

Identifizierung Tropismus-relevanter Gene aus *Leishmania donovani* (ROSS, 1903) durch genetische Komplementation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Katja Mellenthin

aus Bremen

Hamburg 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Leishmania</i>: Lebenszyklus und Invasionsmechanismen	1
1.2 Leishmaniasis	3
1.2.1 Viszerale Leishmaniase	5
1.2.2 Cutane Leishmaniase.....	6
1.2.3 Mucocutane Leishmaniase.....	7
1.3 Immunologie und Pathogenese	7
1.3.1 Humane Leishmaniasis.....	9
1.3.1.1 Viszerale Leishmaniase	9
1.3.1.2 Cutane Leishmaniase	9
1.3.2 Experimentelle Leishmaniasis im Tiermodell	9
1.3.2.1 <i>L. donovani</i> -Infektion im Tiermodell	10
1.3.2.2 <i>L. major</i> -Infektion im Tiermodell	11
1.4 Virulenz und Tropismus von <i>Leishmania</i>	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	16
2.1.2 Weitere Materialien und Geräte.....	17
2.1.3 Enzyme	18
2.1.4 Marker	18
2.1.5 Antikörper.....	18
2.1.6 Bakterienstämme.....	19
2.1.7 <i>Leishmania</i> -Stämme.....	19
2.1.8 Vektoren und Plasmide.....	19
2.1.9 Oligonukleotide.....	20
2.1.10 Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....	21
2.1.11 Häufig verwendete Medien.....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellkultur	22
2.2.2 Einfrieren von Stammkulturen.....	22
2.2.3 <i>In vitro</i> -Kultivierung von axenischen Amastigoten.....	23
2.2.4 Transfektion durch Elektroporation	23
2.2.5 Mausinfektionsexperimente mit rekombinanten <i>L. major</i>	23
2.2.6 <i>Limiting dilution</i> -Analyse.....	24
2.2.7 Selektion von Einzelklonen	24
2.2.8 <i>In vitro</i> -Makrophageninfektion.....	24

2.2.9 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Leishmania</i> -Zellen	25
2.2.9.1 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA zur Herstellung der Cosmid-Genbank	25
2.2.9.2 Isolierung von genomischer DNA mit Hilfe des <i>Puregene DNA Purification Kit</i> (Gentra Systems)	26
2.2.10 Herstellung einer Cosmid-Genbank	26
2.2.10.1 Partialverdau genomischer DNA.....	26
2.2.10.2 Ligationsreaktion mit dem Cosmidvektor pcosTL.....	27
2.2.10.3 <i>In vitro</i> -Verpackung.....	27
2.2.10.4 Vorbereitung der Wirtsbakterien.....	28
2.2.10.5 Infektion von <i>E. coli</i> und Bestimmung der Effizienz der Verpackungsreaktion	28
2.2.10.6 Amplifikation der Cosmid-Genbank und Bestimmung des Titers.....	28
2.2.11 Transformation.....	29
2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.2.12.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Mini-Präparation).....	29
2.2.12.2 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Midi-Präparation).....	29
2.2.12.3 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation).....	30
2.2.13 Isolierung von Cosmid-DNA.....	30
2.2.13.1 Präparation von Cosmid-Genbank-DNA.....	30
2.2.13.2 Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien	31
2.2.14 Enzymatische Modifizierung von DNA.....	31
2.2.14.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
2.2.14.2 Dephosphorylierung von DNA	32
2.2.14.3 Klenow-Auffüllreaktion zur Herstellung glatter Enden	32
2.2.14.4 Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.15 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion.....	32
2.2.15.1 Multiplex-PCR	34
2.2.15.2 <i>Real time</i> -PCR.....	34
2.2.16 Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.16.1 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	36
2.2.17 DNA-Sequenzierung	36
2.2.18 Herstellung von DNA-Sonden.....	37
2.2.18.1 Digoxigenin-markierte DNA-Sonden.....	37
2.2.18.2 Radioaktiv markierte DNA-Sonden	38
2.2.19 Transfer von DNA auf eine Membran.....	38
2.2.19.1 Southern-Blot	38
2.2.19.2 Kolonie-Transfer	38
2.2.20 Hybridisierung von Membranen und Nachweis definierter DNA-Sequenzen	39
2.2.20.1 Hybridisierung.....	39

