *L. donovani* vermittelt. Die gewonnenen Daten aus den Makrophagen-Infektionen zeigen, dass die Erhöhung der Kopienzahl von *P300* auch in intrazellulären Amastigoten Miltefosin-Resistenz hervorruft, und dass dieser Effekt nicht auf eine *Leishmania*-Spezies beschränkt ist.

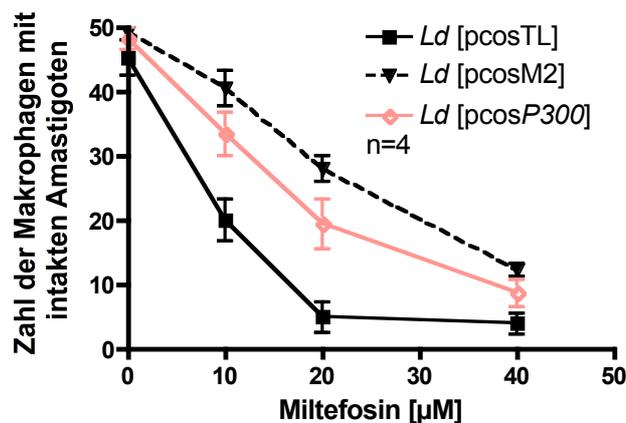


Abbildung 24: Miltefosin-Resistenz von rekombinanten *L. donovani* in Makrophagen

J774-1 Makrophagen wurden mit rekombinanten *L. donovani* infiziert. Es folgte die 24-stündige Inkubation mit unterschiedlichen Miltefosin-Konzentrationen. Die Auswertung wurde wie in Kapitel 3.6 beschrieben durchgeführt. Die gezeigten Durchschnittswerte resultieren aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.7 Herstellung einer *P300*-Deletionsmutante in *L. infantum*

Die bisherigen Experimente zur Charakterisierung von *P300* lieferten keine Informationen über dessen biologische Funktion. Eine weit verbreitete Methode um die Funktion eines Proteins in einem Organismus zu untersuchen, ist die Herstellung eines gezielten Genaustauschs. Dabei werden mittels homologer Rekombination beide Allele des entsprechenden Gens nacheinander gegen Selektionsmarker ausgetauscht. Man erhält Deletionsmutanten, die das Genprodukt nicht mehr synthetisieren können. Untersuchungen des Phänotyps der entstandenen Deletionsmutanten lassen oft Rückschlüsse auf die Funktion und Rolle des Genprodukts zu. Für Organismen der Ordnung Kinetoplastida wurde diese Methode erstmals 1990 von Cruz und Beverley beschrieben (Cruz A., 1990).

3.7.1 Bestimmung der Kopienzahl des *P300*-Gens

Für die Erzeugung von Deletionsmutanten ist die genomische Organisation (*single copy*-Gen oder *multi copy*-Gen) des entsprechenden Gens von Bedeutung. Sogenannte *single copy*-Gene liegen im Genom in einfacher Kopie pro haploiden Chromosomensatz vor. Sie sind für die Herstellung von *Gen-knockouts* geeignet, da in zwei aufeinander folgenden Rekombinations-Ereignissen beide Allele durch Selektionsmarker ersetzt werden können. Zunächst wurde die Kopienzahl des *P300*-Gens ermittelt. Dazu wurden Informationen aus der *L. major*-Datenbank herangezogen, in der *P300* als *single copy*-Gen eingetragen ist. Das *L. infantum* Genomprojekt war zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen und unvollständig, und *P300* war zu diesem Zeitpunkt als *single copy*-Gen in der Datenbank gelistet. Zusätzlich wurde mittels *Southern Blot*-Analyse die genomische Organisation experimentell bestimmt. Zu diesem Zweck wurden je 10 µg genomischer DNA von *Li* WT mit vier verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente, erfolgte der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran. Anschließend wurde die DNA mit einer ³²P-markierten *P300*-Sonde (2.2.2.24) hybridisiert. In Abbildung 25 ist das Ergebnis der Autoradiographie dargestellt. *Bgl*II besitzt keine Restriktionsschnittstelle im *P300*-ORF. Demnach sollte bei einem *single copy*-Gen nur ein DNA-Fragment mit der *P300*-Sonde reagieren. In Bahn 1 ist lediglich eine Bande der erwarteten Größe (23038 bp) zu erkennen. Die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Sma*I und *Xho*I besitzen jeweils eine Schnittstelle im *P300*-ORF. Sollte das *P300*-Gen in einfacher Kopie im Genom vorliegen, müssten zwei DNA-Fragmente mit der Sonde hybridisieren. In Bahn 2 wurde der Verdau mit *Bam*HI aufgetragen. Die errechneten Größen der DNA-Fragmente betragen 20349 bp und 12586 bp. Es ist jedoch nur eine markierte Bande bei ca. 20349 bp zu erkennen. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass sich die *Bam*HI Schnittstelle am Anfang des *P300*-ORFs (Position: 5 bp) befindet. Das zweite

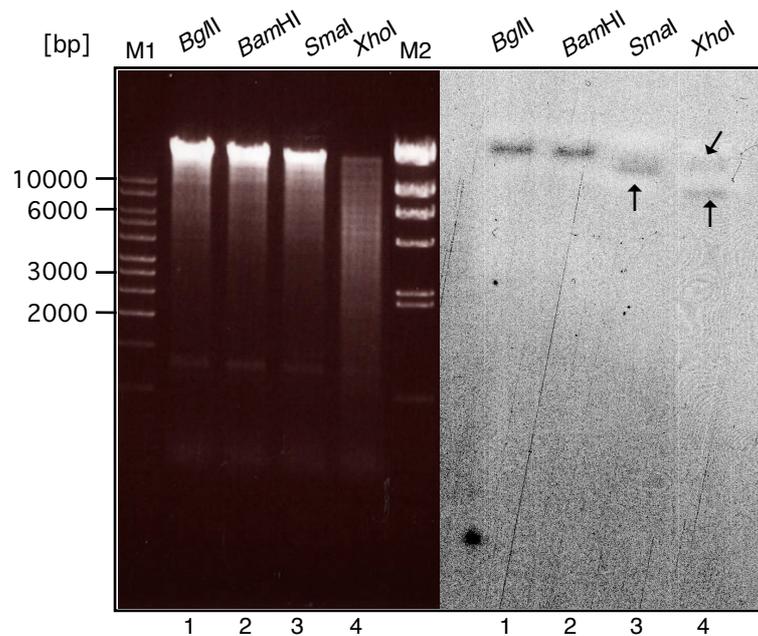


Abbildung 25: Bestimmung der Genkopienzahl von *P300* mittels *Southern Blot*-Analyse

Die Abbildung zeigt ein 0,7%iges, mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel und den entsprechenden *Southern Blot*. Je 10 µg genomischer DNA von *Li* WT wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II, *Bam*HI, *Sma*I und *Xho*I behandelt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der resultierenden Fragmente, wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Es folgte die Hybridisierung mit einer ³²P-markierten *P300*-Sonde. Als Längenstandard diente der 1-kb DNA-Marker (Bahn M1) und die λ-*Hind*III-Leiter (Bahn M2).

DNA-Fragment trägt demnach nur 5 Basenpaare des *P300*-Gens. Eine Hybridisierung der *P300*-Sonde mit einem derart kurzen DNA-Abschnitt findet unter den Bedingungen des *Southern Blot* nicht statt. Nach *Sma*I-Verdau (Bahn 3) ist ebenfalls nur eine markierte Bande von ca. 12000 bp vorhanden. Möglicherweise ist der Größenunterschied der erwarteten Fragmente (11561 bp und 14811 bp) zu gering, um eindeutig zwei Banden nachzuweisen zu können. Bei *Xho*I (Bahn 4) treten zwei markierte Banden in den erwarteten Größen (14623 bp und 8093 bp) auf. Die Ergebnisse der ersten Datenbank-Recherchen und der *Southern Blot*-Analyse erlaubten die Schlussfolgerung, dass *P300* in *L. infantum* in einfacher Kopie vorliegt.

Wie in 3.2.4 festgestellt wurde, wird durch die Erhöhung der Kopienzahl des *P300*-Gens eine erhöhte Miltefosin-Resistenz in Promastigoten hervorgerufen. Die Sequenzähnlichkeit von *P300* und *P235* (3.3) könnte auf eine ähnliche Aufgabe beider Proteine hindeuten, d.h. *P235* könnte ebenfalls zur Miltefosin-Resistenz beitragen. Aus Abbildung 11 wird ersichtlich, dass auf Cosmid pcosM1 nur der *P300*-ORF vollständig vorhanden ist, während auf dem Cosmid pcosM2 sowohl *P300* als auch *P235* kodiert werden. Ein zusätzlicher Effekt von *P235* könnte möglicherweise für die beobachtete, stärkere Miltefosin-Resistenz verantwortlich sein, die

von pcosM2 vermittelt wird. Damit eine Funktionsanalyse von P235 durchgeführt werden konnte, sollten neben einer P300-Deletionsmutante, auch eine P235- und eine P300-P235-Doppel-Deletionsmutante in *L. infantum* hergestellt werden. Nach Informationen aus der *L. major*- und *L. infantum*-Datenbank handelte es sich bei P235 ebenfalls um ein *single copy*-Gen. Die Genkopienzahl von P235 wurde nicht experimentell bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Erzeugung von P300- bzw. P235-Deletionsmutanten nicht gelungen. In den folgenden Abschnitten wird deshalb lediglich die versuchte Herstellung einer P300-P235-Deletionsmutante beschrieben.

3.7.2 Herstellung der DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination

Für den Austausch des P300- und P235-Gens in *Li* WT durch die Selektionsmarker Puromycinacetyltransferase (Pac) und Hygromycin Phosphotransferase (Hpt), wurden zunächst die DNA-Konstrukte hergestellt. Abbildung 26 zeigt die Strategie zur Herstellung der Konstrukte. Die 5'-untranslatierte Region (UTR) des P300-ORFs und die 3'-UTR des P235-ORFs wurden mit spezifischen Startern (*primer*, 2.1.8) mittels PCR aus dem Cosmid pcosM2 amplifiziert. Dabei wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen in die ca. 1500 bp großen PCR-Produkte eingefügt. Die 5'- und 3'-UTRs wurden nacheinander über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Acc65I* bzw. *BamHI* und *HindIII* in den Plasmidvektor pUC19 ligiert. Um zu überprüfen, ob die richtigen UTRs amplifiziert und kloniert wurden, erfolgte eine Sequenzanalyse der entstandenen Konstrukte. Anschließend wurden die Gene der Selektionsmarker, *Pac* bzw. *Hpt*, über die Schnittstellen *Acc65I* und *BamHI* zwischen die 5'- und 3'-UTRs in die Plasmide eingefügt. Nach enzymatischem Verdau der hergestellten Konstrukte mit *SwaI*, konnten die linearisierten DNA-Fragmente für die Transfektionen eingesetzt werden.

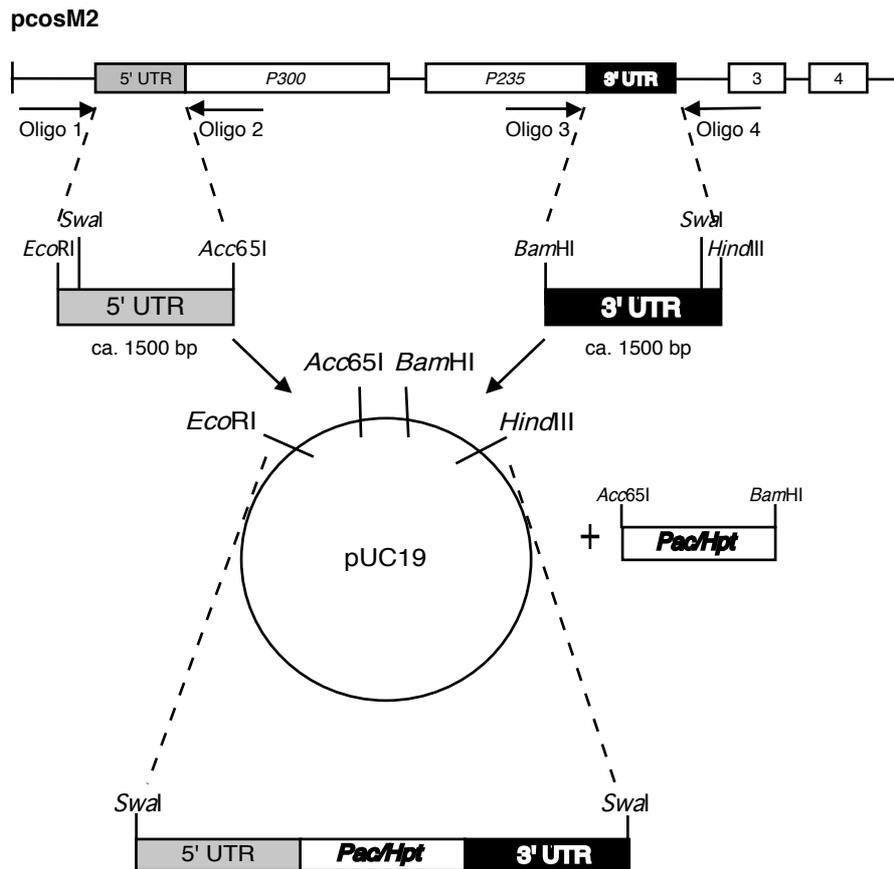


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Klonierung der DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination

UTR = untranslatierte Region; *Pac* = Puromycinphosphotransferase; *Htp* = Hygromycin Phosphotransferase

Das Cosmid pcsm2 diente bei der Amplifizierung der 5'-UTR des P300-Gens und der 3'-UTR des P235-Gens als *Template*. Während der PCR wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen in die UTRs eingefügt. Nach Klonierung der UTRs und der Selektionsmarker in das Plasmid pUC19, erfolgte der Verdau der entstandenen Konstrukte mit *SwaI*. Die linearisierten Konstrukte wurden für die homologe Rekombination verwendet.

3.7.3 Transfektion der DNA-Konstrukte in *L. infantum* WT

Zunächst erfolgte die Transfektion des *Htp*-Konstrukts in *Li* WT. Promastigoten, die sich unter Hygromycin-Selektion vermehren konnten, wurden anschließend in einer 96 *well*-Mikrotiterplatte vereinzelt (2.2.1.4). Insgesamt konnten 13 Einzelklone selektiert werden, von denen fünf einer Überprüfung mittels PCR unterzogen wurden. Dabei wurde mit spezifischen Oligonukleotiden (2.1.8) aus genomischer DNA von *Li* WT und den *LiP300-P235*^{-/-}-Mutanten jeweils ein ca. 1000 bp-Fragment des *P300*-ORFs und ein ca. 800 bp-Fragment des *P235*-ORFs amplifiziert. Abbildung 27 A und B zeigen die Ergebnisse der PCR für Klon *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.4. Im Vergleich zu *Li* WT nimmt die Intensität des spezifischen *P300*-Amplifikats bei *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.4 deutlich ab (Abb. 27A, Bahn 2). Die Intensität der charakteristischen *P235*-Bande scheint bei *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.4 ebenfalls schwächer zu sein als bei *Li* WT (Abb. 27B, Bahn 2). Dies deutet daraufhin, dass jeweils ein Allel des *P300*- und des *P235*-

Gens im Genom durch das *Htp*-Gen ausgetauscht wurde. Klon *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 wurde deshalb für die zweite Transfektionsrunde verwendet.

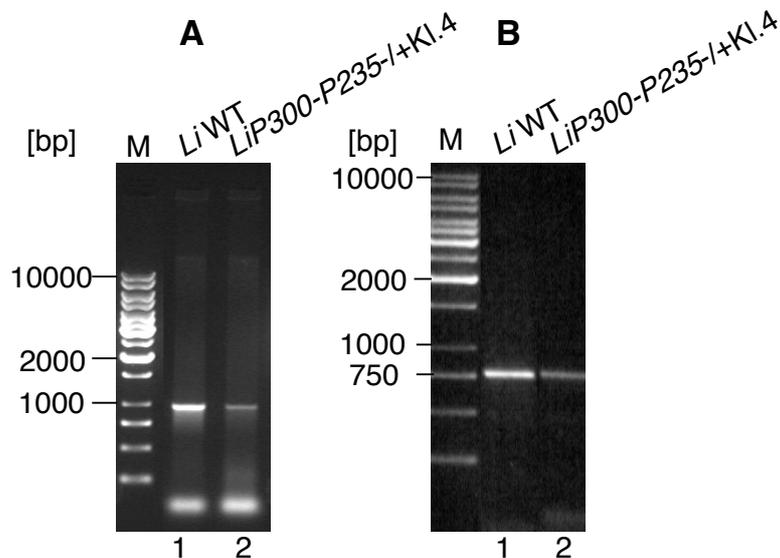


Abbildung 27: Überprüfung der *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4-Deletionsmutante mittels PCR

Aus genomischer DNA von *Li* WT und *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 erfolgte die Amplifizierung eines ca. 1000 bp spezifischen-*P300*-Fragments (**A**) und die eines *P235*-charakteristischen 800 bp-Fragments (**B**). Die Abbildung zeigt Ethidiumbromid-gefärbte 1%ige Agarosegele, in denen die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt wurden. In Bahn M wurde der 1-kb DNA-Längenstandard aufgetragen, dessen Größen links dargestellt sind.

Nach Transfektion des *Pac*-Konstrukts in *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 und anschließender Selektion mit Hygromycin und Puromycin, wurden die Zellen wiederum vereinzelt. Es konnten insgesamt neun Klone selektiert werden. *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.1 und *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 wurden in einer PCR-Analyse auf das Vorhandensein der *P300*- und *P235*-Gene im Genom untersucht. Aus genomischer DNA von *Li* WT und *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 ließ sich das spezifische *P300*-Fragment (1000 bp) amplifizieren (Abb. 28A). Wie bereits beobachtet, ist die Intensität der Bande bei *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 deutlich schwächer als bei *Li* WT (Bahn 1 und 2). Für die *LiP300-P235*^{-/-}-Mutanten konnte kein spezifisches *P300*-Amplifikat mehr nachgewiesen werden (Bahn 3 und 4). Dieses Experiment wurde mehrfach wiederholt; das Ergebnis war in allen Versuchen konstant.

Wie aus Abbildung 28 B ersichtlich wird, ließ sich allerdings das *P235*-spezifische Fragment aus genomischer DNA von *Li* WT und *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 amplifizieren. Auffallend ist, dass die Intensität der Bande bei *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 im Vergleich zur *Li* WT Bande nicht, wie im vorangegangenen Experiment (Bahn 2), reduziert ist. Das Amplifikat konnte entgegen den Erwartungen auch für die *LiP300-P235*^{-/-}-Mutanten nachgewiesen werden (Bahn 3 und 4).