2.2.20.2 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierter DNA	39
2.2.20.3 Autoradiographie	40
2.2.21 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> zur Antigen-Gewinnung	40
2.2.21.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> BL21(DE3)[pAPlacI ^Q].....	40
2.2.21.2 Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)[pAPlacI ^Q]	41
2.2.21.3 Aufreinigung der Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie	41
2.2.21.4 Fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid	42
2.2.22 Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY).....	42
2.2.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.2.24 Anfärbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blau	44
2.2.25 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot).....	44
2.2.26 Immunologischer Nachweis von auf einer Membran immobilisierten Proteinen (Immun-Blot).....	44
2.2.27 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) zur Zytokinbestimmung.....	45
2.2.28 Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
2.2.29 Elektronische Bildbearbeitung.....	46
2.2.30 Statistische Auswertung.....	46
3. Ergebnisse	48
3.1 Herstellung einer genomischen DNA-Bibliothek von <i>L. donovani</i> in einem Cosmid- vektor.....	48
3.1.1 Durchschnittliche Verpackungseffizienz und Repräsentativität der Cosmid-DNA- Genbank.....	48
3.1.2 Überprüfung der Heterogenität	48
3.2 Herstellung rekombinanter <i>L. major</i> durch Transfektion mit <i>L. donovani</i>- Cosmidbank-DNA.....	49
3.2.1 Transfektionseffizienz	49
3.2.2 Analyse der Diversität innerhalb der rekombinanten <i>L. major</i>	50
3.3 <i>In vivo</i>-Selektion rekombinanter <i>L. major</i> in BALB/c-Mäusen	50
3.4 Vergleichende Untersuchungen zur Infektiosität von <i>L. major</i> [pcosVL-1] und <i>L.</i> <i>major</i> [pcosTL].....	54
3.4.1 <i>In vitro</i> -Makrophageninfektion.....	55
3.4.2 Infektion von BALB/c-Mäusen	56
3.4.2.1 Infektionsverlauf.....	56
3.4.2.2 Milzgewichte.....	56
3.4.2.3 Parasitenlast in der Milz.....	57
3.4.2.4 Zytokine	58
3.5 Sequenzanalyse von pcosVL-1.....	58
3.6 Vom Cosmid zum Gen – Identifizierung relevanter <i>open reading frames</i>	60
3.6.1 Durchmusterung der <i>L. donovani</i> -Cosmid-Genbank nach pcosVL-1-Homologen	60

3.6.2 Transfektion von <i>L. major</i> mit pcosVL-1-Homologen und <i>in vivo</i> -Selektion	61
3.7 Rekombinante Expression von ORF2 und ORF3 in <i>E. coli</i>	65
3.7.1 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine zur Antigen-Gewinnung	66
3.7.2 Gewinnung von Antikörpern	69
3.8 Vergleichende Untersuchungen zur Überexpression von ORF2 und ORF3 in <i>L. major</i>.....	70
3.8.1 Klonierung von ORF2 und ORF3 in das Expressionsplasmid pIRSAT-3 und Herstellung rekombinanter <i>L. major</i> durch stabile Integration	71
3.8.2 Analyse rekombinanter <i>L. major</i> auf Überexpression von ORF2 bzw. ORF3.....	72
3.8.3 <i>In vivo</i> -Selektion von <i>L. major</i> [pIR/ORF2] und <i>L. major</i> [pIR/ORF3].....	74
3.9 Charakteristika von LdSTF1.....	77
3.9.1 Bestimmung der Genkopienzahl.....	77
3.9.2 Untersuchung der Expressionskinetik.....	79
3.9.3 Nachweis der intrazellulären Lokalisation	80
3.10 Vergleichende Untersuchungen zur Infektiosität von <i>L. major</i> [pIR/LdSTF1] und <i>L. major</i> [pIR] während der Infektion von BALB/c-Mäusen.....	82
3.10.1 Infektionsverlauf	82
3.10.2 Milzgewichte.....	82
3.10.3 Parasitenlast in Milz und Lymphknoten.....	82
3.10.4 Zytokinproduktion im Milzgewebe.....	84
4. Diskussion	86
4.1 Genetische Komplementation als Strategie zur Identifizierung bzw. Funktionsanalyse von Genen.....	86
4.2 <i>In vivo</i>-Selektion rekombinanter <i>L. major</i>.....	88
4.2.1 Problematik des <i>L. major</i> /BALB/c-Maus-Infektionsmodells.....	88
4.2.2 Unterschiedlicher Selektionsdruck in Lymphknoten und Milz	90
4.3 <i>L. major</i>[pcosVL-1] verursacht Splenomegalie in BALB/c-Mäusen	91
4.4 LdSTF1 ist für den Milztropismus rekombinanter <i>L. major</i> in BALB/c-Mäusen verantwortlich.....	94
4.5 Ausblick.....	99
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cfu	<i>colony forming unit</i>
CG	<i>circle grow</i> -Medium
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase)
CL	cutane Leishmaniase
cm	Zentimeter
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
d	Tag
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(beta-aminomethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Farad
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GuaHCl	Guanidiniumhydrochlorid
G418	Geneticin (Selektionsantibiotikum)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hi	hinten
Hsp	Hitzeschockprotein

IFN	Interferon
IgY	Immunglobulin aus dem Eidotter
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
i.v.	intravenös
k	Kilo-
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>Leishmania spp.</i>	<i>Leishmania species</i>
ln	natürlicher Logarithmus
LPG	Lipophosphoglykan
M	molar
m	Milli-
Mb	Megabasen
MCL	mucocutane Leishmaniase
MES	2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure
min	Minute
□	mikro
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
n	nano
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
re	rechts
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>standard saline citrate</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetatessigsäure
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratessigsäure
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	enzymatische Einheit

upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VL	viszerale Leishmaniase
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WT	Wildtyp
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 *Leishmania*: Lebenszyklus und Invasionsmechanismen

Leishmania spp. sind trypanosomatide Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida, die sich durch einen biphasischen Lebenszyklus auszeichnen. Im Insektenwirt leben die Parasiten extrazellulär im Darmlumen als begeißelte, 15-25 μm lange, promastigote Formen. Im Wirbeltier existieren Leishmanien fast ausschließlich intrazellulär als 2-5 μm große, unbegeißelte Amastigote in den Zellen des retikuloendothelialen Systems. Die Vermehrung erfolgt in beiden Stadien durch Zweiteilung.

Weibliche Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* (Alte Welt) bzw. *Lutzomyia* (Neue Welt) nehmen bei einer Blutmahlzeit amastigote Stadien enthaltende Makrophagen aus der Haut oder dem Blut eines infizierten Wirtes auf. Im Mitteldarm der Sandmücke werden die Amastigoten aus den Makrophagen freigesetzt und differenzieren innerhalb von ca. 24 h zu prozyklischen promastigoten Formen. Die Parasiten befinden sich während der ersten 2 Tage innerhalb der die Blutmahlzeit umschließenden peritrophen Membran. Diese bildet eine Barriere, die die Leishmanien vor dem Angriff hydrolytischer Enzyme schützt (Pimenta *et al.*, 1997). Die prozyklischen Promastigoten synthetisieren an ihrer Oberfläche eine dichte Glykokalyx, die hauptsächlich aus Lipophosphoglykan-Molekülen (LPG) besteht (Beverley & Turco, 1998). Nach dem Auflösen der peritrophen Membran heften sich die Promastigoten über das Oberflächenmolekül LPG an das Mitteldarmepithel der Sandmücke und beginnen, sich zu vermehren. Diese Anheftung an das Darmepithel ist vektorspezifisch, d.h. gelangen die Leishmanien nicht in ihren natürlichen Insektenwirt, kann der Anheftungsprozess nicht stattfinden, und die Parasiten werden mit der verdauten Blutmahlzeit wieder ausgeschieden (Sacks *et al.*, 1994). Nach 5-7 Tagen stellen die prozyklischen Promastigoten die Teilung ein und wandeln sich in so genannte metazyklische Promastigote um. Diese sind hoch infektiös und können aufgrund von Strukturveränderungen ihres LPG nicht mehr an das Darmepithel binden (Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995a). Die metazyklischen Stadien wandern über den Vorderdarm in Ösophagus und Pharynx; von dort können sie durch Regurgitation der Mücke bei der nächsten Blutmahlzeit wieder übertragen werden. An diesem Prozess ist wahrscheinlich die enzymatische Zerstörung der Valvula cardiaca, die normalerweise den Nahrungsrückfluss vom Darm zum Pharynx verhindert, beteiligt (Schlein *et al.*, 1992).