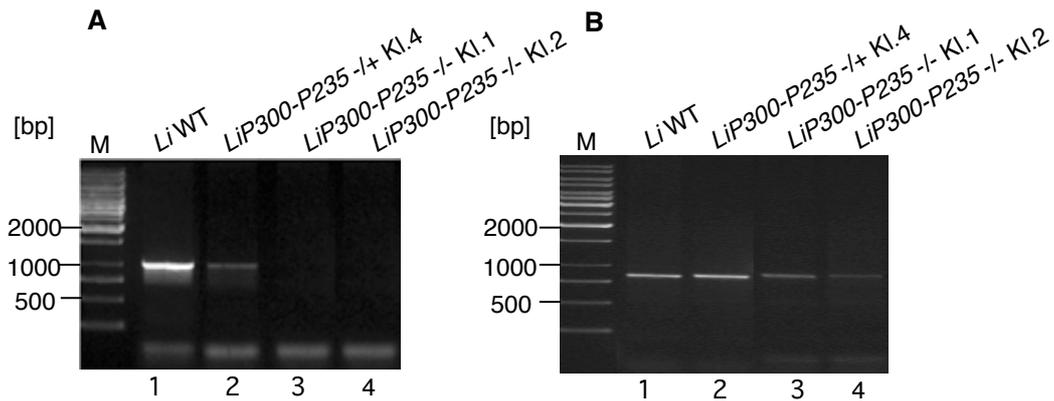


Abbildung 28: PCR-Analyse der *Lip300-P235*^{-/-}-Deletionsmutanten

Mittels PCR wurden die Zelllinien auf das Vorhandensein des P300-Gens (A) bzw. des P235-Gens (B) überprüft. Die Abbildung zeigt Ethidiumbromid-gefärbte 1%ige Agarosegele, in denen die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Der 1-kb DNA-Marker wurde in Bahn M aufgetragen und die Größen sind am linken Bildrand angezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach zwei aufeinander folgenden Transfektionen doppelt Antibiotika-resistente Promastigoten erhalten wurden, aus denen sich, aus zwei Klonen das *P300*-spezifische Fragment nicht mehr amplifizieren ließ. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass kein *P300*-Allel mehr im Genom der *Lip300-P235*^{-/-}-Mutanten vorhanden ist. Für das *P235*-Allel ist dies jedoch nicht der Fall; hier sind zumindest Teile des Gens erhalten geblieben.

3.7.4 Überprüfung der *Lip300-P235*^{-/-}-Deletionsmutante mittels *Southern Blot*-Analyse

Mittels *Southern Blot*-Analyse wurde die Integration der linearisierten Konstrukte im Genom von *Lip300-P235*^{+/-}-Kl.4 und *Lip300-P235*^{-/-}-Kl.2 genauer untersucht. Dazu erfolgte der enzymatische Verdau von je 10 µg genomischer DNA aus *Li* WT, *Lip300-P235*^{+/-}-Kl.4 und *Lip300-P235*^{-/-}-Kl.2 mit *EcoRV*. Die resultierenden Fragmente wurden durch FIGE aufgetrennt. Nach Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran, fand die Hybridisierung mit einer ³²P-markierten 5'-*P300*-UTR-Sonde, einer 3'-*P235*-UTR-Sonde und einer *pac*-Sonde statt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Restriktionskarte (Abb. 30) zeigt die *EcoRV*-Schnittstellen im Bereich des *P300*- und *P235*-ORFs, und die Größe der Fragmente, die mit den Sonden hybridisieren können.

Wie erwartet reagierte nach Verdau der *Li* WT-DNA nur das 11774 bp DNA-Fragment mit der 5'-*P300*-UTR-Sonde (Abb. 29A, Bahn 1). Das Signal für das WT-Allel wird bei *Lip300-P235*^{+/-}-Kl.4 etwa um die Hälfte schwächer. Gleichzeitig hybridisierte ein weiteres DNA-Fragment (21552 bp) mit der Sonde, welches nur bei Integration des *Htp*-Konstruktes in den *P300*-

Genlokus entstehen kann (Bahn 2). Bei Austausch beider *P300*-Allele durch die Gene der Selektionsmarker, sollte das Signal für das WT-Allel nicht mehr nachweisbar sein; dies ist bei *LiP300-P235^{-/-}-KI.2* der Fall. Es ist nur noch ein Signal in der erwarteten Größe (21552 bp) vorhanden (Bahn 3). Dieses Ergebnis lässt sich nur durch eine erfolgreiche Integration beider Selektionsmarker-Gene in den *P300*-Genlokus erklären.

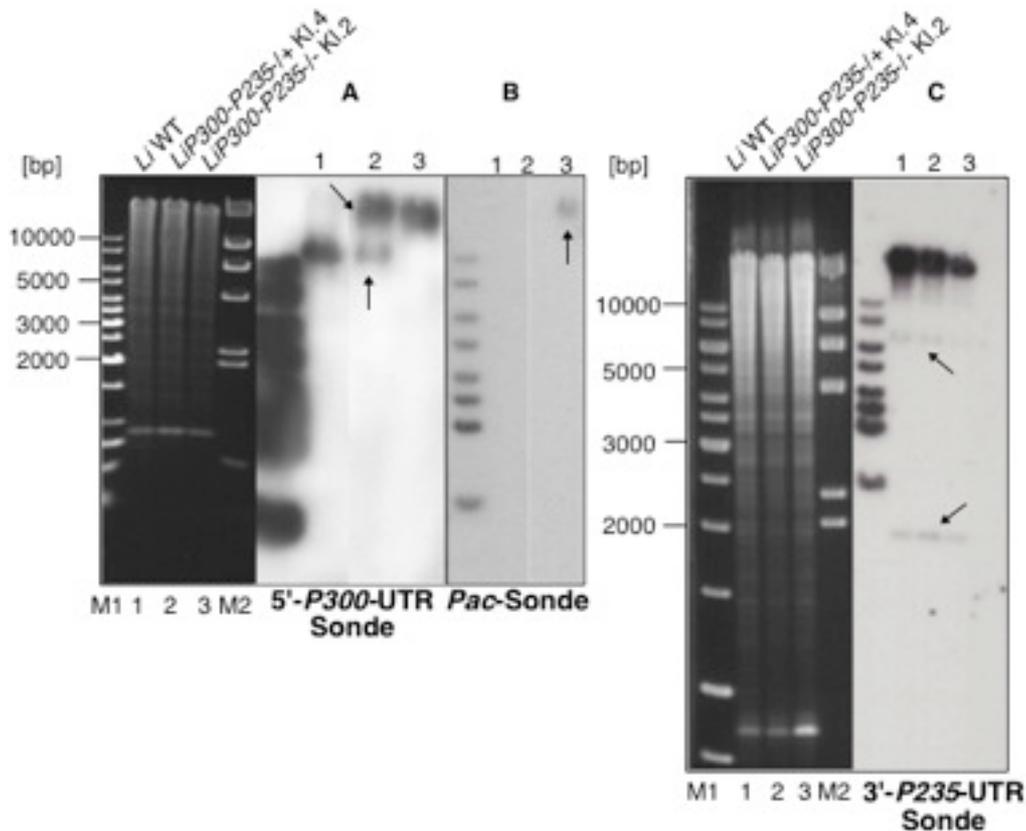


Abbildung 29: Southern Blot-Analyse der *LiP300-P235^{-/-}-KI.2* Deletionsmutante

Dargestellt sind ein mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1%iges Agarosegel und die dazugehörigen Southern Blot-Analysen. Je 10 µg chromosomaler DNA von *Li* WT, *LiP300-P235^{-/-}-KI.4* und *LiP300-P235^{-/-}-KI.2* wurden einem Restriktionsverdau mit *EcoRV* unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden mittels Feldinversions-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran, fand die Hybridisierung mit einer ³²P-markierten 5'-*P300*-UTR-Sonde (A), einer *Pac*-Sonde (B) und einer 3'-*P235*-UTR-Sonde (C) statt. Die Positionen des 1-kb DNA-Markers sind am linken Bildrand angezeigt. Die λ-*HindIII*-Leiter (Bahn M2) diente als zusätzlicher Längenstandard.

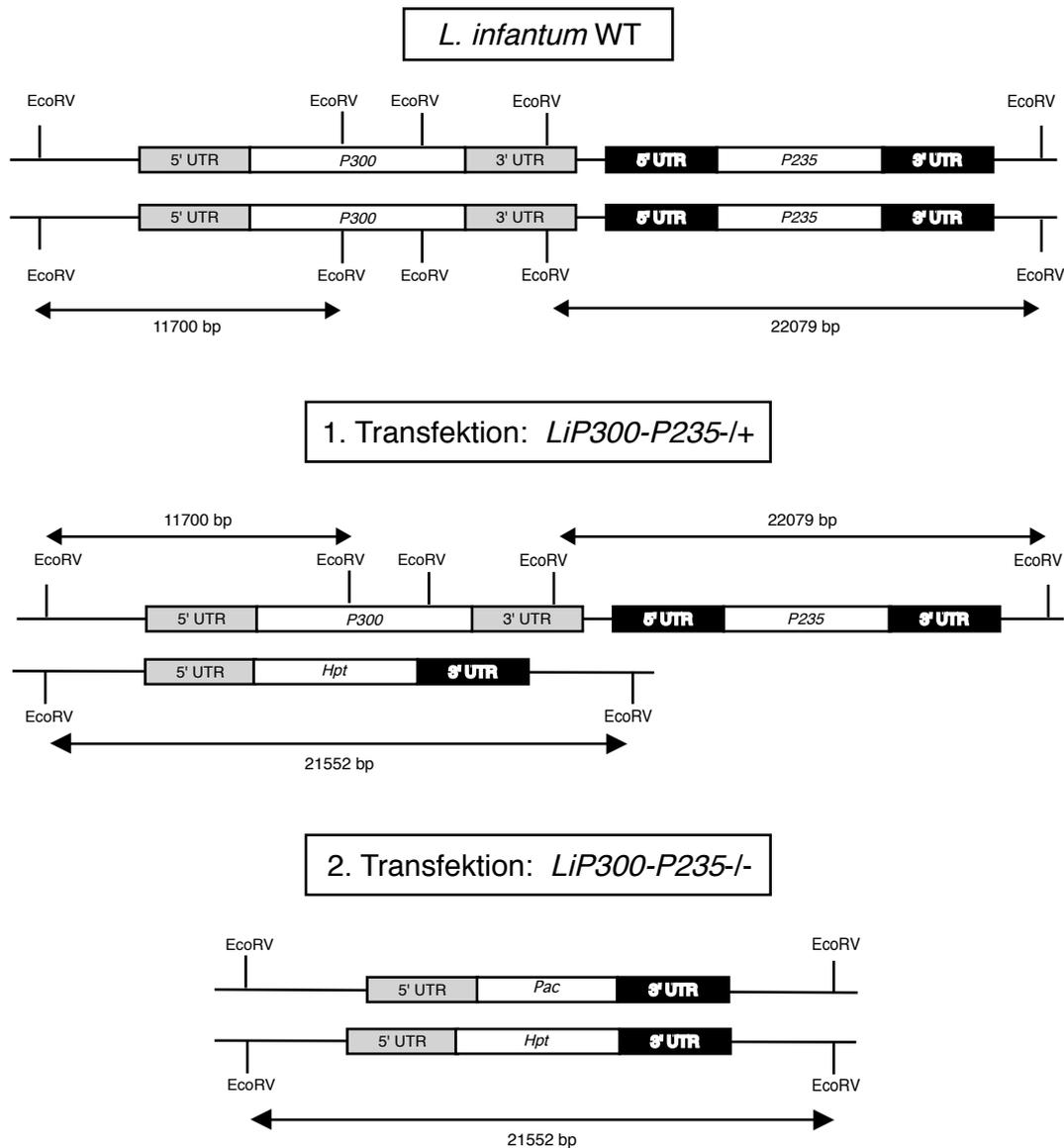


Abbildung 30: Restriktionskarte des P300- und P235-Genlocus in *Li* WT und den Deletionsmutanten

UTR = untranslatierte Region; *Pac* = Puromycinphosphotransferase; *Hpt* = Hygromycin Phosphotransferase

Der P300- und P235-Genlocus in *Li* WT, *LiP300-P235*^{-/+} und *LiP300-P235*^{-/-} ist schematisch dargestellt. Die im Bereich beider Gene vorkommenden *EcoRV*-Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die Fragmente, die bei Hybridisierung mit den entsprechenden Sonden nachweisbar sind. Die Größen dieser Fragmente sind unter- bzw. oberhalb der Pfeile in [bp] angegeben.

Dies wurde durch die nächste *Southern Blot*-Analyse bestätigt (Abb. 29B). *Li* WT und *LiP300-P235*^{-/+}-Kl.4 besitzen kein *Pac*-Gen, weshalb keine Hybridisierung mit der *Pac*-Sonde stattfinden konnte. Folglich sind im Autoradiogramm auch keine Signale zu erkennen. Da erst in der zweiten Transfektionsrunde das *Pac*-Konstrukt verwendet wurde, reagierte die

Pac-Sonde bei *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 mit einem DNA-Fragment in der erwarteten Größe (21552 bp) (Bahn 3). Diese Bande entspricht in ihrer Größe der von der 5'-*P300*-UTR-Sonde markierten Bande bei *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 (Abb. 29A, Bahn 3). Dies deutet ebenfalls auf eine Integration des *Pac*-Konstrukts in den *P300*-Genloкус hin. Die Interpretation der Signale, die im Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der 3'-*P235*-UTR-Sonde zu erkennen sind, erweist sich als schwieriger (Abb. 29C). Die Größe der DNA-Fragmente, die mit der 3'-*P235*-UTR-Sonde hybridisieren können, sind bei *Li* WT (22079 bp) und den Deletionsmutanten (21552 bp) nahezu gleich. Die Banden können bei der angewandten Auftrennung nicht deutlich voneinander unterschieden werden. Wie erwartet, erscheinen die Signale bei *Li* WT, *LiP300-P235*^{+/-}-Kl.4 und *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 in derselben Höhe (22079 bp bzw. 21552 bp). Bei der *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2-DNA scheint die markierte Bande etwas schneller zu wandern, was auf ein 21552 bp Produkt hinweist (Bahn 3). Überraschenderweise hybridisierten noch weitere DNA-Fragmente (Signale bei ca. 7000 bp und bei ca. 2000 bp) mit der 3'-*P235*-UTR-Sonde. Wie aus der Restriktionskarte (Abb. 30) ersichtlich wird, können diese zusätzlichen DNA-Fragmente nicht aus einem *EcoRV*-Verdau des ursprünglichen *P300*- und *P235*-Genloкус stammen. Leishmanien besitzen eine hohe genomische Plastizität, und Rekombinations-Ereignisse kommen häufig vor (Cruz A., 1993). Das *P235*-Gen könnte nach Duplikation in eine unbekannte Stelle im Genom rekombiniert haben. Aus dem Ergebnis der PCR-Kontrolle (Abb. 28B) wurde bereits der Schluss gezogen, dass ein *P235*-Allel im Genom von *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 vorhanden sein muss. Das Ergebnis der *Southern Blot*-Analyse bestätigt diese Schlussfolgerung. Eine Rekombination des *P235*-Gens würde erklären, weshalb sich das *P235*-spezifische Amplifikat für *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 noch nachweisen lässt (Abb. 28B).

Die Ergebnisse der *Southern Blot*-Analysen und der PCR-Kontrollen zeigten, dass lediglich der Austausch des *P300*-Gens, jedoch nicht des *P235*-Gens, erreicht wurde. Demnach handelt es sich bei der *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2-Mutante faktisch um eine *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante. Aus diesem Grund wird *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2 in den folgenden Kapiteln als *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante bezeichnet.

3.8 Untersuchung der chromosomalen Lokalisation des *P300*-Gens

Wie in 3.7.1 bereits erwähnt, wurde der Versuch unternommen *P300*- bzw. *P235*-Deletionsmutanten herzustellen. Trotz mehrfacher Versuche unter verschiedenen Transfektionsbedingungen ist dies nicht gelungen. Mittels PCR wurde aus doppelt Antibiotika-resistenten Promastigoten stets *P300*- bzw. *P235*-spezifische Amplifikate erhalten. In *Southern Blot*-Analysen zeigten die putativen *LiP300*^{-/-}- und *LiP235*^{-/-}-Deletionsmutanten

stets ein Signal für das WT-Allel. Diese Erfahrungen deuten darauf hin, dass im Genom von *Li* WT wider Erwarten weitere *P300*- und *P235*-Allele vorhanden sein müssen. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den Informationen aus den ersten Datenbank-Recherchen (3.7.1) und dem Ergebnis der in Abbildung 25 dargestellten *Southern Blot*-Analyse, aufgrund dessen beide Gene als *single copy*-Gene charakterisiert wurden. Um diesen Widerspruch zu klären, wurde eine Überprüfung der chromosomalen Lokalisation des *P300*-Gens in *Li* WT und weiteren *Leishmania*-Stämmen durchgeführt. Für die Gewinnung chromosomaler DNA wurden Promastigoten in Agarose-Blöcke eingebettet (2.2.2.19.1). Die Freisetzung der genomischen DNA erfolgte durch Verdau der eingebetteten Leishmanien mit Proteinase K. Die Chromosomen wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE; 2.2.2.19) aufgetrennt. Das *Leishmania*-Genom besteht aus ~36 Chromosomen, die eine Größe von 0,35 bis ~ 3 Mb besitzen (Wincker P., 1996). Für die Auftrennung wurden Bedingungen gewählt, die eine Auflösung der DNA-Längenstandards im Größenbereich von 49 kb - 2500 kb ermöglichte (Biometra, Rotaphor Typ V, Bedienungsanleitung, 1992). Anschließend wurde eine *Southern Blot*-Analyse unter Verwendung der *P300*-Sonde durchgeführt. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis.

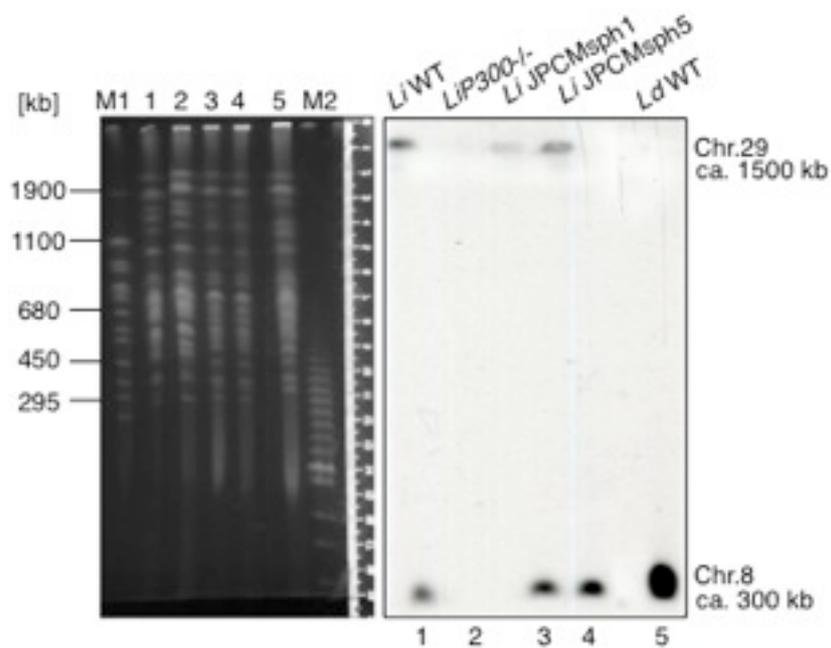


Abbildung 31: Untersuchung der chromosomalen Lokalisation des *P300*-Gens durch Pulsfeldgelelektrophorese und nachfolgender *Southern Blot*-Analyse

Die Chromosomen von den zu untersuchenden *Leishmania*-Stämmen wurden in einem 1%igem Agarosegel mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P -markierten *P300*-Sonde hybridisiert. Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Pulsfeldgel und den entsprechenden *Southern Blot*. Der Hefe Chromosomen Marker wurde in Bahn M1 aufgetragen. Die Größen des Markers sind links in [kb] angegeben. Bahn M2 wurde mit dem *low range* PFG Marker beladen. Das abgebildete Lineal ermöglichte die Zuordnung der Banden des Autoradiogramms.

Bei *Li* WT sind deutlich zwei Signale in unterschiedlicher Größe zu erkennen (Bahn 1). Die *P300*-Sonde reagierte mit zwei verschiedenen Chromosomen; demnach muss im Genom von *Li* WT mehr als nur ein *P300*-Genlocus vorhanden sein. Bei der *LiP300*^{-/-}-Mutante dagegen sind keine Signale festzustellen (Bahn 2). Es fand somit keine Hybridisierung der Chromosomen mit der *P300*-Sonde statt. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der PCR-Kontrolle (3.7.3) und der *Southern Blot*-Analyse (3.7.4), nachdem kein *P300*-Allel in der *LiP300*^{-/-}-Mutante mehr vorhanden ist. Die in Bahn 3 und 4 analysierten *L. infantum*-Stämme (MCAN/ES/98/LLM-877 JPCM5, Klon sp1h und Klon sp5h) wurden für die Erstellung der *L. infantum*-Datenbank verwendet. Wie man aus Abb. 31 erkennen kann, sind ebenfalls zwei *P300*-Genloci im Genom dieser beiden Stämme vorhanden (Bahn 3 und 4). Der untersuchte *L. donovani*-Stamm dagegen zeigt nur ein, für *P300* positives Chromosomen-Signal (Bahn 5).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die *L. infantum*-Datenbank nochmals hinsichtlich der Kopienzahl des *P300*- und *P235*-Gens überprüft. Die jüngsten Recherchen ergaben tatsächlich, dass in *L. infantum* jeweils zwei Kopien beider Gene existieren, die auf Chromosom 8 und Chromosom 29 lokalisiert sind (Tab. 3). Die Größe der Signale im Autoradiogramm stimmt mit der Größe von Chromosom 8 (288 kb) und Chromosom 29 (1568 kb) überein (*L. infantum Gene Database*). Es wurde ein Vergleich der angrenzenden Sequenzen des *P300*- und *P235*-Gens zwischen Chromosom 8 und Chromosom 29 von *L. infantum* durchgeführt. Diese Analyse führte zu dem Schluss, dass eine Duplikation eines ca. 41 kb großen DNA-Abschnitts von Chromosom 8 in Chromosom 29 stattgefunden haben muss (Abb. 32). Die Enden dieses duplizierten DNA-Abschnitts bestehen aus einer 140 bp *repeat*-Sequenz. Neben dem *P300*- und *P235*-ORF sind noch drei weitere putative offene Leseraster auf diesem Chromosomenstück lokalisiert. Bis auf ca. 11000 bp am 3'-Ende, entspricht die duplizierte Region der *insert*-Sequenz des Cosmids pcosM2. Da es nicht nur zur Verdopplung des *P300*-ORFs gekommen ist, sondern auch zur Duplikation der benachbarten Sequenzen, konnten die Genloci in der *Southern Blot*-Analyse, die zur Bestimmung der *P300*-Genkopiezahl durchgeführt wurde (3.7.1, Abb. 25), nicht unterschieden werden. Die PFGE-Analyse zeigte nunmehr, dass zwei Genloci von *P300* im Genom von *Li* WT vorhanden sind. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den jüngsten Ergebnissen der Datenbank-Recherchen.

Obwohl mehr als eine *P300*-Kopie in *Li* WT vorhanden war, konnten in zwei aufeinander folgenden Transfektionen alle *P300*-Kopien deletiert werden. Dies wurde durch die PFGE-Analyse bestätigt. Damit ist es gelungen, eine *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante herzustellen. Für das *P235*-Gen werden ebenfalls zwei Kopien in *L. infantum* vorausgesagt. Eine experimentelle Überprüfung der chromosomalen Lokalisation von *P235* fand nicht mehr statt.

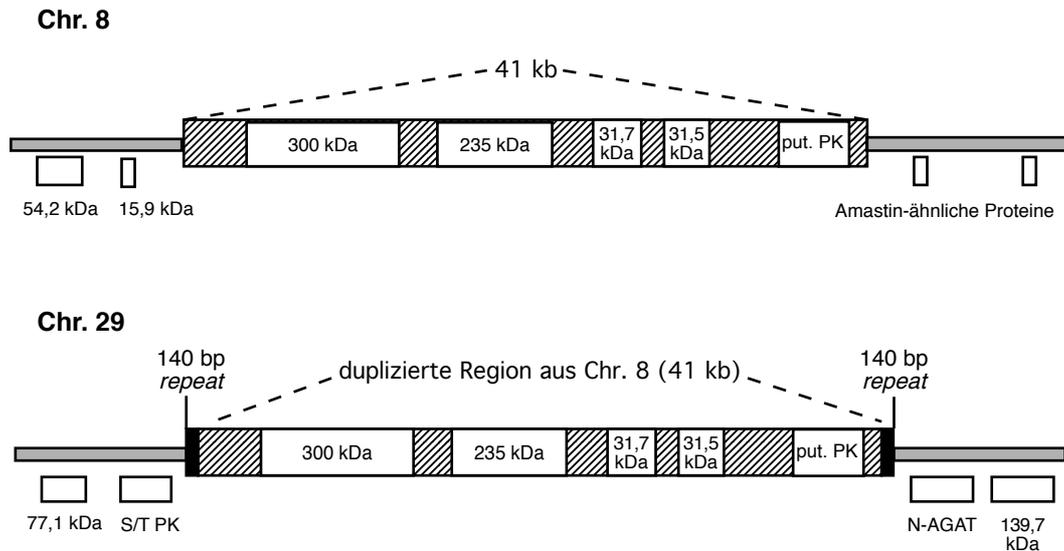


Abbildung 32: Schematische Darstellung der duplizierten Region auf Chromosom 8 und Chromosom 29

S/T PK = Serin/Threonin Proteinkinase; put. PK = putative Proteinkinase; N-AGAT = N-acetylgalactosaminyltransferase

Die Abbildung zeigt die benachbarten offenen Leserahmen von *P300* und *P235* auf Chromosom 8 und Chromosom 29 in *L. infantum*. Die Kästchen symbolisieren die putativen offenen Leserahmen und die Molekulargewichte der hypothetischen Proteine sind in [kDa] angegeben. Der duplizierte Chromosomen-Abschnitt ist hervorgehoben dargestellt.

3.9 Charakterisierung der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante

3.9.1 Morphologie der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten

Es folgte die Charakterisierung der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante. Zunächst wurde die Gestalt der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten untersucht. Lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Deletion von *P300* zu keinen offensichtlichen morphologischen Veränderungen in Promastigoten führt. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Größe, Form und Flagellenlänge zwischen den *LiP300*^{-/-} und den *Li* WT-Promastigoten festgestellt werden.

3.9.2 Erhöhte Miltefosin-Sensitivität der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten

In den vorangegangenen Experimenten konnte durch die Überexpression von *P300* Miltefosin- und SbIII-Resistenz in Promastigoten vermittelt werden. Es wurde angenommen, dass die Deletion des *P300*-Gens zu einer verminderten Miltefosin- bzw. SbIII-Resistenz der Promastigoten führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Effekte von Miltefosin und SbIII auf die Vermehrung der *LiP300*^{-/-}-Mutante untersucht. Damit gleichzeitig die Rückführung des *P300*-Gens in die *LiP300*^{-/-}-Mutante untersucht werden konnte, wurden zuvor promastigote *LiP300*^{-/-}-Zellen mit dem Cosmid *pcosP300* und dem Cosmid-Vektor *pcosTL* transfiziert. *Li* WT, *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-} [*pcosTL*] und *LiP300*^{-/-} [*pcosP300*] wurden jeweils auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Miltefosin bzw. SbIII für drei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellzahlen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 A und B dokumentiert. Schon bei einer Miltefosin-Konzentration von $15 \mu\text{M}$ werden *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [*pcosTL*]-Zellen deutlich in ihrer Vermehrung beeinträchtigt (Abb. 33A), bis sie schließlich bei einer Miltefosin-Konzentration von $25 \mu\text{M}$ vollständig in ihrem Wachstum gehemmt werden. In diesen beiden Zelllinien ist kein *P300* mehr vorhanden. Bei *Li* WT und *LiP300*^{-/-} [*pcosP300*] ist bei dieser Miltefosin-Konzentration ($25 \mu\text{M}$) dagegen kaum eine Abnahme des Wachstums zu beobachten. Die *LiP300*^{-/-} [*pcosP300*]-Promastigoten zeigen über den gesamten Konzentrationsbereich ein ähnliches Wachstum wie *Li* WT. Aus diesem Experiment lässt sich der Schluss ziehen, dass eine Deletion des *P300*-Gens zu einer erhöhten Miltefosin-Sensitivität in Promastigoten führt. Durch die episomale Rückführung des Gens in die Deletionsmutante kann dieser Phänotyp aufgehoben werden, und es kommt zur Rekonstitution des Wildtyp-Phänotyps.

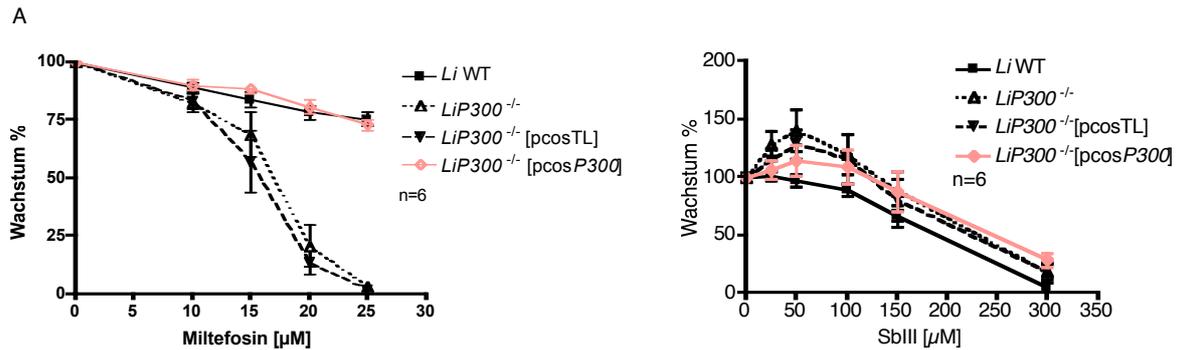


Abbildung 33: Effekt von Miltefosin und SbIII auf die Vermehrung der *LiP300*^{-/-} Deletionsmutante

Promastigote Leishmanien wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Miltefosin (A) bzw. SbIII (B) für drei Tage kultiviert. Nachfolgend wurden die Zelldichten mit Hilfe des CASY-Cellcounter & Analyzer ermittelt. Die dargestellten Mittelwerte ergeben sich aus sechs unabhängig durchgeführten Experimenten.

Dieses Experiment wurde analog für die Überprüfung der SbIII-Sensitivität der *LiP300*^{-/-} Mutante durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 33 B. *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-} [pcosTL] und *LiP300*^{-/-} [pcosP300] zeigen ein leicht erhöhtes Wachstum bei niedrigen SbIII-Konzentrationen. Bei hohen SbIII-Konzentrationen gleicht sich das Wachstum jedoch wieder dem Wachstum des *Li* WT an. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Die Deletion des P300-Gens hat in *L. infantum* keinen Einfluss auf die SbIII-Toleranz. Auch die Rückführung des Gens in *LiP300*^{-/-} hatte keinen Effekt auf die Vermehrung in Gegenwart von SbIII.

Unter Anwendung der semi-quantitativen *real time* RT-PCR erfolgte die Ermittlung der P300-Genexpression in *Li* WT, *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-}[pcosP300], die in Abbildung 34 dargestellt ist. Es ist keine P300-Expression mehr in *LiP300*^{-/-} zu erkennen. Dieses Ergebnis bestätigt weiterhin, die erfolgreiche Deletion von P300. Die episodale Rückführung des P300-Gens führt wieder zur dessen Expression, die im Vergleich zu *Li* WT um 1,5-fach erhöht ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die erhöhte Miltefosin-Sensitivität von *LiP300*^{-/-} mit einem Verlust der P300-Genexpression einhergeht.

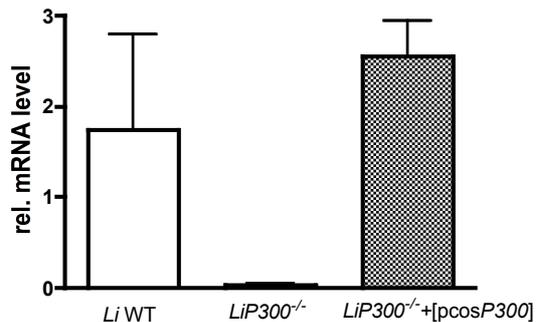


Abbildung 34: P300-Genexpression von *Li* WT, *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [pcosP300]

Der P300-mRNA Level von *Li* WT, *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [pcosP300] wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR (2.2.2.15) bestimmt.

3.9.3 Verlangsamtes Wachstum von *LiP300*^{-/-}-Promastigoten bei hohen Zelldichten

Das Wachstum von *LiP300*^{-/-}-Promastigoten unter axenischen Kulturbedingungen wurde untersucht. *Li* WT, *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-} [pcosTL] und *LiP300*^{-/-} [pcosP300] wurden jeweils auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und für 72 h kultiviert. Die Zelldichten wurden alle 24 h bestimmt. Abbildung 35 zeigt die Wachstumsverläufe der untersuchten Zelllinien. Nach 48 h ist bereits ein geringer Unterschied in den Wachstumsraten der Promastigoten zu erkennen, der nach 72 h noch größer wird. Die Teilungsraten von *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [pcosTL] sind in der spät-logarithmischen Wachstumsphase deutlich geringer als die Teilungsrate von *Li* WT. Die Transfektion des Cosmids pcosP300 in *LiP300*^{-/-}-Promastigoten führt zu einer Steigerung der Teilungsrate (*LiP300*^{-/-} [pcosP300]); diese blieb jedoch immer unter der des Wildtyps.

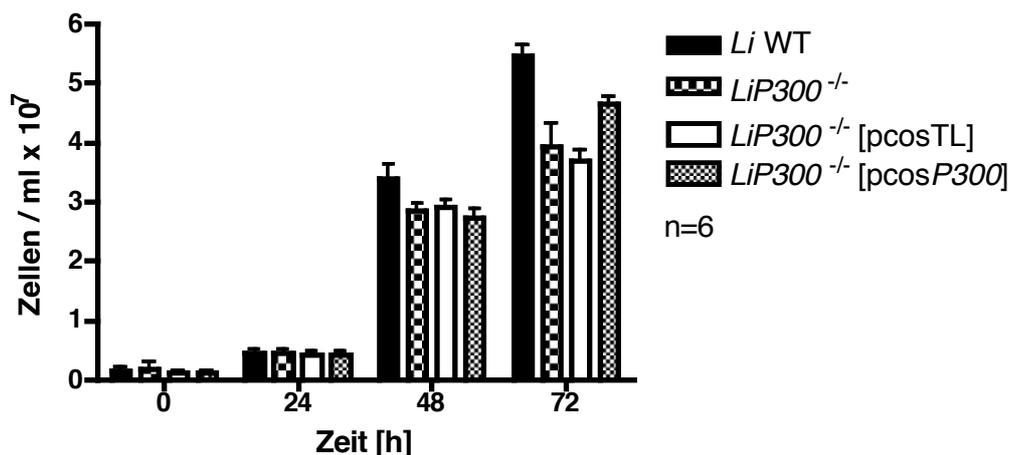


Abbildung 35: Wachstumsanalyse der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante

Li WT-, *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-} [pcosTL]- und *LiP300*^{-/-} [pcosP300]-Promastigoten wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und für 72 h kultiviert. Dabei fand alle 24 h die Bestimmung der Zellzahlen statt. Jeder Wert repräsentiert den Durchschnitt von sechs unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Auch nach achtmonatiger Kultivierung der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante war dieser Phänotyp noch zu beobachten. Somit handelt es sich um einen stabilen Phänotyp der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante. Die Deletion des P300-Gens in *L. infantum* führt zu einem verlangsamten *in vitro*-Wachstum bei hohen Zelldichten.

3.9.4 Höhere Wachstumsrate der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten in konditioniertem Medium

Aus dem Ergebnis des vorangegangenen Experiments könnte der Schluss gezogen werden, dass Promastigoten, die das P300-Gen besitzen, einen Vorteil bei der Vermehrung in der spät-logarithmischen Wachstumsphase haben. Diese Wachstumsphase ist gekennzeichnet durch hohe Zelldichten, die zur Anreicherung von Stoffwechsel-Endprodukten im Kultivierungsmedium (=konditioniertes Medium) führen. Die Vermehrung der Parasiten wird durch diese ungünstigen Bedingungen beeinträchtigt. Im Folgenden wurde das Wachstum der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten in konditioniertem Medium untersucht. Hierfür wurde Kultivierungsmedium von *Li* WT-Promastigoten, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, verwendet. *Li* WT, *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-} [pcosTL] und *LiP300*^{-/-} [pcosP300] wurden für drei Tage in konditioniertem Medium kultiviert. Dabei wurden alle 24 h die Zellzahlen ermittelt. Das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 36 A dargestellt. Die Zelldichte von *Li* WT bleibt auch nach 72 h Wachstum in konditioniertem Medium unter 5×10^6 Z/ml. Dagegen erreichen *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [pcosTL] doppelt so hohe Zelldichten ($8-9 \times 10^6$ Z/ml) wie *Li* WT. Auch die Wachstumsrate von *LiP300*^{-/-} [pcosP300] (6×10^6 Z/ml) ist im Vergleich zu *LiP300*^{-/-} und *LiP300*^{-/-} [pcosTL] deutlich niedriger. Die Deletion des P300-Gens in *L. infantum* führt offensichtlich zu einer erhöhten Teilungsrate der Promastigoten in konditioniertem Medium.

Parallel wurden die Wachstumsraten von *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300] in konditioniertem Medium bestimmt. Wie aus Abbildung 36 B ersichtlich wird, liegen die Wachstumsraten der rekombinanten Promastigoten zu jedem Zeitpunkt unter der Teilungsrate von *Li* [pcosTL]. Die Erhöhung der P300-Kopiezahl führt demnach zu einer Beeinträchtigung des Wachstums in konditioniertem Medium. In beiden Experimenten war die Wachstumsrate der Zelllinie, die mit dem Cosmid-Vektor transfiziert wurde (*Li* [pcosTL] und *LiP300*^{-/-} [pcosTL]), am höchsten.