Beim Eintritt in den Säugerwirt sind Parasiten im allgemeinen zwei Immunmechanismen ausgesetzt: der Komplement-vermittelten Lyse sowie der Zerstörung durch Phagozyten. Die Leishmanien haben besondere Strategien entwickelt, über die sie einerseits einer direkten Zerstörung entgehen und mit Hilfe derer sie andererseits sogar in der Lage sind, Phagozyten als Wirtszellen zu nutzen; diese Mechanismen sollen im folgenden erläutert werden.

Im Gegensatz zu prozyklischen Promastigoten weisen metazyklische Promastigote eine Resistenz gegen Komplement-vermittelte Lyse auf. Diese korreliert mit Modifikationen im LPG während der Metazyklogenese (Sacks *et al.*, 1995a), wodurch der Membranangriffskomplex C5b-C9 spontan von der Oberflächenmembran der Parasiten freigesetzt wird (Puentes *et al.*, 1990). Des weiteren exprimieren metazyklische Stadien eine Serin/Threonin-Proteinkinase (LPK-1), die über eine Phosphorylierung von C3, C5 und C9 sowohl den klassischen als auch den alternativen Komplement-Reaktionsweg inhibiert (Hermoso *et al.*,

1991; Li *et al.*, 1996). Gp63, eine Oberflächenmetalloproteinase, wird ebenfalls in metazyklischen Promastigoten verstärkt exprimiert, und es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität von gp63 wichtig für die Resistenz gegenüber Komplement-vermittelter Lyse ist (Brittingham *et al.*, 1995). Die Opsonisierung der metazyklischen Stadien erfolgt durch Bindung der Komplementmoleküle C3b bzw. iC3b an die Parasitenoberfläche. Hierdurch wird eine Anlagerung an die Komplementrezeptoren CR1 bzw. CR3 der Makrophagen ermöglicht (Da Silva *et al.*, 1989; Rosenthal *et al.*, 1996); die anschließende Aufnahme der Parasiten geschieht durch Phagozytose. Obwohl mittels Opsonisierung die Aufnahme der Parasiten durch die Makrophagen erleichtert wird, kann eine Infektion auch in Abwesenheit von Komplement stattfinden. Dies wird durch die Bindung der bereits erwähnten Oberflächenmoleküle LPG und gp63 an weitere Makrophagenrezeptoren, wie z.B. den Mannosyl-Fucosyl-Rezeptors (MFR) oder den Fibronectin-Rezeptor, ermöglicht (Mentink Kane und Mosser, 2000).

Innerhalb der Makrophagen sind die Leishmanien zunächst im Phagosom lokalisiert, das im weiteren Verlauf mit Endosomen und Lysosomen zum so genannten Phagolysosom fusioniert. Das in den metazyklischen Promastigoten stark exprimierte LPG kann transient die Fusion von Phagosom und Endosom inhibieren (Desjardins & Descoteaux, 1997), was den Parasiten einen Zeitgewinn zur Transformation in die besser an das saure Milieu im Phagolysosom angepasste amastigote Form verschafft (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Die Umwandlung der Promastigoten in amastigote Stadien dauert, je nach Spezies, 2-5 Tage.

Zu den beiden Hauptabwehrmechanismen aktivierter Makrophagen gegenüber Pathogenen gehören die Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen. Dabei erfolgt die Bildung von Superoxid (O_2^-) über den NADPH-Oxidase-Komplex, während die induzierbare Stickoxid-Synthase NOS-2 (iNOS) die Synthese von Stickoxid (NO) aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff katalysiert. In der Vergangenheit konnte eine NOS-2-Produktion zunächst nur in Nagetieren nachgewiesen werden. Die iNOS-Expression durch menschliche Makrophagen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert; erst Vouldoukis *et al.* (1995) konnten im Zusammenhang mit einer *L. major*-Infektion in humanen Makrophagen eine iNOS-Aktivität sowie die Kontrolle der Erreger durch Produktion von NO belegen. Die Leishmanien können den mikrobiziden Abwehrmechanismen der Makrophagen auf verschiedene Weisen entgehen. Zum einen ist LPG in der Lage, Sauerstoffradikale abzufangen (Chan *et al.*, 1989); außerdem kann es die NOS-2-Expression und damit die Bildung von NO unterdrücken (Proudfoot *et al.*, 1996). Des Weiteren inhibiert LPG die Proteinkinase C-Aktivität (McNeely & Turco, 1987), wodurch die Überlebensrate der Leishmanien gesteigert wird (Descoteaux *et al.*, 1992). Eine hemmende Wirkung der Oberflächenproteinase gp63 auf den oxidativen *burst* in humanen Neutrophilen und Monozyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Sorensen *et al.*, 1994). Die leishmanizide Aktivität wird auch durch den Speichel der Sandmücken beeinflusst, der u.a. die NO-Synthese inhibiert (Hall & Titus, 1995). Diese Mechanismen sind jedoch nur in der frühen Phase der Makrophageninfektion, d.h. vor der Stadienumwandlung der Parasiten, von Bedeutung.