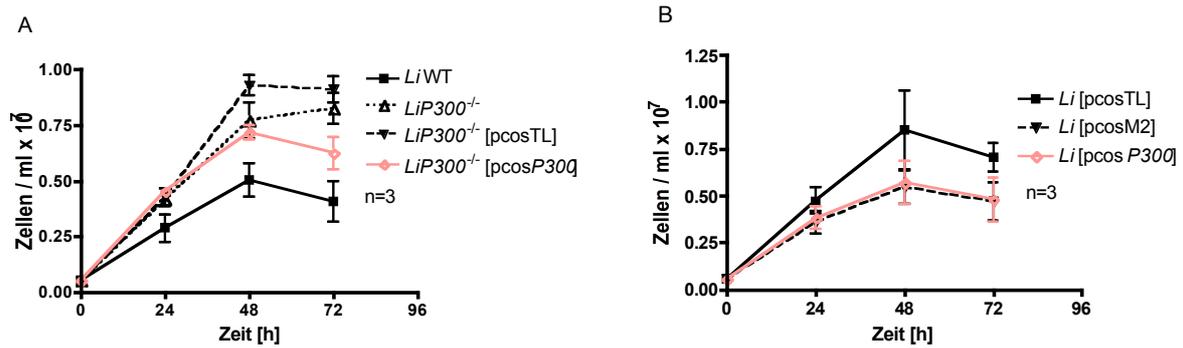


Abbildung 36: Vermehrung der *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante und der rekombinanten Leishmanien in konditioniertem Medium

(A) *Li* WT-, *LiP300*^{-/-}-, *LiP300*^{-/-} [pcosTL]- und *LiP300*^{-/-} [pcosP300]- Promastigoten wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/ml eingestellt und für drei Tage in konditioniertem Medium kultiviert. Die Zelldichten wurden mit Hilfe des CASY-Cellcounter & Analyzer alle 24 Stunden ermittelt. Die Grafik stellt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten dar.

(B) Das in (A) beschriebene Experiment wurde analog für *Li* [pcosTL], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosP300] ebenfalls drei Mal unabhängig durchgeführt.

3.9.5 Makrophagen-Infektion der *LiP300*^{-/-}-Promastigoten

Als letztes wurde die *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante auf mögliche Veränderungen bezüglich der Infektiosität überprüft. Es wurden *in vitro*-Infektionen von J774-1 Makrophagen mit *Li* WT, *LiP300*^{-/-}, *LiP300*^{-/-}[pcosTL] und *LiP300*^{-/-} [pcosP300] durchgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und nach Giemsa gefärbt. Es folgte die mikroskopische Auswertung. Die Anzahl der infizierten Makrophagen wurde bestimmt, indem pro Ansatz 50 Makrophagen untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 A-C dargestellt. Es sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Infektiosität der Zelllinien zu erkennen (Abb. 37A). Zusätzlich wurde das Verhältnis von intrazellulären Amastigoten zu Makrophage für 50 infizierte Makrophagen ermittelt (Abb. 37B). Auch hier sind nur geringe Unterschiede bezüglich der Anzahl der Leishmanien pro Makrophage festzustellen. Diese Daten zeigen, dass die Deletion des P300-Gens nicht zu einer veränderten *in vitro*-Infektiosität der Promastigoten führt.

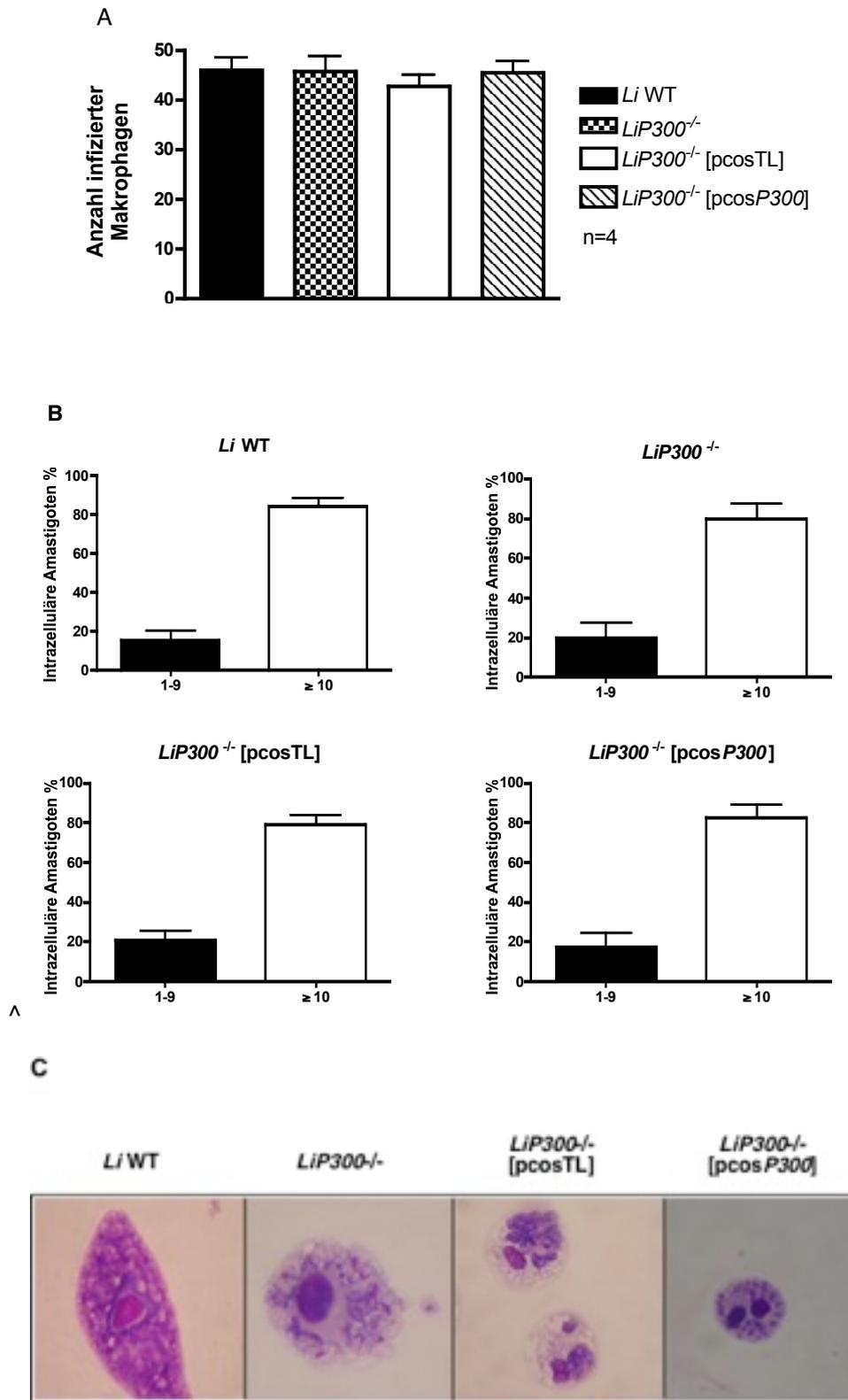


Abbildung 37: Untersuchung der *in vitro*-Infektiösität

J774-1 Makrophagen wurden im Verhältnis 1:10 mit promastigoten Zellen infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, nach Giemsa gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Von 50 Makrophagen wurde die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt (A). Von 50 infizierten Makrophagen wurde die Zahl der intrazellulären Leishmanien ermittelt (B). Giemsa-Färbung nach 24 h *in vitro*-Infektion (C).

4. Diskussion

Miltefosin ist ein neues Medikament zur Behandlung von viszeraler Leishmaniase (VL), dessen Wirkungs- und Resistenzmechanismen nur unzureichend bekannt sind. Die zunehmende Resistenzentwicklung in *Leishmania* stellt ein immer größeres Problem bei der erfolgreichen Therapie von VL dar. Mit Hilfe von molekularen Resistenzmarkern können Resistenzentwicklungen und -veränderungen verfolgt und überwacht werden. Dadurch können u.a. Prognosen über wirksame Therapien in einem bestimmten Endemie-Gebiet gemacht werden (Bryceson, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher molekulare Miltefosin-Resistenzmarker identifiziert werden. Durch Anwendung funktioneller Komplementations-Genetik ist es gelungen, ein Miltefosin- und Antimon-Resistenz vermittelndes Gen aus *L. infantum* zu isolieren.

4.1 Funktionelle Komplementation als Strategie zur Identifizierung von Miltefosin-Resistenzmarkern

Wie einleitend erwähnt, wurde die funktionelle Komplementation für die Identifizierung von Genen in *Leishmania* bereits mehrfach erfolgreich angewandt (Descoteaux A., 1995; Ryan K.A., 1993). Dieser *forward genetics* Ansatz besitzt, im Gegensatz zur reversen Genetik, den Vorteil, dass nichts über die Eigenschaften der putativen Gene bekannt sein muss, und alle Gene unvoreingenommen in die Untersuchung mit einbezogen werden. Deshalb können Gene identifiziert werden, die noch unbekannt sind, oder bislang nicht mit Ausbildung des Phänotyps in Verbindung gebracht wurden (Descoteaux A., 2002).

Derzeit sind nur wenige molekulare Determinanten der Miltefosin-Resistenz bekannt (1.6.2). Hierzu zählt *LdMT*, welches für die Miltefosin-Translokase kodiert (Perez-Victoria F.J., 2003b) (Perez-Victoria F.J., 2006). Die Identifizierung von *LdMT* erfolgte durch Komplementierung einer Miltefosin-resistenten Mutante, und der damit verbundenen Wiederherstellung des WT-Phänotyps. Diese Studie zeigt, wie spontane Chemoresistenz mit funktioneller Komplementation verbunden werden kann (Perez-Victoria F.J., 2003b). Die Miltefosin-Resistenz der Parasiten beruht auf Punktmutationen im *LdMT*-Gen und ist somit ein rezessives Merkmal.

In unserem Ansatz wurde dagegen durch Komplementierung des WT eine Miltefosin-resistente Mutante erzeugt. Die Resistenz basiert auf das Einbringen eines funktionell

aktiven Gens, dessen Überexpression zum gewünschten Phänotyp führt. Unterschiedliche Ansätze der funktionellen Komplementation führten somit zur Identifizierung verschiedener Gene; des *LdMT*, dessen Überexpression zur Miltefosin-Sensitivität führt, und in unserem Fall des *P300*, dessen Überexpression Miltefosin-Resistenz vermittelt.

In dieser Arbeit wurden auch keine bekannten Miltefosin-Resistenzmarker, wie das *MDR1*-Gen und *HSP83* isoliert, deren Überexpression zur Kreuzresistenz gegenüber Miltefosin beitragen (Perez-Victoria J.M., 2001; Vergnes B., 2007). Dabei muss beachtet werden, dass die *LtMDR1*- und *HSP83*-überexprimierenden Stämme auf Daunomycin- bzw. Antimon-Resistenz selektiert wurden, und nicht primär auf Miltefosin-Resistenz. Weiterhin handelt sich nicht um *L. infantum*, sondern um einen *L. tropica*- bzw. einen *L. donovani*-Stamm. *Leishmania* ssp. variieren stark in ihrer intrinsischen Toleranz gegenüber Miltefosin (Escobar P., 2002). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Leishmania* ssp. unterschiedliche Mechanismen der Miltefosin-Resistenz ausbilden, und dass die Überexpression von *MDR1* bzw. *HSP83* in dem hier verwendeten *L. infantum* Stamm nur eine untergeordnete Rolle in der Ausbildung von Miltefosin-Resistenz spielen, und deswegen nicht isoliert wurden.

Studien zur Methotrexat (Antifolat)-Resistenz in *L. major* zeigten, dass die extrachromosomale Amplifikation der Dihydrofolat Reduktase-Thymidylat Synthase (DHFR-TS) zur Resistenz führt (Ellenberger T.E., 1987). In Methotrexat-resistenten *L. donovani*, *L. tarentolae* und *L. mexicana amazonensis* Zellen konnte dagegen keine Amplifikation von DHFR-TS festgestellt werden (Kaur K., 1988; Scott D.A., 1987).

Leishmania ssp. können sich biochemisch sehr voneinander unterscheiden, was sich auch in den unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Zytostatika, und in den verschiedenen Krankheitsformen, die sie auslösen, widerspiegelt.

In Leishmanien ist die Amplifikation von Genen ein häufig beobachteter Mechanismus der *in vitro* Resistenzbildung. Extrachromosomal amplifizierte DNA kann 10% der gesamten zellulären DNA ausmachen. Amplifizierte Gene liegen demnach in sehr hohen Kopienzahlen vor (Beverley S.M., 1991). Die Kreuzresistenzen gegenüber Miltefosin basieren auf der extrachromosomalen Amplifikation von *LtMDR1* bzw. *HSP83* (Chiquero M.J., 1998; Vergnes B., 2007). Obwohl in unserem Ansatz die Gene, und somit auch *MDR1* und *HSP83*, ebenfalls in einem extrachromosomalen Cosmidvektor (*pcosTL*) vorliegen, ist die beobachtete, ca. 6-fache Überexpression, im Vergleich zur spontanen Amplifikation, dennoch geringer (Wiesgigl M., 2001) und könnte zu gering sein, um Miltefosin-Resistenz zu vermitteln. Dies könnte erklären, weshalb *MDR1* und *HSP83* in unsrem Ansatz nicht isoliert

wurden. Die Beobachtung, dass die Überexpression von Genen von episomalen Cosmidvektoren geringere Resistenz hervorrufen als spontane Amplifikation ist bereits häufiger beschrieben (Martina Wiesgigl, unveröffentlichte Ergebnisse; (Haimeur A., 1998). Die Langzeitkultivierung von *L. donovani* WT unter Geldanamycin führte zur Amplifikation von *HSP83*, und damit zur Resistenz gegenüber diesem Zytostatikum (Wiesgigl M., 2001). Die Resistenz war um den Faktor 16 erhöht. Die Überexpression von *HSP83*, durch episomale Transfektion in *L. donovani* WT konnte lediglich zu einer zwei- bis drei-fachen Steigerung der Toleranz beitragen (Martina Wiesgigl, unveröffentlichte Daten). Dies zeigt, dass die Cosmid-vermittelte Geldanamycin-Resistenz von *HSP83* nicht vergleichbar ist mit einer Resistenz durch spontane, episomale Amplifikation des *HSP83*-Genorts.

Die oben beschriebenen Studien zeigen, dass die Miltefosin-Resistenz bzw. Sensitivität in *Leishmania* von verschiedenen Faktoren/Proteinen (*multifactorial feature*) bestimmt wird, und dass möglicherweise mehrere unterschiedliche Mechanismen zur Resistenz beitragen können.

4.2 Methodische Aspekte der Selektion und Identifizierung von Miltefosin-Resistenz vermittelnden Genen

Die Selektion von chemoresistenten Leishmanien erfolgt üblicherweise durch Kultivierung der Zellen unter subletalen Konzentrationen und schrittweiser Erhöhung der Zytostatika-Konzentration (Borst P., 1995; Seifert K., 2003). Dabei wird in einer definierten klonalen Population auf Resistenz aufgrund von Mutationen selektiert. Eine solche *escape*-Population kann anschließend mit dem entsprechenden sensitiven Klon verglichen werden (Ouellette M., 2001). In mehreren, auf diese Weise selektierten Methotrexat (Antifolat)-resistenten *Leishmania*-Zelllinien wurden Mutationen in einem spezifischen Folat-Transporter identifiziert (Ellenberger T.E., 1987). Wie bereits erwähnt, ist der häufigste *in vitro* Resistenzmechanismus in *Leishmania* die Amplifikation von Genen, deren Überexpression den Zellen Resistenz verleiht (Beverley S.M., 1991; Segovia M., 1994). Diese extrachromosomalen, sogenannten *amplicons* liegen zirkulär oder auch linear in der Zelle vor, und wurden in vielen selektierten chemoresistenten Zelllinien gefunden (Beverley S.M., 1991; Borst P., 1995; Haimeur A., 1998; Segovia M., 1994; Wiesgigl M., 2001). Unter anderem wurden Zelllinien beschrieben, die neben *amplicons* auch chromosomal lokalisierte Mutationen aufwiesen (Beverley S.M., 1991; Haimeur A., 1998; Singh A.K., 2001). Genetische Variationen können die Charakterisierung der resistenten Mutante, und die Identifizierung der verantwortlichen Gene erheblich erschweren.

Die Selektion von resistenten Populationen in dieser Arbeit beruht dagegen auf der Überexpression von Genen, die sich auf den Cosmiden befinden.

Dadurch ist es in relativ kurzer Zeit gelungen, Cosmide in *L. infantum* zu selektieren, die Miltefosin-Resistenz vermitteln. Von Beginn an wurde ein hoher Selektionsdruck (IC_{95}) ausgeübt, so dass rekombinanten Parasiten nicht die Möglichkeit gegeben wurde, sich durch Mutation in Genom der veränderten Situation anzupassen. Nur die Überexpression von Genen, die sich auf bestimmten Cosmiden befanden, sollte rekombinanten Leishmanien ermöglichen die Selektion zu überleben und zu proliferieren. Die geringe Anzahl von Cosmidtypen, die nach der ersten Selektion isoliert wurden, zeigt, dass der Selektionsdruck stark war, so dass nur Parasiten mit bestimmten Cosmid-Spezies die Selektion überlebten (Abb.3).

Da die Cosmide ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen besitzen, welches Resistenz gegenüber G418 überträgt (2.1.9), konnte eine Doppelselektion mit Miltefosin durchgeführt werden. Dies sollte die Selektion auf etwaige spontane Miltefosin-Resistenzen weiter verringern. Damit Leishmanien eine Selektion mit G418 und Miltefosin ohne Cosmid überleben, müsste eine Mutation(en) in Genom auftreten, die zur Doppelresistenz führt. Da nur ca. jede 4000ste Zelle erfolgreich transfiziert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige, spontane Doppelresistenz äußerst gering.

Bei Selektionen unter axenischen Kulturbedingungen kann es auch zur Selektion von Zellen kommen, die sich durch ein besseres *in vitro* Wachstum auszeichnen (Clos J., 2006). Leishmanien, die Resistenz-vermittelnde Cosmide tragen, können durch schneller wachsende *survivor* Populationen ‚ausverdünnt‘ werden (Hoyer C., 2004). Um dieser ungewollten Selektion zuvorzukommen, wurde die Selektionsdauer so kurz wie möglich gehalten. Sobald die Kontrolle kein Wachstum mehr im Vergleich zu den rekombinanten Parasiten zeigte, wurde die Selektion beendet, und es erfolgte die Isolation der Cosmide. Die DNA-Degradationsanalyse, die Untersuchung der Morphologie, und die annähernd gleichen Wachstumsraten von *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2], *Li* [pcosP300] und *Li* [pcosTL] bestätigen, dass die selektierten Cosmide nicht zu erhöhten Teilungsraten der Zellen führen (Abb. 6 + 8 + 15). Der geringe Unterschied zwischen *Li* [pcosTL] und den rekombinanten Parasiten ist hier zu vernachlässigen. Des weiteren kann durch eine kurze Selektionsdauer auch die Bildung von ungewollten, spontanen *amplicons* verhindert werden.

Die Suche nach den molekularen Besonderheiten in *escape*-Mutanten, die mit der Resistenz korrelieren, ist zumeist mit einem erheblichen Aufwand verbunden, und kann – sprichwörtlich

- zur Suche "nach der Stecknadel im Heuhaufen" werden. Molekulare Unterschiede zwischen resistenten und den entsprechenden sensitiven Zellen können durch Karyotyp-Analyse, z.B. zur Identifizierung von *amplicons* (Pulsfeld-Gelelektrophorese; PFGE), durch Analyse des Transkriptoms (RNA *microarrays*) und des Proteoms (2D-Gelelektrophorese) untersucht werden. Diese Methoden sind zeit- und arbeitsaufwändig (Clos J., 2006). In einem Miltefosin-resistenten *L. donovani*-Stamm, konnte weder Genamplifikation noch Überexpression von P-Glykoproteinen nachgewiesen werden (Seifert K., 2003). Erst die aufwändige Untersuchung der intrazellulären Miltefosin-Konzentration, zeigte ein Unterschied zwischen den resistenten und sensitiven Zellen (Perez-Victoria F.J., 2003a), der mit der Resistenz korrelierte. Da in dieser Arbeit Resistenz durch Überexpression von Genen erzeugt wurde, war der molekulare Unterschied zwischen sensitiven und resistenten Zellen von Beginn an bekannt.

Ein weiterer Vorteil der hier angewandten funktionellen Komplementation, ist die Verwendung eines *shuttle* Vektors. Es sind nur eine begrenzte Anzahl von Genen in einem Cosmid lokalisiert, wodurch die Klonierung und damit auch die Identifizierung von Kandidatengenen vereinfacht wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktions-, *Southern Blot*- und letztendlich Sequenzanalysen zeigten, dass die *inserts* der Cosmide pcosM1 und pcosM2 über gemeinsame Sequenzen verfügen. Der Umstand, dass die Cosmide in nur einem ORF überlappen, vereinfachte die Identifizierung des Resistenzvermittelnden Gens erheblich.

4.3 Natürliche Chemoresistenz in Patienten-Isolaten

In *Leishmania* steht die Erforschung der Resistenzentwicklung noch am Anfang. Die wenigen bisher bekannten Resistenzmarker wurden in resistenten Stämmen identifiziert, die zuvor *in vitro* Selektionen unterzogen wurden. Wie oben bereits angeführt, basiert die Resistenz in diesen Zelllinien überwiegend auf der extrachromosomalen Amplifikation von Genen.

Auch in unserem Ansatz wurde Resistenz durch Überexpression von Genen induziert. Dabei stellt sich die Frage, ob Resistenz durch Überexpression in der Natur bzw. in Patienten-Isolaten überhaupt eine bedeutende Rolle spielt, und ob der hier gewählte Ansatz zur Identifizierung von Resistenzmarkern der richtige war.

Es existieren kaum Studien zur Resistenzbildung in Patienten-Isolaten, da die Untersuchungen häufig mit Schwierigkeiten verbunden sind:

1. Nicht jedes Isolat lässt sich *in vitro* kultivieren, es erfolgt daher bereits bei der Anzucht eine -ungewollte- Selektion.
2. Die Resistenz der Erreger muss *in vitro* verifiziert werden, denn oft ist ein Zusammenspiel von Resistenz der Parasiten und verminderter Immunkompetenz des Patienten der Grund für Therapieversagen.
3. Bei einem Patienten-Isolat handelt es sich meist um ein Gemisch aus unterschiedlichen klonalen Populationen.
4. Für die Untersuchung der Resistenzmechanismen muss der entsprechende sensitive Klon vorhanden sein.

In einer Studie wurde, in vergleichenden Proteom-Analysen des resistenten und entsprechenden sensitiven Patienten-Isolats, die Überexpression von HSP83 beobachtet. Die Transfektion von HSP83 in den sensitiven Stamm führte zu einer zweifachen Steigerung der Antimon- und Miltefosin-Resistenz (Vergnes B., 2007). Weitere Untersuchungen von Antimon-resistenten Patienten-Isolaten zeigten, dass die Resistenz mit der extrachromosomalen Amplifikation von *MRPA* (ABC-Transporter), des Pterin Reduktase-Gens (*PTR1*) und der Trypanothion-Reduktase korrelierte (Mittal M.K., 2007; Mukherjee A., 2007; Singh N., 2006).

Diese Studien belegen, dass die Überexpression von Genen auch in natürlich resistenten *Leishmania*-Stämmen auftritt, und zur Resistenz beiträgt. Damit ist der in dieser Arbeit verwendete Ansatz, "Resistenz durch Überexpression", für die Identifizierung molekularer Resistenzmarker durchaus geeignet.

Die Identifizierung von *MRPA* als ein Marker der SbIII-Resistenz erfolgte zuerst in resistenten *in vitro*-isolierten Stämmen (Légaré D., 2001), und konnte später in natürlichen, resistenten Isolaten verifiziert werden (Mukherjee A., 2007). Daraus wird deutlich, dass die Erforschung der Resistenzbildung in *in vitro* selektierten Stämmen zur Aufklärung realer Resistenzmechanismen beitragen kann.

Resistenz, die auf der Amplifikation von Genen beruht, kann in einem anthroponotischen Übertragungszyklus verbreitet werden, da die Erreger mehr oder weniger fortwährend dem Medikament, und somit einer ständigen Selektion ausgesetzt sind. Liegt dagegen ein

zoonotischer Übertragungszyklus vor, findet keine Selektion von resistenten Erregern im Tierwirt (z.B. Hund) statt, und es kann zur Entstehung von Revertanten kommen. Basiert die Resistenz der Leishmanien dagegen auf Punktmutationen, wie z.B. in der Miltefosin-Translokase *LdMT* (Perez-Victoria F.J., 2003b; Perez-Victoria F.J., 2006), ist keine Selektion nötig, um die Resistenz der Parasiten aufrechtzuerhalten, und sowohl ein anthroponotischer als auch ein zoonotischer Übertragungszyklus kann zur Verbreitung der Resistenz beitragen. Die größere Bedrohung geht demnach von Resistenzbildung durch Mutationen aus. Im Falle von Miltefosin, ist jedoch abzuwarten, ob Mutationen in *LdMT* tatsächlich in der Natur Resistenz hervorrufen können, da ein funktionsunfähiger Phospholipid-Translokator möglicherweise zur verminderten Virulenz der Parasiten führen könnte (Ouellette M., 2004).

4.4 Überprüfung der Miltefosin-Resistenz in promastigoten Leishmanien

Nach Selektion der Miltefosin-Resistenz vermittelnden Cosmide und Transfektion in *L. infantum* WT, wurden die rekombinanten Stämme auf ihre Resistenz hin überprüft. Mit einer Kombination von unterschiedlichen Experimenten wurden mehrere Aspekte der Miltefosin-Zytotoxizität bzw. Resistenz untersucht. Dabei wurden das Wachstum, die Morphologie, und der DNA-Gehalt von rekombinanten Promastigoten in Gegenwart von Miltefosin untersucht. Die erhöhte Resistenz von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] spiegelt sich u.a. in der DNA-Degradationsanalyse wider. Die 3 - 3,5-fach erhöhten IC₅₀-Werte für Miltefosin (Abb.13) korrelieren mit dem im Durchschnitt 3,2 -fach geringeren Anteil an hypodiploiden Zellen von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] (Abb. 8). Die größten Unterschiede bezüglich der Resistenz in beiden Experimenten zwischen der Kontrolle *Li* [pcosTL] und *Li* [pcosM1] bzw. *Li* [pcosM2], treten bei einer Miltefosin-Konzentration von 40 μ M und 60 μ M auf.

Die Untersuchung des Wachstums bestätigt lediglich die Fähigkeit zur Proliferation von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] in Gegenwart hoher Miltefosin-Konzentrationen. Die Ergebnisse der DNA-Degradationsanalyse zeigen dagegen eindeutig, dass die Cosmid-vermittelte Resistenz auf der Inhibierung des Miltefosin-induzierten Zelltods beruht, und nicht auf ein verbessertes *in vitro* Wachstum zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis wurde durch die ultrastrukturellen Untersuchungen (Abb. 7), sowie die Raster-Elektronenmikroskopische Analyse (Abb.6), und letztendlich durch die Bestimmung der Wachstumsraten der rekombinanten Stämme in Abwesenheit von Miltefosin bestätigt (Abb. 15).

Die Untersuchung der *P300*-Expression mittels *real time* RT-PCR, ergab eine 6-fache Steigerung des rel. *P300*-mRNA Levels in *Li* [pcosP300] (Abb. 21); die Resistenz war um

den Faktor 2,5 erhöht (Abb. 13). Die Expression von *P300* und der erhöhte IC_{50} -Wert von *Li* [*pcosP300*] korrelieren miteinander und liegen innerhalb einer Größenordnung. Unterschiede in der Genexpression sollten in *Leishmania* stets auf Protein-Ebene überprüft werden, da die Regulation der Genexpression hauptsächlich post-transkriptionell erfolgt (Clayton C.E., 2002). Die Genexpression in *Trypanosomatidae* wird, anders als in höheren Eukaryoten, über die mRNA-Stabilität, und über die Translations-Effizienz der individuellen Transkripte reguliert (Boucher N., 2002; McNicoll F., 2005; Zilberstein D., 1994). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Überprüfung der *P300*-Proteinexpression in *Li* [*pcosP300*] nicht durchgeführt werden, da keine *P300*-spezifischen Antikörper hergestellt werden konnten.

4.5 *pcosM2* vermittelt die ausgeprägteste Miltefosin-Resistenz

In fast allen Experimenten zeigte sich, dass die ausgeprägteste Resistenz von *pcosM2* hervorgerufen wird, gefolgt von *pcosM1* und *posP300* (Abb. 4B, 5, 8, 13 & 22B). Allen drei Cosmiden ist der Besitz des vollständigen *P300*-ORFs gemeinsam (Abb.14), welches als das Miltefosin-Resistenz vermittelnde Gen identifiziert wurde. In der kompetitiven Selektion hätten demnach *pcosM1* und *pcosM2* zu gleichen Teilen reisoliert werden müssen. Da dies nicht der Fall war, und weil *pcosM2* auch nicht zur Erhöhung der Teilungsraten beiträgt (Abb. 15), kann das verstärkte Auftreten von *pcosM2* nach der Selektion nur an einer erhöhten Resistenz liegen, die nicht allein von der Überexpression des *P300* ausgehen kann. Die stärker vermittelte Resistenz von *pcosM2* muss demnach aus der zusätzlichen Überexpression eines, oder mehreren weiteren ORF's hervorgehen.

Sequenzvergleiche von *pcosM1* und *pcosM2* ergaben, dass die *inserts* partiell in nur einem weiteren ORF überlappen, welches für ein 235 kDa Protein unbekannter Funktion kodiert (Tab. 3 + 4). Signifikante Sequenzübereinstimmungen von *P300* sind nur zu diesem Protein vorhanden (3.3). Dabei ist die Gesamt-Aminosäuresequenzähnlichkeit (31%) beider Proteine relativ gering. Betrachtet man jedoch nur die N-Termini von *P300* und *P235* ist eine Aminosäuresequenzidentität von 54% vorhanden. Beide Proteine könnten demzufolge ähnliche Funktionen ausüben, und deshalb auch zur Miltefosin-Resistenz der rekombinanten Parasiten beitragen. Da das *P235*-Gen nur auf Cosmid *pcosM2*, jedoch nicht auf *pcosM1* vollständig lokalisiert ist (ca. 1700 bp vom 3'-Ende des *P235*-ORF sind nicht vorhanden), könnte die additive Wirkung von *P235* zur stärkeren Miltefosin-Resistenz von *Li* [*pcosM2*] beitragen. Diese Hypothese wird zurzeit überprüft, indem *P235* separat, und zusammen mit *P300* kloniert wird. Nach Transfektion der Konstrukte in *L. infantum* WT, sollen die Transfektanden auf ihre Miltefosin-Resistenz hin untersucht werden. Die Klonierung von

P300-P235 ist bereits erfolgreich abgeschlossen (unveröffentlichte Ergebnisse Dorothea Zander, BNI Hamburg).

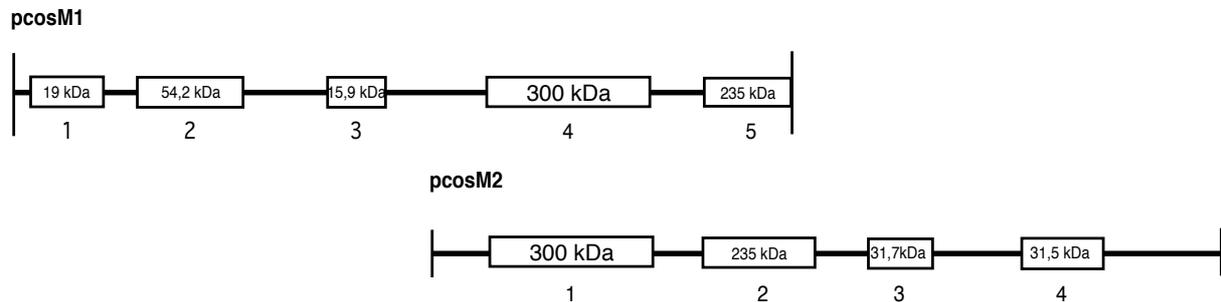


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Cosmidinserts von pcosM1 und pcosM2

Die Miltefosin-Resistenz von *Li* [pcosP300] war, im Vergleich zu *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2], weniger stark ausgeprägt (Abb. 13). Wie in 4.4 bereits erwähnt, erfolgt die Regulation der Genexpression in *Leishmania* post-transkriptionell. Es gibt Hinweise für eine Beteiligung bestimmter Sequenzen der 3'-untranslatierten Bereiche (UTRs), der intergenischen Regionen, und der 5'-*trans splice acceptor sites* der nachfolgenden Gene, die die Stabilität der mRNA beeinflussen (Boucher N., 2002; LeBowitz J.H., 1993; McNicoll F., 2005; Zilberstein D., 1994). Dies deutet bereits auf eine weitere Besonderheit der Leishmanien hin: das *trans*-Spleissen. Die Gene der *Trypanosomatidae* liegen in sogenannten Multigeneinheiten vor, und die Transkription erfolgt polycistronisch. Da die Gene keine Introns (nicht-kodierende Bereiche) enthalten, ist ein *cis*-Spleissen nicht erforderlich. Durch Entfernung der intergenischen Regionen werden polycistronische prä-mRNAs in monocistronische Einheiten zerlegt. Es folgt die Anhängung einer *spliced leader* (SL) Sequenz an das 5'-Ende jeder prä-mRNA. Diese 39 bp umfassende Sequenz besitzt an ihrem 5'-Ende eine *cap*-Struktur in Form eines 7-Methylguanosin-Restes. Die Verknüpfung der SL-Sequenz mit dem 5'-Ende jeder prä-mRNA wird als *trans*-Spleissen bezeichnet und ist ein kotranskriptioneller Vorgang (Matthews K.R., 1994; Ullu E., 1993).

Gleichzeitig erfolgt am 3'-Ende jeder prä-mRNA die Polyadenylierung.

Die regulatorischen 5'- und 3'-UTRs können je nach Transkript variieren, und sind länger, als in Transkripten anderer Eukaryoten. Dadurch bilden sie die molekulare Basis für diese Art der Regulation (Clayton C.E., 2002; Stiles J.K., 1999). Die Konstruktion des pcosP300 Cosmids erfolgte über die Deletion von ORF 2-4 aus pcosM2 (Abb. 12). Dabei wurde ein erheblicher Teil (ca. 2200 bp) der stromabwärts liegenden intergenischen Region entfernt. Die Wahl der Polyadenylierungs- *site* wird durch die Position der 5'-*splice acceptor site* des

nachfolgenden Gens festgelegt (LeBowitz J.H., 1993). Die Entfernung der *splice acceptor site* von *P235* kann zu einer geringeren Halbwertszeit der *P300*-Transkripte in *Li* [*pcosP300*] führen. Dies könnte ein weiterer Grund für die schwächere Miltefosin-Resistenz von *Li* [*pcosP300*], im Vergleich zu *Li* [*pcosM1*] und *Li* [*pcosM2*] sein.

4.6 Miltefosin-Resistenz in intrazellulären Amastigoten

Amastigote Formen des Erregers sind für die pathogenen Effekte verantwortlich, und stellen das Ziel von Chemotherapeutika dar. Demnach sollten Resistenzstudien möglichst mit amastigoten Stadien durchgeführt werden. Obwohl die Stadiendifferenzierung von Leishmanien *in vitro* imitiert werden kann (Zilberstein D., 1994), ist die Handhabung von axenischen Amastigoten dennoch mit Schwierigkeiten verbunden.

Promastigote Leishmanien sind dagegen zumeist in Standard-Nährmedien einfach zu kultivieren, besitzen schnelle Wachstumsraten, und können durch genetische Manipulation verändert werden (Beverley S.M., 2003; Clos J., 2006). Die Selektion und Identifizierung des Miltefosin-Resistenz vermittelnden Gens wurde in promastigoten Stadien von *L. infantum* durchgeführt, und anschließend in intrazellulären Amastigoten überprüft (3.6). Dabei wurde festgestellt, dass die Cosmid-vermittelte Resistenz in intrazellulären Amastigoten, im Vergleich zur Kontrolle *Li* [*pcosTL*], dem der Promastigoten ähnelt. In beiden Stadien wurde eine 2,4-3,5-fache Erhöhung der Resistenz beobachtet (3.2.4 und 3.6). Lediglich intrazelluläre *Li* [*pcosP300*] Parasiten zeigten keine Erhöhung des IC_{50} -Wertes für Miltefosin (Abb. 23). Erst bei höheren Miltefosin-Konzentrationen wurde ein Unterschied in der Resistenz zwischen *Li* [*pcosTL*] und *Li* [*pcosP300*] deutlich.

Ein direkter Vergleich der IC_{50} -Werte von Promastigoten und Amastigoten zeigt dagegen, dass die intrazellulären Amastigoten insgesamt wesentlich sensitiver gegenüber Miltefosin sind. Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Zytostatika zwischen Promastigoten, axenischen und intrazellulären Amastigoten einer Zelllinie sind häufig beschrieben worden (Al-Mohammed H.I., 2005; Callahan H.L., 1997; Escobar P., 2002). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen, sind in der Studie von Escobar *et al.* (2002) Promastigoten verschiedener *Leishmania*-Arten sensitiver gegenüber Miltefosin und Edelfosin, als die entsprechenden intrazellulären Amastigoten. Dagegen zeigt die Studie von Callahan *et al.* (1997), dass intrazelluläre und axenische Amastigoten vergleichbare IC_{50} -Werte für Amphotericin B besitzen, Promastigoten aber unempfindlicher gegenüber dem Medikament

sind. Die Autoren verwendeten für die *in vitro* Infektionen J774-1 Makrophagen-ähnliche Zellen, wie es auch in dieser Arbeit der Fall war.

Beim Vergleich dieser Studien müssen experimentelle Unterschiede berücksichtigt werden. Bereits geringfügige Abweichungen der Kulturbedingungen können zu anderen Ergebnissen bezüglich der Resistenz von Promastigoten und Amastigoten führen (Al-Mohammed H.I., 2005; Croft S.L., 2002b). Die in 3.6 beschriebenen *in vitro* Infektionen mit *L. infantum* wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt, da es bei länger andauernden Infektionen (48 und 72 Stunden) zur Zerstörung der Makrophagen durch die Amastigoten gekommen ist. Dies zeigt, dass der verwendete *L. infantum*-Stamm, im Vergleich zu den von Escobar *et al.* (2002) verwendeten *Leishmania*-Stämmen, mit denen drei-tägige Infektionen durchgeführt wurden, aggressiver ist. Bei Vergleichen zwischen den verschiedenen Lebensstadien des Erregers sollten auch die unterschiedlichen Wachstumsraten berücksichtigt werden, die eventuell einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können.