Die Konversion in das amastigote Stadium ist mit einer Hemmung der LPG- und gp63-Expression verbunden. In den Amastigoten stellen Glykoinositolphospholipide (GIPLs) die Haupt-Oberflächenmoleküle dar (Ferguson, 1997); diese können ebenfalls die Proteinkinase C-Aktivität negativ beeinflussen (McNeely *et al.*, 1989) sowie die NOS-2-Expression in

Maus-Makrophagen inhibieren (Proudfoot *et al.*, 1995). *In vitro*-Makrophageninfektionen mit amastigoten Stadien von *L. donovani* konnten außerdem eine Beeinträchtigung in der intrazellulären Signalübertragung nachweisen, die aus der Aktivierung zellulärer Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTPs) resultierte (Nandan *et al.*, 1999).

Eine Hemmung der Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie sie beispielsweise im Fall von IL-12 nachgewiesen werden konnte (Weinheber *et al.*, 1998), ist eine weitere Strategie der Leishmanien, den mikrobiziden Abwehrmechanismen der Makrophagen zu entgehen. Innerhalb der Makrophagen kommt es zu einer starken Vermehrung der amastigoten Formen, die schließlich nach Zerstörung ihrer Wirtszelle freigesetzt werden. Die Infektion neuer Makrophagen erfolgt im wesentlichen über die Fc-Rezeptoren (Guy & Belosevic, 1993; Peters *et al.*, 1995).

Obwohl Makrophagen die wichtigsten Wirtszellen für *Leishmania* darstellen, gibt es weitere Zelltypen, die zur Phagozytose der Parasiten in der Lage sind. Bei einer experimentellen Infektion mit *L. major* werden die Parasiten innerhalb der ersten 24-48 h von dendritischen Zellen in der Haut aufgenommen und zu den T-Zell-Arealen der Lymphknoten transportiert (Moll *et al.*, 1993). Während des Migrationsprozesses zum drainierenden Lymphknoten sind die dendritischen Zellen Reifungsprozessen unterworfen, die in einer reduzierten Fähigkeit zur Antigen-Prozessierung und in einer gesteigerten Fähigkeit zur Antigen-Präsentation resultieren (Caux *et al.*, 1995). Im Lymphknoten erfolgt die Stimulation ruhender T-Zellen und die damit verbundene Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort in der frühen Phase der *Leishmania*-Infektion. Von wichtiger Bedeutung in dieser frühen Phase sind ebenfalls polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (PMN), welche als erste Leukozytenpopulation an die Infektionsstelle wandern (Müller *et al.*, 2001). Da PMN in Anwesenheit von Serum eine starke leishmanizide Wirkung zeigen, andererseits in der Abwesenheit von Serum ein Überleben der Parasiten ermöglichen, wird diesen Zellen eine duale Rolle bezüglich der *L. major*-Infektion zugeschrieben; neben ihrer Abwehrfunktion gegenüber Leishmanien können diese Zellen auch als Wirtszellen in der frühen Infektionsphase fungieren (Laufs *et al.*, 2002). Als so genannte *safe targets* während der chronischen *L. major*-Infektion konnten retikuläre Lymphknoten-Fibroblasten von Mäusen identifiziert werden (Bogdan *et al.*, 2000). Diese Zellen sind vermutlich für die dauerhafte Persistenz der Erreger im Wirtsorganismus verantwortlich.

1.2 Leishmaniasis

Leishmaniasis ist der Überbegriff für die von Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufenen Krankheitsformen. Mit weltweit 12 Millionen infizierten Menschen stellen die Leishmaniasen eine schwerwiegende gesundheitliche Bedrohung dar; insgesamt sind 350 Millionen Menschen in 88 Ländern vom Infektionsrisiko betroffen. Die Zahl der geschätzten jährlichen Neuerkrankungen beträgt 1,5 – 2 Millionen (Herwaldt, 1999; WHO, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>).

Die Leishmanien werden, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, bei einer Blutmahlzeit von infizierten weiblichen Sandmücken auf den Säugewirt übertragen. Bei den meisten Leishmaniasen handelt es sich um Zoonosen, bei denen Nager und Hunde als Reservoirwirte dienen und der Mensch kein Bestandteil des natürlichen Infektionszyklus ist.

Lediglich in zwei Ausnahmefällen (*L. donovani* und *L. tropica*) bestehen echte Anthroponosen, bei denen der Mensch selbst das Parasitenreservoir darstellt.

Beim Menschen lassen sich drei Manifestationsformen - cutane, mucocutane und viszerale Leishmaniase – unterscheiden; die Art der Erkrankung hängt im wesentlichen von der infizierenden Parasitenspezies ab. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die geographische Verbreitung der verschiedenen *Leishmania*-Spezies und die hervorgerufenen Krankheitsbilder.

Tabelle 1: Vorkommen und Krankheitsbilder der wichtigsten Leishmaniasen (modifiziert nach Harms-Zwingenberger & Bienzle, 2000)

Spezies	Verbreitung	Krankheitsbild	Reservoir
Alte Welt			
<i>L. donovani</i>	Indien, Südasien, Ostafrika	VL, PKDL	Mensch
<i>L. infantum</i>	Mittelmeerraum, Zentralasien	VL, CL	Hunde, Kaniden
<i>L. tropica</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeerraum, Zentralasien	CL, LR, (VTL), (VL)	Mensch
<i>L. major</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeerraum, Subsahara	CL	Nagetiere
<i>L. aethiopica</i>	Äthiopien, Kenia, Sudan	CL, DCL	Klippschliefer
Neue Welt			
<i>L. chagasi</i>	Süd- und Mittelamerika	VL	Hunde
<i>L. brasiliensis</i> *	Süd- und Mittelamerika	CL, MCL	Nagetiere
<i>L. guyanensis</i> *	Guyana, Brasilien	CL, MCL	Faultier, Opossum
<i>L. panamensis</i> *	Panama und Nachbarländer	CL, MCL	Faultier, Nagetiere
<i>L. mexicana</i> **	Mittelamerika, Venezuela, Kolumbien	CL	Nagetiere
<i>L. amazonensis</i> **	brasilianisches Amazonasgebiet, Venezuela	CL, DCL	Nagetiere
<i>L. garnhami</i> **	Venezuela	CL	?
<i>L. pifanoi</i> **	Venezuela	CL, DCL	?
<i>L. peruviana</i>	Anden Perus, Argentinien	CL	Hunde

Erreger werden auch als *L.-brasiliensis*-Gruppe* bzw. *L.-mexicana*-Gruppe** zusammengefasst

VL = viszerale Leishmaniase, PKDL = Post-Kala-Azar dermales Leishmanoid, CL = cutane Leishmaniase, MCL = mucocutane Leishmaniase, VTL = viszerotrope Leishmaniase, DCL = diffuse cutane Leishmaniase, LR = Leishmaniasis recidivans

1.2.1 Viszerale Leishmaniase

Die viszerale Leishmaniase (VL) oder *Kala azar* ist die schwerste Form der Leishmaniasis, da die Krankheit zu über 90% tödlich verläuft, wenn keine Behandlung erfolgt. Zu den Erregern gehört im wesentlichen der *L. donovani*-Komplex (*L. donovani* und *L. infantum* in der Alten Welt sowie *L. chagasi* in der Neuen Welt). Das Hauptverbreitungsgebiet der VL liegt in Bangladesch, Brasilien, Indien und dem Sudan; jährlich treten ca. 500.000 neue Krankheitsfälle auf (WHO, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Charakteristisch ist das Vorkommen von Epidemien, beispielsweise in Bihar (Indien) und vor allem im Sudan, wo in den Jahren von 1984-1994 100.000 Menschen der Krankheit zum Opfer fielen (Seaman *et al.* 1996). Bei der Erkrankung kommt es zu einem Befall der inneren Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark; zu den Symptomen der VL gehören das Anschwellen von Milz und Leber (Splénomegalie bzw. Hepatomegalie), unregelmäßige Fieberschübe, starker Gewichtsverlust sowie Anämie. Die Inkubationszeit kann Monate bis mehrere Jahre dauern.