Die Studien und die Ergebnisse der *in vitro* Infektionen zeigen, dass die in Promastigoten induzierte Resistenz zwar in amastigoten Stadien überprüft werden muss, dennoch können promastigote Formen, obwohl sie nicht das pathogene Stadium einer *Leishmania*-Infektion darstellen, dazu beitragen, Resistenzmechanismen zu erforschen.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Miltefosin-Toleranz von intrazellulären *LiP300* \pm -Deletionsmutanten nicht mehr untersucht werden. Die Überexpression von *P300* führt in beiden Lebensstadien des Erregers zur Miltefosin-Resistenz. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Deletion des Gens auch in Amastigoten zur verminderten Miltefosin-Toleranz führt. Diese Annahme muss natürlich in der Zukunft noch überprüft werden.

Die Überexpression von *P300* führte auch in intrazellulären Amastigoten von *L. donovani* zur Resistenz gegenüber Miltefosin. *L. donovani* war, über den gesamten Konzentrationsbereich betrachtet, empfindlicher als *L. infantum* (Abb. 23 + 24). Dies wird bei hohen Miltefosin-Konzentrationen deutlich. Verschiedene *Leishmania*-Stämme und -Arten variieren häufig in ihrer intrinsischen Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika, wodurch die Therapie beträchtlich erschwert werden kann (Croft S.L., 2002b). Die Variationen basieren auf biochemischen und molekularen Unterschieden der Arten und Stämme, die sich auch in den unterschiedlichen Formen der Leishmaniasen widerspiegeln. Das Ergebnis zeigt, dass die von *P300* vermittelte Resistenz nicht nur auf *L. infantum* beschränkt ist. Um die von *P300*

vermittelte Resistenz besser zu charakterisieren, sollten die Effekte auch in dermatropen Spezies der Alten Welt (z.B. *L. major*) und der neuen Welt (z.B. *L. braziliensis*) untersucht werden.

4.7 Herstellung einer *P300*-Deletionsmutante

Die Überprüfungen der putativen Deletionsmutanten deuteten daraufhin, dass wider Erwarten mehrere Kopien von *P300* und *P235* im Genom von *L. infantum* WT vorhanden sein müssen. Die anschließende Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von *P300* mittels PFGE konnte dies bestätigen (Abb 31). Ein *in silico* Vergleich der Genloci von *P300* und *P235* auf Chromosom 8 und Chromosom 29 zeigte, dass nicht nur eine Amplifikation dieser Genloci vorliegt, sondern dass zusätzlich ein erheblicher Teil der flankierenden Sequenzen dupliziert wurde (Abb. 32). Das erklärt, weshalb in der zuvor durchgeführten *Southern Blot*-Analyse zur Bestimmung der Genkopienzahl, *P300* nicht als *multi copy*-Gen identifiziert werden konnte (Abb. 25).

Leishmanien besitzen eine hohe genomische Plastizität, was sich in der Variabilität der Chromosomenzahl und -größe widerspiegelt (Cruz A., 1993). Amplifikation und Rekombination im Genom finden häufig statt, und erklären die oft unterschiedlichen Größen von homologen Chromosomen (Clayton C.E., 2002). Aneuploidie wurde bereits in vielen *Leishmania*-Stämmen beobachtet (Cruz A., 1993; Ivens AC, 2005; Sunkin S.M., 2000). Aus diesem Grunde sollten, zur eindeutigen Bestimmung der Genkopienzahl, künftig neben *Southern Blot*-Analysen, auch die chromosomale Lokalisation von Genen untersucht werden.

Trotz der Tatsache, dass zwei Genkopien von *P300* pro haploidem *L. infantum*-Genom vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *LiP300*^{-/-}-Deletionsmutante (ehemals *LiP300-P235*^{-/-}-Kl.2) hergestellt. Das bedeutet, dass in nur zwei aufeinander folgenden Transfektionsrunden, vier Rekombinationsereignisse in den *P300*-Genloci hervorgerufen wurden. Demnach müsste mindestens während einer Transfektionsrunde mehr als ein Allel durch die Selektionsmarker ausgetauscht worden sein. In mehreren Experimenten (PCR, *Southern Blot*, PFGE, *real time* RT-PCR) konnte eindeutig gezeigt werden, dass kein *P300*-Allel mehr in *LiP300*^{-/-} existiert.

Die Erzeugung der *LiP300*^{-/-}-Mutante erfolgte unter Verwendung des Konstrukts, welches für die Herstellung einer *LiP300-P235*^{-/-}-Mutante gedacht war (Abb. 26). Folglich hätte auch ein

Austausch aller *P235*-Allele stattfinden müssen. Die PCR- und *Southern Blot*-Analysen der *LiP300*^{-/-}-Mutante zeigen jedoch, dass mindestens ein *P235* Allel am nicht ursprünglichem Genloкус vorhanden ist (Abb. 28B + 29C). Dies deutet daraufhin, dass durch genomische Rearrangements, z.B. durch Translokation von *P235* in einen anderen Chromosom-Lokus, mindestens eine Kopie von *P235* erhalten blieb. Es wurde nicht untersucht, wie viele *P235*-Allele in der *LiP300*^{-/-}-Mutante durch Selektionsmarker ausgetauscht wurden, bzw. wie viele noch vorhanden sind. Der beobachtete Effekt bezüglich der Miltefosin-Toleranz von *LiP300*^{-/-} könnte daher nicht nur auf der Deletion aller *P300*-Gene beruhen, sondern partiell auch auf den Austausch von einem oder mehreren *P235*-Genkopien zurück zuführen sein.

Dumas *et al.* (Dumas C., 1997) berichten in einer Studie von wiederholten Versuchen, eine Inaktivierung der Trypanothion-Reduktase (TR), einen *single copy*-Gen, durch *targeted gene disruption* in *Leishmania* ssp. zu erzielen. Dabei stellten sie fest, dass es stets zur Ausbildung einer partiellen Trisomie des TR-Genloкус kommt. Obwohl Doppel-Allel-Deletionsmutanten generiert wurden, war die Erzeugung von sogenannten Null-Mutanten nicht möglich. In einer anderen Studie ist beschrieben, dass Versuche zur Herstellung von DHFR-TS (Dihydrofolat Reduktase-Thymidylat Synthase) Deletionsmutanten in *L. major*, stets zur Aneuploidie und Tetraploidie bezüglich des DHFR-TS-Genloкус führten (Cruz A., 1993). Die Autoren beider Untersuchungen gehen davon aus, dass es sich um essentielle Gene handelt, und die Herstellung von Null-Mutanten deswegen nicht möglich ist.

Auch in unserem Fall war die Erzeugung einer *P235* Null-Mutante im Rahmen der Herstellung von *LiP300-P235*^{-/-}-Mutanten nicht erfolgreich. Dabei sollten *P300* und *P235* gemeinsam in zwei Transfektionsrunden durch Selektionsmarker ausgetauscht werden (Abb. 30). Wie oben bereits erwähnt, fand vermutlich eine Translokation von *P235* statt. Dies lässt die Annahme zu, dass *P235* ein essentielles Gen in axenischen Promastigoten von *L. infantum* darstellt. Die hier geäußerte Hypothese bleibt jedoch spekulativ, bis der Versuch unternommen wird, eine *P235* Null-Mutante in *L. donovani* zu generieren.

Der Austausch sämtlicher *P300*-Allele in Promastigoten von *L. infantum* hat keine drastischen Auswirkungen auf die Morphologie oder das Wachstum unter axenischen Kultivierungsbedingungen (3.9.1 und Abb. 35). Ebenso wenig scheint die Fähigkeit der Promastigoten zur Differenzierung in Makrophagen-ähnlichen Zellen gestört zu sein. Die *LiP300*^{-/-}-Mutanten zeigen jedoch eine eindeutige Auffälligkeit bezüglich der Miltefosin-Toleranz (Abb. 33A). Aus diesen Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass

P300 kein essentielles Gen für *L. infantum* in *in vitro* Kultur ist. Es ist jedoch möglich, dass dieses Gen eine bedeutende Rolle im Säugetierwirt bzw. Insektenvektor spielt.

4.8 Die Rolle von P300 in der Chemoresistenz

Kreuzresistenz-Untersuchungen mit zwei weiteren anti-*Leishmania*-Wirkstoffen - dreiwertigem Antimon (SbIII) und Pentamidin (PEN) - wurden durchgeführt (3.5). Die Wirkungsmechanismen dieser Chemotherapeutika sind zum größten Teil unbekannt. Da Miltefosin, SbIII und PEN verschiedenartige Substanzen darstellen, ist anzunehmen, dass sie unterschiedliche zelluläre Zielmoleküle bzw. -strukturen angreifen.

Die Überexpression von *P300* in *L. infantum* Promastigoten führt zur Resistenz gegenüber SbIII, jedoch nicht gegenüber PEN (Abb. 22A+B). Dies lässt die Annahme zu, dass sich die Wirkungs- bzw. Resistenzmechanismen von Miltefosin und SbIII in mindestens einem Punkt überschneiden. Die Wirkungsmechanismen von Miltefosin sind in Kapitel 1.5 beschrieben. Die Lipid-Biosynthese der Erreger scheint das Hauptziel von Miltefosin zu sein. Paradoxerweise sind mehr Untersuchungen über die Mechanismen der SbIII-Resistenz durchgeführt worden, als über die Wirkungsmechanismen. Es ist beschrieben, dass SbIII unter anderem das Thiol-Redox-Potential der Zelle beeinträchtigt. SbIII verändert die intrazelluläre Thiol-Konzentration, indem es einerseits den Efflux von Trypanothion und Glutathion fördert, und andererseits die Trypanothion-Reduktase inhibiert, was zur Anhäufung der Disulfid-Form von Trypanothion und Glutathion führt (Berman J. D., 1987; Wyllie S., 2004). Trypanothion kommt ausschließlich nur in *Trypanosomatidae* vor, und ist für das Überleben der Parasiten essentiell. Es wird aus zwei Glutathion-Molekülen gebildet, die über Spermidin (*polyamin linker*) miteinander verbunden sind.

Die SbIII-Resistenzmechanismen sind eng mit den Wirkungsmechanismen verknüpft. In SbIII-resistenten Promastigoten, die durch allmähliche Erhöhung der SbIII-Konzentration erzeugt wurden, konnten mehrere Resistenzmechanismen identifiziert werden:

1. Die Überexpression von Enzymen, die an der Thiol- und Polyamin-Biosynthese beteiligt sind führt zur Steigerung der intrazellulären Trypanothion-Konzentration (Haimeur A., 2000).
2. SbIII/Thiol Konjugate werden über den Transporter MRPA, der in der Membran von intrazellulären Organellen lokalisiert ist, abgesondert (Légaré D., 2001). Die Überexpression eines weiteren Transporters, des PRP1 (*pentamidine resistance protein 1*), führt zur Kreuzresistenz gegenüber SbIII (Coelho A.C, 2003).

3. Die Abnahme der intrazellulären SbIII-Konzentration kann mit einer verringerten Expression des AQP1 (*aquaglyceroporin*) - eines SbIII-Transporters (Gourbal B., 2004) - korrelieren.

Die Mechanismen der Miltefosin- und SbIII-Resistenz ähneln sich, es sind jedoch nicht dieselben Moleküle/Proteine involviert. Resistenz durch verstärkten Efflux des Zytostatikums ist in Miltefosin- sowie in SbIII-resistenten Zelllinien beschrieben. Die Überexpression von MDR1 führt zur Kreuzresistenz gegenüber Miltefosin in *L. tropica* (Perez-Victoria J.M., 2001). Im Gegensatz zu MRPA und PRP1, die unter anderem Metall/Thiol Konjugate transportieren, und zur Unterfamilie der ABCC-Transporter gehören, zählt MDR1 zu den ABCB-Transportern (Leprohon P., 2006). Kreuzresistenz Studien von Coelho *et al.* (2003) zeigten, dass die PRP1-Überexpression, neben Pentamidin-Resistenz, auch Schutz gegenüber SbIII, jedoch nicht gegenüber Miltefosin überträgt.

Eine Abnahme der intrazellulären Wirkstoff-Konzentration wurde ebenfalls in Miltefosin- sowie in SbIII-resistenten Zellen beobachtet. Punktmutationen in der Miltefosin-Translokase *LdMT* waren für die stark verringerte Akkumulation von Miltefosin verantwortlich (Perez-Victoria F.J., 2003a; Perez-Victoria F.J., 2003b). Dagegen führte eine verminderte Expression des AQP1 zur SbIII-Resistenz (Gourbal B., 2004). Es gibt keine Hinweise für einen Transport von Miltefosins oder weiteren Alkylphosphocholin-Analoga über AQP1.

Diese Studien erwecken den Eindruck, dass die Resistenzbildung überwiegend von Transportern bestimmt wird. Die Überexpression von P300 führt auch in unserem Fall zur Kreuzresistenz. Die Sequenz- und *in silico*-Analysen deuten stark darauf hin, dass P300 keine Transmembran-Domänen besitzt, und insgesamt überwiegend stark hydrophil ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich um ein lösliches, zytosolisches Protein handelt. Mit Hilfe von Lokalisationsstudien muss diese Annahme in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Die Miltefosin-Sensitivität bzw. Resistenz wird daher möglicherweise nicht ausschließlich von Transportern bestimmt, wie in den bisherigen Studien beschrieben ist. Da P300 keinen Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufweist, und keine funktionellen Domänen identifiziert wurden, können über die Funktion des Proteins keine Vorhersagen gemacht werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass P300 direkt auf Miltefosin und SbIII wirkt, sobald sich die Medikamente im Zytoplasma befinden, und bevor sie eventuell in weitere

Kompartimente transportiert werden. Da es sich jedoch um chemisch völlig unterschiedliche Substanzen handelt - ein Alkylphosphocholin und ein Metall-Ion, ist eine direkte Interaktion zwischen P300 und den Wirkstoffen eher unwahrscheinlich. P300 hat vermutlich einen indirekten Einfluss auf Miltefosin- bzw. SbIII-Resistenz, über bisher nicht identifizierte Regel-Wege.

Diese Annahme wird weiterhin durch die Charakterisierung der *LiP300*^{-/-} Mutante unterstützt. Die Deletion von *P300* führte zu einer deutlichen Abnahme der Miltefosin-Toleranz der Promastigoten. Die Sensitivität von *LiP300*^{-/-} gegenüber SbIII blieb dagegen unverändert (Abb. 33A+B). Würde eine direkte Interaktion zwischen *P300* und beiden Substanzen bestehen, müsste auch die SbIII-Sensitivität von *LiP300*^{-/-} stärker betroffen sein. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Diese Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Miltefosin-Toleranz in *L. infantum* unmittelbarer von *P300* beeinflusst wird, als die SbIII-Toleranz. Die Überexpression von *P300* vermittelt Miltefosin-Resistenz, und die Deletion des Gens führt zur verminderten Sensitivität. Eine Überexpression von *P300* führt auch zur Erhöhung der SbIII-Resistenz, dagegen hat die Deletion des Gens keinen Einfluss auf die Wirkung von SbIII. Möglicherweise wird die SbIII-Toleranz in *L. infantum* auch von anderen Faktoren bestimmt, z.B. von der intrazellulären Thiol-Konzentration, und von der Inhibierung der SbIII-Reduktion.

Es gibt Hinweise darauf, dass Miltefosin, SbIII und auch PEN einen Apoptose-ähnlichen Zelltod in *Leishmania* auslösen (Sereno D., 2001; Shaha, 2006; Verma N.K., 2004). Die Überexpression von P300 könnte den von Miltefosin und SbIII induzierten Zelltod verhindern, indem es die Signalkaskade des Apoptose-ähnlichen Zelltods stört. Die Faktoren und Signalwege des programmierten Zelltods in *Leishmania* sind jedoch noch nicht vollständig identifiziert. Da es außerdem keine Hinweise auf mögliche Funktionen von P300 gibt, lässt sich diese Hypothese derzeit nicht belegen.

Ebenso wie die Wirkungsmechanismen von Miltefosin und SbIII, sind auch die von Pentamidin weit gehend unbekannt. PEN akkumuliert im einzigen Mitochondrium der Leishmanien und kann unter anderem die mitochondriale Topoisomerase II inhibieren (Basselin M., 2002; Basselin M., 1996). Resistenz gegenüber Pentamidin ist mit einer verringerten Akkumulation assoziiert, z.B. durch Überexpression von PRP1 (Coelho A.C, 2003). Obwohl die Überexpression von *P300* den von Miltefosin und SbIII programmierten

Zelltod verhindert, wird dadurch nicht die Wirkung von PEN beeinträchtigt. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass einige Faktoren, die zur Aktivierung der Signalkaskade des Apoptose-ähnlichen Zelltods führen, von einer P300-Überexpression gestört werden, und andere nicht. Die Überexpression des gleichen Proteins führt in *L. infantum* zu unterschiedlichen Resultaten des Medikamenten-vermittelten Apoptose-ähnlichen Zelltods. Desgleichen wurde bereits von Vergnes *et al.* (2007) in einem Antimon-resistenten Patienten-Isolat beobachtet. Die Überexpression des *small kinetoplast calpain-related protein* (SKCRP) führte in *L. donovani* zur Erhöhung der Miltefosin-Resistenz, und gleichzeitig zur Abnahme der Antimon-Resistenz.

4.9 Mögliche biologische Funktionen von P300

P300 wurde als das Miltefosin-Resistenz vermittelndes Gen identifiziert. Die eigentliche Funktion des Proteins ist jedoch nicht bekannt. In diesem Abschnitt soll über die biologische Funktion von P300 spekuliert werden.

Datenbank-Recherchen (BLAST-P) von P300 ergaben, dass keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen bestehen (3.3). In *Trypanosoma* existiert ein Homolog zu P300, mit einer theoretischen molekularen Masse von ca. 90.000 und unbekannter Funktion. Signifikante Sequenzübereinstimmungen zu Proteinen anderer Organismen sind nicht vorhanden. *P300* kommt ausschließlich nur in *Leishmania* ssp. vor. Die Funktion des Gens scheint demnach *Leishmania*-spezifisch zu sein. Im Verlauf der Evolution spaltete sich die Familie der *Trypanosomatidae* sehr früh von der Hauptlinie der Eukaryoten ab (Myler PJ, 2001; Piekarski, 2002; Sogin M.L., 1991). Dies führte zur Entstehung von Genen, die für Parasiten-spezifische Funktionen kodieren, und damit auch zu den spezifischen molekularen und zellbiologischen Eigenschaften der *Trypanosomatidae*, wie z.B. dem *trans*-Spleissen, den speziellen Mechanismen der Genexpression und Regulation, dem RNA-Editing, und zu Kompartimenten wie Glykosomen (Hannaert V., 2003).

Von den ca. 1000 *Leishmania*-spezifischen Genen, besitzen etwa 68 %, wie *P300* und *P235* eine noch unbekannte Funktion (Ivens AC, 2005; Peacock CS, 2007). Die *Leishmania*-spezifische Funktion von *P300* könnte mit den speziellen Überlebensstrategien im Säugetierwirt bzw. im Insektenvektor zusammenhängen, welche die Erreger im Laufe der Evolution entwickelt haben (1.1.1 und 1.1.2). Die erfolgreiche Generierung einer *P300* Null-Mutante zeigt, dass dieses Gen nicht essentiell in *L. infantum* Promastigoten und

intrazellulären Amastigoten ist, die unter Kulturbedingungen gehalten werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Protein eine bedeutende Rolle für die Etablierung des Erregers im Wirt bzw. im Überträger spielt.

Es wird davon ausgegangen, dass Spezies-spezifische Gene eine Schlüsselrolle in der Pathogenität der verschiedenen *Leishmania*-Spezies spielen (Peacock CS, 2007). Aufgrund der Datenbank-Recherchen (3.3) und der PFGE-Analyse zur Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *P300* (Abb. 31) ist bekannt, dass *P300* und *P235* auch in *L. major*, *L. donovani* und *L. braziliensis* vorkommen. Dabei ist die Aminosäuresequenz von *P300* in den Spezies hoch konserviert (*L. infantum* versus *L. major*: 99%; *L. infantum* versus *L. braziliensis*: 74%). Die Werte stimmen mit der durchschnittlichen Aminosäuresequenz-Identität von kodierenden Sequenzen zwischen *L. infantum* und *L. major* (92%) bzw. *L. braziliensis* (77%) überein (Peacock CS, 2007). *P300* ist demzufolge kein Spezies-spezifisches Gen, da es sowohl in dermatropen (*L. major*) und viszerotropen (*L. donovani*, *L. infantum*) Arten der Alten Welt, wie auch in dermatropen Arten der Neuen Welt (*L. braziliensis*) vorhanden ist. Diese Tatsache, lässt die Vermutung zu, dass *P300* nicht direkt an der Ausbildung der entsprechenden klinischen Manifestation beteiligt ist, und dem Anschein nach kein Organtropismus-relevantes Gen darstellt.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Gen in den jeweiligen Spezies differentiell exprimiert wird, was ebenfalls zum Organtropismus beitragen könnte. Unterschiede im Expressions-Level können unter anderem die Folge von Variationen in der Zahl der Genkopie sein. Wie die Datenbank-Recherchen zeigen, und wie auch experimentell bestätigt wurde, liegen, im Gegensatz zu *L. donovani*, pro Chromosomen-Satz zwei *P300*-Genkopien in *L. infantum* vor. Beides sind viszerotrope *Leishmania* Spezies. Dies unterstützt die Vermutung, dass eine differentielle *P300*-Expression nicht für den Organtropismus verantwortlich ist.

In silico Analysen der Aminosäuresequenz lieferten keine Hinweise auf mögliche funktionelle Domänen. Es wurden keine GPI-Anker, Signalsequenzen oder Transmembrandomänen innerhalb der Aminosäuresequenz identifiziert. Da *P300* ein überwiegend hydrophiles Protein ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein zytosolisches Protein handelt. Diese Hypothese bleibt jedoch spekulativ, bis die subzelluläre Lokalisation des Proteins experimentell untersucht wird.

Eine genaue Betrachtung der Aminosäuresequenz von P300 ergab, dass die C-Terminale Hälfte sehr Glutamin-, Prolin- und Histidin reich ist. Dabei treten ungewöhnlich viele Wiederholungen (*repeats*) der Aminosäuren auf. In höheren Eukaryoten sind Proteine, die Polyglutamine enthalten, für die Manifestation von neurodegenerativen Krankheiten, wie Chorea Huntington ("Veitstanz") verantwortlich. Dabei führen Verlängerungen der Glutamin *repeats* im N-Terminus des Proteins Huntingtin zur Bildung von Proteinaggregaten (Smith D.F., 1998). Studien in *C. elegans* zeigten, dass die Überexpression eines Proteins mit Glutamin- und Prolinreicher Domäne die Zellen vor den toxischen Effekten des mutierten Huntingtins schützt (Faber P.W., 2002). In einer weiteren Studie führte die Einführung von zehn Prolinen, C-terminal der Polyglutamin Region, zu einer Abnahme der Proteinaggregation (Bhattacharyya A., 2006).

Vor diesem Hintergrund könnte eine ähnliche Funktion von P300 denkbar sein. Das Protein könnte möglicherweise indirekt an der Degradation von Proteinaggregaten beteiligt sein, die sich, ausgelöst durch verschiedene Stressoren, wie z.B. Miltefosin und SbIII, im Zytoplasma bilden. Die Wirkungs- und Resistenzmechanismen von Pentamidin sind dagegen mit dem Mitochondrium assoziiert, und P300 hätte keinen Einfluss auf geschädigte mitochondriale Proteine. Dies würde auch erklären, weshalb die Überexpression von *P300* keine Wirkung auf die Pentamidin-Toleranz zeigte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *P300* ein *Leishmania*-spezifisches, aber nicht Spezies-spezifisches Gen darstellt, vermutlich im Zytosol lokalisiert ist und kein Transporter Protein ist.

4.10 Ausblick

Die hier diskutierten Ergebnisse und Hypothesen zeigen, dass eine weiterführende Charakterisierung des P300-Genprodukts und der *P300*-vermittelnden Resistenz notwendig ist.

P300 wurde als ein Miltefosin-Resistenz-übertragendes Gen identifiziert. Die verstärkte Resistenz, die von *pcosM2* ausgeht, könnte an der zusätzlichen Überexpression von *P235* liegen. Durch Klonierung und Transfektion von *P235* in *L. infantum* WT kann diese Hypothese überprüft werden. Die gezielte Überexpression von *P235* wird derzeit bereits versucht.

Es besteht die Möglichkeit, dass nur bestimmte Abschnitte von P300, wie z.B. der N-Terminus für die Übertragung der Miltefosin-Resistenz verantwortlich sind. Sequenzanalysen zeigen, dass eine relativ hohe Sequenzidentität (54%) zwischen den N-Termini von P300 und P235 besteht. Ebenso könnte der Mittelteil und der C-Terminus von P300, welcher die Prolin, Glutamin und Histidin *repeats* enthält für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Durch enzymatische Modifikationen des P300-ORFs, und Transfektion der einzelnen Varianten in *L. infantum* WT, kann untersucht werden, welcher Teil des Proteins für die Vermittlung der Resistenz essentiell ist. Die Herstellung von verschiedenen P300-Varianten ist zurzeit in Arbeit.

Zur näheren Erforschung der P300-Funktion könnten Kreuzresistenzstudien mit synthetischen Analoga des Miltefosins, wie Edelfosin und Ilmofosin, beitragen. Für die künftige Anwendung von Kombinationstherapien ist es erforderlich, die Wirkungs- und Resistenzmechanismen der einzelnen Wirkstoffe zu verstehen, damit ausgeschlossen werden kann, dass zwei kombinierte Medikamente über denselben Mechanismus unwirksam werden. Aus diesem Grunde sollten besonders die Effekte von Chemotherapeutika, die zur Behandlung von VL eingesetzt werden, wie Amphotericin B und Paromomycin, in P300-überexprimierenden Promastigoten und Amastigoten untersucht werden.

Gen-*knockout* Studien von *P300* und auch *P235* können zur Funktionsanalyse der Proteine beitragen. Für solche *knockout* Analysen wäre *L. donovani* besser geeignet als *L. infantum*, da *P300* und *P235* im Genom als *single copy*-Gene vorliegen. Von weiterem Interesse ist die Frage, in welchen *Leishmania* Stämmen und Spezies die Überexpression von *P300* zur Miltefosin- bzw. SbIII-Resistenz führt.

Die Effekte der *P300*-Überexpression, die sowohl in Promastigoten als auch in intrazellulären Amastigoten beobachtet wurden, können im Maus-Modell überprüft werden. Die von Sulahian *et al.* (1997) durchgeführten Experimente zeigen, dass sich das BALB/c-Maus Modell für Infektionsexperimente mit dem in dieser Arbeit verwendeten *L. infantum* Stamm eignet. In einem Vorversuch muss die Miltefosin-Konzentration ermittelt werden, die zur Unterdrückung der Infektion in Mäusen führt, die mit *Li* [pcosTL] infiziert sind. Mit *Li* [pcosTL], *Li* [pcosP300] bzw. *LiP300*^{-/-} intravenös infizierte Mäuse können anschließend einer oralen Therapie mit Miltefosin unterzogen werden. Dabei sollte jeweils eine Kontroll-Gruppe unbehandelt bleiben. Nach Beendigung der Therapie können Leber und Milz der Mäuse entnommen werden. Abstriche der Organe können angefertigt werden, die anschließend mit Giemsa gefärbt werden. Ein Vergleich der Parasitenlast in Leber und Milz von Mäusen, die mit *Li* [pcosTL], *Li* [pcosP300] bzw. *LiP300*^{-/-} infiziert wurden, kann Aufschluss über die Resistenz *in vivo* geben.

5. Zusammenfassung

Leishmanien sind einzellige Parasiten, die beim Menschen unterschiedliche Krankheitsformen hervorrufen. Dabei stellt die viszerale Leishmaniose (VL) die schwerwiegendste Form dar, die unbehandelt zum Tod führt. Impfstoffe gegen die VL sind nicht vorhanden, ebenso wenig ist eine medizinische Prophylaxe möglich. Eine erfolgreiche Therapie mit den wenigen vorhandenen Medikamenten wird immer mehr durch die zunehmende Resistenzentwicklung beeinträchtigt. Miltefosin, ein neu entwickeltes Medikament, ist seit Ende 2002 zur Behandlung von VL in Indien zugelassen. Die Wirkungsmechanismen des Medikamentes sind zum größten Teil noch unbekannt. Es besitzt eine lange Halbwertszeit im Gewebe, und es konnten bereits Miltefosin-resistente *Leishmania*-Stämme *in vitro* selektiert werden. Aus diesem Grund wird in naher Zukunft auch mit dem Auftreten von klinischer Miltefosin-Resistenz gerechnet. In der vorliegenden Arbeit sollten daher genetische Marker in *Leishmania infantum*, dem Erreger der VL, identifiziert und charakterisiert werden, die mit Miltefosin-Resistenz korrelieren. Dies erfolgte mit Hilfe der funktionellen Komplementation.

- In früheren Experimenten wurde eine Cosmid-Genbank aus genomischer DNA von *L. infantum* in *L. infantum* transfiziert. Die rekombinanten Parasiten wurden einer Selektion mit Miltefosin unterzogen. Nach zwei aufeinander folgenden Selektionsrunden dominierten zwei Cosmidtypen, die pcosM1 und pcosM2 genannt wurden (M=Miltefosin). Dabei wurde das Cosmid pcosM2 am häufigsten aus überlebenden Parasiten reisoliert. *L. infantum*-Zellen, die mit pcosM1 und pcosM2 transfiziert wurden, zeigten einen deutlich erhöhten IC₅₀-Wert für Miltefosin.
- Morphologische Veränderungen der Parasiten, ausgelöst durch Miltefosin, wurden untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2], die zuvor mit hohen Miltefosin-Konzentrationen behandelt wurden, zeigten, dass sie deutlich vor morphologischen Veränderungen geschützt sind, im Gegensatz zu *L. infantum*, die nur mit dem Cosmidvektor pcosTL transfiziert wurden.
- Eine Analyse des DNA-Gehalts in Miltefosin-behandelten *Li* [pcosM1], *Li* [pcosM2] und *Li* [pcosTL]-Parasiten ergab, dass *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] vor einer Miltefosin-induzierten DNA-Degradation geschützt sind. Die erhöhten IC₅₀-Werte von *Li* [pcosM1] und *Li* [pcosM2] für Miltefosin, die elektronenmikroskopischen

Untersuchungen und die DNA-Degradationsanalyse bestätigten, dass die selektierten Cosmide pcosM1 und pcosM2 Miltefosin-Resistenz vermitteln.

- Zur Identifizierung des Gens bzw. der Gene, die für die Miltefosin-Resistenz verantwortlich sind, wurden Sequenzanalysen von beiden Cosmiden durchgeführt. Die Analyse ergab, dass die *inserts* von pcosM1 und pcosM2 überlappende Sequenzen besitzen. Sie überlappen in nur einem offenen Leserahmen, das für ein putatives 300 kDa Protein unbekannter Funktion kodiert.
- Die Überexpression des P300-Gens führte in *L. infantum* zu einer deutlichen Erhöhung des IC₅₀-Wertes der Parasiten für Miltefosin. In semi-quantitativen *real time* RT-PCR Analysen wurde die Überexpression von *P300* bestätigt. *P300* wurde als das Miltefosin-Resistenz vermittelnde Gen identifiziert.
- Mehrfache Versuche, spezifische P300-Antikörper zu gewinnen, schlugen fehl. Die Überexpression von P300 konnte nicht Immuno-Blot-Analysen überprüft werden, noch konnte die subzelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden.
- Die bisherigen Experimente wurden mit dem promastigoten Stadium (Insektenstadium) der Parasiten durchgeführt. Makrophagen-Infektionsexperimente haben gezeigt, dass die Cosmide auch in intrazellulären Amastigoten (Säugerstadium des Erregers) Miltefosin-Resistenz vermitteln.
- Die Überexpression von *P300* führt zur Resistenz gegenüber dreiwertigem Antimon, einem klassischem anti-*Leishmania* Wirkstoff. Dagegen konnte keine Resistenz der rekombinanten Parasiten gegenüber Pentamidin beobachtet werden.
- Ausgedehnte Datenbankrecherchen zur Charakterisierung des P300-Genprodukts lieferten keine Informationen. Um Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion des 300 kDa Protein zu erhalten, wurde eine Deletionsmutante hergestellt. Diese Mutante zeigte eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber Miltefosin. Die episomale Rückführung des Gens führte zur Wiederherstellung des WT-Phänotyps. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei *LiP300*^{-/-} die Teilungsrate in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geringer ist als beim *Li* WT. Hinsichtlich der Morphologie, der Makrophageninfektiosität und der Antimon-Sensitivität konnten jedoch keine Veränderungen des Phänotyps von *LiP300*^{-/-} festgestellt werden.

Mit Hilfe der funktionellen Komplementation wurde ein Gen isoliert, welches durch Überexpression Miltefosin- und Antimon-Resistenz vermittelt. Die Deletion dieses Gens

fürte zu einer deutlich erhöhten Miltefosin-Sensitivität der Parasiten. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit liefern die Grundlagen für zukünftige Arbeiten, wie eine weiterführende Charakterisierung des Gens. Dies sollte zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Miltefosin- und Antimon-Resistenz in *Leishmania* beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Mohammed H.I., C. M. L., and Bates P.A. (2005). Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3274-3280.
- Alvar J., C. C., Guterrez-Solar B., Jimenez M., Laguna F., Lopez-Velez R., Molina R. and Moreno J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical microbiology reviews* 10, 298-319.
- Ausubel F.M., B. R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley and Sons).
- Bailey H., a. B. W. J. (1959). Leishman-donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis* 35, 8-9.
- Basselin M., D. H., Coombs G.H., and Barrett M.P. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3731-3738.
- Basselin M., L. F. a. R.-G. M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem J* 315, 631-634.
- Berkovic D., B. K., Fleer E.A., Eibl H. and Unger C. (1994). Inhibition of calcium-dependent protein kinase C by hexadecylphosphocholine and 1-O-octadecyl-2-O-methylglycero-3-phosphocholine do not correlate with inhibition of proliferation of HL60 and K562 cell lines. *Eur J Cancer* 30A, 509-515.
- Berman J. D., G. J. V. a. B. J. M. (1987). Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* promastigotes. *Biochem Pharmacol* 36, 197-201.
- Beverley S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45, 417-444.
- Beverley S.M. (2003). Protozoomics: Trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nature Reviews Genetics* 4, 11-19.
- Bhattacharya S.K., J. T. K., Sundar S., Thakur C.P., Engel J., Sindermann H., Junge K., Karbwang J., Bryceson A. and Berman J. (2004). Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 38, 217-221.
- Bhattacharyya A., T. A. K., Chellgren V.M., Thiagarajan G., Williams A.D., Chellgren B.W., Creamer T.P., and Wetzel R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol* 355, 524-535.
- Birnboim H. C., a. D. J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bogdan C., a. R. M. (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J for Parasitol* 28, 121-134.

- Bogdan C., R. M., and Solbach W. (1990). Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today* 6, 183-187.
- Boggs KP, R. C., Jackowski S (1995a). Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl- rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J Biol Chem* 270, 7757-7764.
- Borst P., a. O. M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 49.
- Boucher N., W. Y., Dumas C., Dube M., Sereno D., Breton M., and Papadopoulou B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277, 19511-19520.
- Bouvier J., B. C., Vogel H., Reichelt R. and Etges R. (1989). Characterization of the promastigotes surface protease of *Leishmania* as a membranebound zinc endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 37, 235-245.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7, 248-254.
- Brittingham A., M. J. C., McMaster W.R., McGwire B.S., Chang K.P. and Mosser D.M. (1995). Role of *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology* 155, 3102-3111.
- Bryceson A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine and International Health* 6, 928-934.
- Callahan H.L., P. A. C., Devereaux R., and Grogl M. (1997). An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 818-822.
- Chan J., F. T., Brennan P., McNeil M., Turco S.J. Sibille J.C., Snapper M., Aisen P. and Bloom B.R. (1989). Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5910-5914.
- Chaudhuri G., C. M., Pan A. and Chang K.P. (1989). Surface acid proteinase gp63 of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem* 264, 7483-7489.
- Chiquero M.J., P.-V. J. M., O'Valle F., González-Ros J.M., del Moral R.G., Ferragut J.A., Castanys S., and Gamarro F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* 55, 131-139.
- Clayton C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21, 1881-1888.
- Clos J., a. B. S. (1994). pJC20 and pJC40 - two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* 5, 133-137.

- Clos J., a. C. K. (2006). Functional cloning as a means to identify *Leishmania* genes involved in drug resistance. *Mini Rev Med Chem* 6, 123-129.
- Coelho A.C, B. S. M., and Cotrim P.C. (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 130, 83-90.
- Cotrim P.C., G. L. K. a. B. S. M. (1999). Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J Biol Chem* 274, 37723-37730.
- Croft S.L., a. E. J. (2006). Miltefosine-discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100S, S4-S8.
- Croft S.L., a. Y. V. (2002). Chemotherapy of Leishmaniasis. *Current pharmaceutical design* 8, 319-342.
- Croft S.L., N. R. A., Pendergast W. and Chan J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 36, 2633-2636.
- Croft S.L., S. K. a. Y. V. (2006a). Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 399-410.
- Croft S.L., S. S., and Fairlamb A.H. (2006b). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 111-126.
- Croft S.L., Y. V., and Kendrick H. (2002b). Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, S127-129.
- Cruz A., a. B. S. M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* 348, 171-173.
- Cruz A., T. R. a. B. S. M. (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1599-1603.
- de Castro S.L., S.-R. R. M., Urbina J.A. and Croft S.L. (2004). Antiprotozoal lysophospholipid analogues: A comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. *Mini Rev Med Chem* 4, 141-151.
- Dermine J.F., S. S., Prive C., Descoteaux A., and Desjardins M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbio* 2, 115-126.
- Descoteaux A., A. H. A., Zhang K., Turco S.J. and Beverley S.M. (2002). *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J* 21, 4458-4469.
- Descoteaux A., L. Y., Turco S.J. and Beverley S.M. (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269, 1869-1872.
- Descoteaux A., M. G. a. T. S. J. (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 149, 3008-3015.