Neben der klassischen *Kala azar* gibt es weitere Ausprägungsformen der viszeralen Leishmaniase. Als Post-*Kala-Azar* dermales Leishmanoid (PKDL) bezeichnet man eine chronische cutane Leishmaniase, die als Spätkomplikation einer VL auftreten kann. Dabei kommt es im Gesicht zur Bildung von Knoten und Läsionen, die sich im weiteren Verlauf über den ganzen Körper verteilen und über Jahre bestehen bleiben können. Patienten mit chronischer PKDL stellen somit eine ständige Infektionsquelle für den Insektenvektor dar.

Eine weitere Manifestationsform ist die so genannte viszerotrope Leishmaniase (VTL), die durch eine viszerale Infektion mit *L. tropica* hervorgerufen wird und erstmalig nach dem Golfkrieg eindeutig belegt wurde. Bei dieser systemischen Erkrankung können die klassischen Symptome einer VL, wie z. B. Splénomegalie, Hepatomegalie und Fieber, völlig fehlen (Magill *et al.*, 1993). Das Erstaunliche daran ist, dass die Infektion durch *L. tropica*, einer bis dahin ausschließlich als dermatrop bekannten *Leishmania*-Spezies, verursacht wird; inzwischen sind jedoch neben der erwähnten VTL auch Fälle von Patienten mit echter VL, hervorgerufen durch *L. tropica*, aufgetreten (Sacks *et al.*, 1995b).

Als dritter wichtiger Punkt ist die *Leishmania*/HIV-Koinfektion zu nennen, die in Afrika und insbesondere in Südeuropa ein ständig wachsendes Problem darstellt. Im Mittelmeerraum ist ausschließlich *L. infantum* als Erreger von sowohl cutaner als auch viszeraler Leishmaniase bekannt. Bei einer Koinfektion mit HIV kommt es aufgrund der Immunsuppression immer zur Ausprägung einer VL (Gradoni & Gramiccia, 1994); zur Zeit stehen 25-70% der in Südeuropa auftretenden Fälle von adulter VL im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion (WHO, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Neben Schwierigkeiten bei Diagnose und Behandlung von HIV/VL-Koinfektionen taucht zusätzlich das Problem neuer Übertragungswege von Mensch zu Mensch, beispielsweise durch mehrfach benutzte Spritzen von Drogenkonsumenten, auf. Aus diesem Grunde ist die *L. infantum*-Infektion in Südeuropa keine reine Zoonose mehr, da HIV-Koinfizierte ein immer größer werdendes Parasitenreservoir darstellen.

Als Grundlage für die Therapie von VL werden 5-wertige Antimonpräparate (Natrium-Stibogluconat, Megluminantimonat) eingesetzt. Aufgrund des verstärkten Auftretens antimonresistenter *Leishmania*-Stämme, insbesondere in den Epidemiegebieten in Indien (Lira *et al.*, 1999), kamen so genannte *second-line drugs*, wie Pentamidin und AmphotericinB Deoxycholat, zum Einsatz. Diese Substanzen, allein oder in Kombination mit Antimonpräparaten, zeigen jedoch häufig starke Nebenwirkungen. Neuere Medikamente mit

geringerer Toxizität (z.B. liposomales AmphotericinB) sind entweder sehr teuer und deshalb nicht in Epidemiegebieten einsetzbar (Bryceson, 2001) oder zur Zeit noch in der Entwicklung, wie z.B. Miltefosine. Dieses Präparat kann, im Gegensatz zu den bisherigen Medikamenten, oral verabreicht werden und wird zur Zeit in klinischen Studien getestet (Fischer *et al.*, 2001).