- Desjardins M., a. D. A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185, 2061-2068.
- Desjeux P. (2001). Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 190, 77-79.
- Di Giorgio C., F.-G. F., Imbert A, Minodier P., Gasquet M. and Dumon H. (1999). Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 44, 71-76.
- Dodge M.A., W. R. F., Chow L.M.C., Zaman M.M., Cotton L. M., McConville M.J. and Wirth D.F. (2004). Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol* 51, 1563-1575.
- Dumas C., O. M., Tovar J., Cunningham M.L., Fairlamb A.H., Tamar S., Olivier M., and Papadopoulou B. (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J* 16, 2590-2598.
- Ellenberger T.E., a. B. S. M. (1987). Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. *J Biol Chem* 262, 13501-13506.
- Escobar P., M. S., Marques C., and Croft S.L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81, 151-157.
- Escobar P., Y. V. a. C. S. L. (2001). Activities of hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBiosome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient *scid* mice. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1872-1875.
- Faber P.W., V. C., King D.C., Bates E.A., and Hart A.C. (2002). Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 17131-17136.
- Feinberg A.P., a. V. B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Annal Biochem* 132, 6-13.
- Fleer E.A., B. D., Grunwald U., and Hiddemann W. (1996). Induction of resistance to hexadecylphosphocholine in the highly sensitive human epidermoid tumour cell line KB. *Eur J Cancer* 32A, 506-511.
- Fu D., S. Z., and Wang Y. (1999). Bcl-2 plays a key role instead of mdr1 in the resistance to hexadecylphosphocholine in human epidermoid tumor cell line KB. *Cancer Lett* 142.
- Fulton J.D., a. J. L. P. (1949). Studies on protozoa: the metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 43, 273-286.
- Geilen C.C., W. T., and Reutter W. (1992). Hexadecylphosphocholine inhibits translocation of CTP:choline-phosphate cytidylyltransferase in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 267, 6719-6724.

- Gessner A., B. C. a. R. M. (1994). Molekulare und Immunologische Parasitology. Leishmaniose (Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- Gourbal B., S. N., Bhattacharjee H., Legare D., Sundar S., Ouellette M., Rosen B.P., and Mukhopadhyay R. (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279, 31010-31017.
- Grunicke H.H., M. K., Uberall F., Schubert C., Kindler E., Stekar J and Brachwitz H. (1996). Cellular signalling as a target in cancer chemotherapy. Phospholipid analogues as inhibitors of mitogenic signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 36, 385-407.
- Haase R., W. T., Geilen C.C. and Reutter W. (1991). The phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Derby canine kidney cells. *FEBS Lett* 288, 129-132.
- Haimeur A., a. O. M. (1998). Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Jul;42(7): 1689-94 42, 1689-1694.
- Haimeur A., B. C., Genest P., Papadopoulou B., and Ouellette M. (2000). Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 108, 131-135.
- Handman E. (1997). *Leishmania* vaccines: Old and New Parasitology Today 13, 236-238.
- Hannaert V., B. F., Opperdoes F.R., and Michels P.A. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11.
- Harms-Zwingenberger G., a. B. U. (1993). Tropenmedizin in Klinik und Praxis-Leishmaniosen (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York).
- Hermoso T., F. Z., Becker S., Hirschberg K. and Jaffe C.L. (1991). *Leishmania* protein kinases phosphorylate components of the complement cascade. *EMBO J* 10, 4061-4067.
- Hilgard P., K. T., Stekar J., and Unger C. (1993). Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 90-95.
- Hoyer C., Z. D., Fleischer S., Schilhabel M., Kroemer M., Platzer M. and Clos J. (2004). A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest. *International Journal for parasitology* 34, 803-811.
- Ivens AC, P. C., Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciaroni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp

- S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, and Myler PJ (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- Jendrossek V., a. H. R. (2003). Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents* 3, 343-353.
- Jha S.N., S. N. K. a. J. T. K. (1991). Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India* 39, 314-316.
- Jimenez-Lopez J.M., C. M. P., Segovia J.L. and Marco C. (2003). Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine synthesis via both the methylation of phosphatidylethanolamine and CDP-choline pathways in HePG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 153-161.
- Joshi P.B., S. D. L., Modi G. and McMaster W.R. (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stagespecific leishmanolysin gp63 . *Mol Microbiol* 27, 519-530.
- Kamhawi S., R.-O. M., Pham V.M., Kumar S., Lawyer P.G., Turco S.J., Barillas-Mury C., Sacks D.L. and Valenzuela J.G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119, 329-341.
- Kapler G.M., C. C. M., and Beverley S.M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 10, 1084-1094.
- Kaur K., C. T., Emmett K., and Ullman B. (1988). Methotrexate-resistant *Leishmania donovani* genetically deficient in the folate-methotrexate transporter. *J Biol Chem* 263, 7020-7028.
- Kedzierski L., Z. Y., and Handman E. (2006). *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitol* 133, Suppl: S87-112.
- Kelly J.M., D. P., and Tomas A.M. (1994). An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Mol Biochem Parasitol* 65.
- Khamesipour A., R. S., Davoudi N., Maboudi F. and Modabber F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian J Med Res* 123, 423-438.
- Kuhlencord A., M. T., Eibl H. J. and Unger C. (1992). Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1630-1634.
- Kyse-Andersen J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 87, 203-209.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- LeBowitz J.H., S. H. Q., Rusche L., and Beverley S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7, 996-1007.
- Légaré D., R. D., Mukhopadhyay R., Stierhof Y.D., Rosen B.P., Haimeur A., Papadopoulou B., and Ouellette M. (2001). The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 276, 26301-26307.
- Leprohon P., L. D., Girard I., Papadopoulou B., and Ouellette M. (2006). Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasite. *Eukaryot Cell* 5, 1713-1725.
- Lira R., C. L. M., Santa-Rita R.M. and Urbina J.A. (2001). Mechanism of action of anti-proliferate lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 537-546.
- Loiseau P.M., a. B. C. (2006). Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Current Topics in Medical Chemistry* 6, 539-550.
- Lux H., H. N., Klenner T., Hart D. and Opperdoes F. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 111, 1-14.
- Maarouf M., L. F., Croft S.L. and Robert-Gero M. (1995). Ribosomes of *Leishmania* are target for the aminoglycosides. *Parasitol Res* 81, 421-425.
- Matthews K.R., T. C., and Ullu E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8, 491-501.
- McNeely T.B., R. G., Londener M.V. and Turco S.J. (1989). Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J* 259, 601-604.
- McNicoll F., M. M., Cloutier S., Boilard N., Rochette A., Dubé M., and Papadopoulou B. (2005). Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 280, 35238-35246.
- Miroux B., a. W. J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-298.
- Mittal M.K., R. S., Ashutosh, Ravinder, Gupta S., Sundar S., and Goyal N. (2007). Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 76, 681-688.
- Mukherjee A., P. P. K., Singh S., Roy G., Girard I., Chatterjee M., Ouellette M., and Madhubala R. (2007). Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 59, 204-211.

- Murray H.W., a. D.-E. S. (2000). Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J Infect Dis* 181, 795-799.
- Myler PJ, B. S., Cruz AK, Dobson DE, Ivens AC, McDonagh PD, Madhubala R, Martinez-Calvillo S, Ruiz JC, Saxena A, Sisk E, Sunkin SM, Worthey E, Yan S, Stuart KD (2001). The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol* 190, 9-12.
- Nicoletti I., M. G., Pagliacci M.C., Grignani F. and Riccardi C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.
- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Ossewaarde J.M., d. V. A., Bestebroer T. and Angulo A.F. (1996). Application of a *Mycoplasma* group-specific PCR for monitoring decontamination of *Mycoplasma*-infected *Chlamydia* sp. strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 328-331.
- Ouellette M. (2001). Biochemical and molecular mechanisms of the drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health* 6, 874-882.
- Ouellette M., D. J., Papadopoulou B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 7, 257-266.
- Paris C., L. P. M., Bories C. and Breard J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 852-859.
- Passwell J., S. R., Smolen J., and Jaffe C. (1994). Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int J Exp Pathol* 75, 277-284.
- Peacock CS, S. K., Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- Perez-Victoria F.J., C. S. a. G. F. (2003a). *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2397-2403.
- Perez-Victoria F.J., G. F., Ouellette M. and Castanys S. (2003b). Functional cloning of the miltefosine transporter. *J Biol Chem* 278, 49965-49971.
- Perez-Victoria F.J., S.-C. M. P., Castanys S. and Gamarro F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both LdMT and the new protein LdRos3 in *Leishmania* Parasites. *J Biol Chem* 281, 23766-23775.
- Perez-Victoria J.M., P.-V. F. J., Parodi-Talice A., Jimenez I.A., Ravelo A. G., Castanys S. and Gamarro F. (2001). Alkyl-Lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania*

- tropica* and chemosensitization by a novel p-glycoprotein-like transport modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2468-2474.
- Piekarski, H. M. a. G. (2002). *Grundriß der Parasitenkunde*, 6th edn (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).
- Pimenta P., M. G. B., Pereira S.T., Shahabuddin M. and Sacks D.L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology* 115, 359-369.
- Pimenta P., S. E., Rowton E., Modi G., Garraway L., Beverley S., Turco S. and Sacks D. (1994). Evidence that the vectoral competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 91.
- Pimenta P., T. S., McConville M., Lawyer P., Perkins P. and Sacks D. (1992). Stagespecific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256, 1812-1815.
- Polson A., a. W. B. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolk of immunized hens. *Immunol Communications* 9, 475-493.
- Polson A., C. T., Kruger J., von Maltzahn E. and van der Merwe K.J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolk of eggs laid by immunized hens. *Immunol Investigations* 14, 323-327.
- Proudfoot L., O. D. C. A. a. L. F. Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxid synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 25, 745-750.
- Puentes S.M., d. S. R. P., Sacks D.L., Hammer C.H. and Joiner K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* 145, 4311-4316.
- Rakotomanga M., B. S., Gaudin K., Chaminade P. and Loiseau P.M. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1425-1430.
- Rakotomanga M., S.-P.-C. M., and Loiseau P.M. (2005). Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and the consequences of drug-membrane interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2677-2686.
- Ramesh V., a. M. A. (1995). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Int J Dermatol* 34, 85-91.
- Renart J., R. J. a. S. G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-31120.
- Ryan K.A., G. L. A., Descoteaux A., Turco S.J. and Beverley S.M. (1993). Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8609-8613.

- Rybczynska M., L. R., Lu P., Sharom F.J., Steinfels E., Pietro A.D., Spitaler M., Grunicke H., and Hofmann J. (2001a). MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. *Br J Cancer* 84, 1405-1411.
- Sacerdoti-Sierra N., S.-T. M. M., Shapira M. and Jaffe C.L. (1997). *Leishmania* protein kinases and parasite survival. Abstr.1. *Acta Parasitol Turc 21 (Suppl): 3*.
- Sacks D., S. E., Turco S. and Pimenta P. (1994). The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 108, 55-62.
- Sacks D.L., P. P. F. P., McConville M.J., Schneider P. and Turco S.J. (1995a). Stagespecific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181, 685-697.
- Saiki R.K., G. D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook J., F. E. F. a. M. T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York).
- Sanger F., N. S. a. C. A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Santa-Rita R.M., H.-P. A., Barbosa H.S. and de Castro S.L. (2004). Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 54, 704-710.
- Schlüter A., W. M., Hoyer C., Fleischer S., Klaholz L., Schmetz C. and Clos J. (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 1491, 65-74.
- Schwartz D. C., a. C. C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Scott D.A., C. G. H., Sanderson B.E.. (1987). Effects of methotrexate and other antifolates on the growth and dihydrofolate reductase activity of *Leishmania* promastigotes. *Biochem Pharmacol* 36, 2043-2045.
- Segovia M. (1994). *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 88, 123-130.
- Seifert K., M. S., Perez-Victoria F.J., Castanys S., Gamarro F. and Croft S.L. (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 380-387.
- Selvapandiyan A., D. R., Debrabant A., Lee N., Sreenivas G., Salotra P. and Nakhasi H.L. (2006). Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 455-466.

- Sereno D., C. M., Zemzoumi K., Maquaire S., Quaissi A. and Lemesre J.L. (1998). Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3097-3102.
- Sereno D., H. P., Mangot I., Cuny G., Ouaiissi A., and Lemesre J.L. (2001). Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2064-2069.
- Shaha, C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* **123**, 233-244.
- Shaked-Mishan P., U. N., Ephros M. and Zilberstein D. (2001). Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, 3971-3976.
- Simpson J.A., W. E. R., Price R.N., Aarons L., Kyle D.E. and White N.J. (2000). Mefloquine pharmacokinetic-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3414-3424.
- Sindermann H., E. K. R., Fischer C. and Bommer W. (2004). Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: Compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clin Infect Dis* **39**, 1520-1523.
- Singh A.K., P. B. a. O. M. (2001). Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp Parasitol* **99**, 141-147.
- Singh N. (2006). Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* **123**, 411-422.
- Smith D.F., W. L., and Katsanis E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol Rev* **50**, 493-514.
- Sogin M.L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 457-463.
- Soto J., A. B. A., Toledo J., Rizzo N., Vega J.C., Diaz A., Luz M., Gutierrez P., Arboleda M., Berman J.D., Junge K., Engel J. and Sindermann H. (2004). Miltefosin for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **38**, 1266-1272.
- Soto J., T. J., Valda L., Balderrama M., Rea I., Parra R., Ardiles J., Soto P., Gomez A., Molleda F., Fuentelsaz C., Anders G., Sindermann H., Engel J. and Berman J.D. (2007). Treatment of bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis* **44**, 350-356.
- Stiles J.K., H. P. I., Shah P.H., and Meade J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* **93**, 781-807.
- Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**, 849-854.
- Sundar S., G. L. B., Rastogi V., Agrawal G. and Murray H.W. (2000b). Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**, 200-204.

- Sundar S., J. T. K., Thakur C.P., Engel J., Sindermann H., Fischer C., Junge K., Bryceson A. and Berman J. (2002). Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine* 347, 1739-1746.
- Sundar S., M. D. K., Singh M.K., Singh V.P., Sharma S., Makharia A., Kumar P.C. and Murray H.W. (2000a). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31, 1104-1107.
- Sunkin S.M., K. P., Myler P.J., Stuart K. (2000). The size difference between leishmania major friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Mol Biochem Parasitol* 109, 1-15.
- Teklemariam S., H. A. G., Frommel D., Miko T.L., Ganlov G. and Bryceson A. (1994). Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88, 334-339.
- Titus R. G., T. S. M., Shankar A. and Hall L.R. (1993). *Macrophages Pathogen Interactions: Interactions between Leishmania and macrophages*. (New York: Marcel Dekker).
- Towbin H., S. T. a. G. J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Ullu E., M. K. R., and Tschudi C. (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* 13, 720-725.
- Unger C., a. E. H. (2001). Arzneimittelentwicklung aus Phospholipiden. *Onkologie* 24 (Suppl 1), 18-23.
- van Kuppeveld F.J.M., v. d. L. J. T. M., Angulo A.F., van Zoest M.J., Quint W.G.V., Niesters H.G.M., Galama J.M. D., and Melchers W.J.G. (1992). Genus- and spezie-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2606-2615.
- Vaux D.L., a. S. A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2239-2244.
- Vergnes B., G. B., Girard I., Sundar S., Drummelsmith J. and Ouellette M. (2007). A proteomic screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpin-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6, 88-101.
- Verma N.K., D. C. S. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 3010-3015.
- Verma N.K., S. G. a. D. C. (2007). Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 116, 1-13.
- White N.J., a. P. W. (2003). The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc Biol Sci* 270, 545-554.

- Wieder T., O. C. E., and Geilen C.C. (1998). Induction of ceramid-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem* 273, 11025-11031.
- Wieder T., R. W., Orfanos C.E., and Geilen C.C. (1999). Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog Lipid Res* 38, 249-259.
- Wiesgigl M., a. C. J. (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.
- Wincker P., R. C., Blaineau C., Pages M., Jauffret Y., Dedet J.P and Bastien P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research* 24, 1688-1694.
- Wyllie S., C. M. L. a. F. A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 39925-39932.
- Yanisch-Perron C., V. J. a. M. J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Zijlstra E.E., a. e.-H. A. M. (2001). Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95, S59-76.
- Zilberstein D., a. S. M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48, 449-470.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Joachim Clos, möchte ich herzlich für die Vergabe des Themas, und die engagierte Betreuung und Förderung während meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Streit danke ich für seine Tätigkeit als Gutachter meiner Arbeit.

Für die Sequenzanalyse von pcosM2 möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Reinhardt und Herrn Dr. Michael Kube vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik in Berlin bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Anne MacDonald und Manfred Krömer für die Durchführung der Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Dorothea Zander für die Durchführung und Auswertung der *real time* RT-PCR. Allen drei danke ich außerdem für die gelegentliche Pflege meiner Zellkulturen. Weiterhin gilt mein Dank Juan Alzate für die Anleitung im Umgang mit dem Durchflusszytometer und für seine wertvollen Anregungen. Katja Mellenthin möchte ich für die Überlassung der *L. infantum* Cosmidbank danken. Desweiteren danke ich Stefanie Schmidt für die Weiterführung der Experimente, während meiner letzten Wochen im Labor.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Leishmaniasis, besonders den ehemaligen, danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und Motivation an schlechten Tagen, die auch vom anderen Ende der Welt ankam. Es war eine gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit, die ich sehr vermissen werde. Ein Dankeschön geht auch an ehemalige und jetzige Mitglieder der Arbeitsgruppen Bruchhaus, Wiese, Heussler, und Klinkert, für die wunderbare Zeit am BNI.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch während meiner Zeit am BNI.

Lebenslauf

Kohelia Choudhury

Studium

- März 2002 – Nov. 2007: Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg unter der Leitung von PD Dr. Joachim Clos: "Ein dupliziertes Gen aus *Leishmania infantum* (Nicoll, 1908) vermittelt Resistenz gegen Miltefosin und Antimon". Abschluss: Promotion
- Okt. 1995 - Okt. 2001: Studium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Immunologie und Organische Chemie
Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg unter der Leitung von PD Dr. Joachim Clos: "Identifizierung von Thermotoleranz - vermittelnden Genen in *Leishmania donovani*"
Abschluss: Diplom

Schulbildung

- Aug. 1986 - Juli 1995: Gymnasium Ohmoor, Hamburg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- Aug. 1982 - Juni 1986: Grundschule Moorflagen, Hamburg

Praktische Arbeit im Rahmen der Promotion

- Jan. 2001 - Mai 2003 wissenschaftliche Hilfskraft am Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
- Mai 2003 - Dez. 2006 wissenschaftliche Angestellte am Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg

Publikationen

Choudhury, K., Zander, D., Kube, M., Reinhardt, R. and Clos, J. (in prep.) A duplicated *Leishmania infantum* gene mediating resistance to both miltefosine and antimonyl tartrate.

Clos, J. and Choudhury, K. (2006) Functional Cloning as a means to identify leishmania genes involved in drug resistance. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry Vol. 6 : 123-129.