1.2.2 Cutane Leishmaniase

Die cutane Leishmaniase (CL) stellt mit 50-75% aller Leishmaniasis-Neuinfektionen die häufigste Form dieser Erkrankung dar. Zu den Erregern gehören in der Alten Welt *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica*; in den letzten Jahrzehnten sind auch Fälle von CL, hervorgerufen durch *L. infantum*, bekannt geworden (Rioux *et al.*, 1980). Innerhalb der Neuen Welt wird CL hauptsächlich von Vertretern des *L. mexicana*- sowie des *L. brasiliensis*-Komplexes verursacht (siehe auch Tabelle 1). Das Hauptverbreitungsgebiet der CL liegt in Brasilien, Iran, Peru, Saudi-Arabien, Syrien und Afghanistan, wo derzeit, in Kabul, eine Epidemie mit ca. 200.000 infizierten Personen grassiert (WHO, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beträgt 1-1,5 Millionen. Im Gegensatz zur viszeralen Leishmaniasis ist bei der CL nur die Haut betroffen. Üblicherweise kommt es 4-6 Wochen nach dem Stich einer infizierten Sandmücke zur Bildung eines juckenden Knotens, der sich im weiteren Verlauf zu einer ulzerierenden Läsion entwickelt. Diese heilt spontan innerhalb eines Jahres ab und hinterlässt im allgemeinen eine mehrjährige Immunität gegen die auslösende Spezies.

Neben der klassischen CL, die auch Orientbeule genannt wird, kann es bei einer *L. tropica*-Infektion in 5-10% der Fälle zu einer so genannten Leishmaniasis recidivans (LR) kommen. Dabei handelt es sich um eine chronische Form der CL, bei der die Läsionen im Zentrum abheilen, während sie sich am Rand entzündlich ausbreiten; die Erkrankung kann sich über mehrere Jahre hinziehen.

Im Fall von *L. aethiopica* und einigen Vertretern des *L. mexicana*-Komplexes kann sich bei Patienten mit einer defizienten Immunantwort eine diffuse cutane Leishmaniase (DCL) entwickeln. In diesen Fällen kommt es zur Ausbildung knotenförmiger, nicht-ulzerierender Läsionen, die zunächst im Gesicht lokalisiert sind und sich über den gesamten Körper ausbreiten. Bei dieser Form der Erkrankung kommt es nicht zu Spontanheilungen und der Behandlungserfolg ist minimal.

Als weitere Komplikation einer CL kann es bei den Erregern der *L. brasiliensis*-Gruppe zu einem chronischen progressiven Verlauf der Läsionsentwicklung kommen, der im Extremfall zu einer mucocutanen Leishmaniase (siehe Abschnitt 1.2.3) führen kann.

Eine Behandlung von CL der Alten Welt, die nach einer gewissen Zeit spontan abheilen, ist in der Regel nicht zwingend notwendig. Wenn aber, wie bei einigen *Leishmania*-Spezies der Neuen Welt, das Risiko einer mucocutanen Leishmaniase besteht, sollte eine CL unbedingt therapiert werden. Am effektivsten ist die intravenöse bzw. intramuskuläre Therapie mit 5-wertigem Antimon (Herwaldt, 1999), die jedoch mit starken Nebenwirkungen verbunden ist. Orale Therapeutika wie Imidazole (Ketoconazol) und Triazole (Itraconazol) zeigen häufig nur Wirkung gegen bestimmte *Leishmania*-Spezies. Lokaltherapien, wie z.B. Hitzebehandlung, Kryotherapie oder lokale Antimoninjektionen, sind nur dann erfolgversprechend, wenn die Erreger nicht zu einer Aussaat in das lymphatische System oder die Mundschleimhäute neigen (Berman, 1997; Herwaldt, 1999). Das bereits im Zusammenhang mit VL erwähnte

neue Medikament Miltefosine als Mittel gegen die CL der Neuen Welt befindet sich zur Zeit noch in der Testphase (Fischer *et al.*, 2001).

1.2.3 Mucocutane Leishmaniase

Die mucocutane Leishmaniase, auch Espundia genannt, kann sich in der Neuen Welt als Folge einer CL entwickeln; 90% aller MCL treten in Bolivien, Brasilien und Peru auf (WHO, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Die Erreger dieser Krankheitsform gehören zum *L. brasiliensis*-Komplex. Bei der MCL kommt es zu einer Verschleppung der Parasiten aus der Hautläsion in die Mund- und Nasenschleimhäute; dabei kann sich die Krankheit noch während der CL entwickeln oder aber erst Jahre später zu Tage treten. Im Extremfall führt die MCL zur Zerstörung der gesamten Nasenschleimhaut, des Nasenseptums und des Gaumens, wobei häufig auch die oberen Luftwege betroffen sind. Unbehandelt verläuft die Krankheit in den meisten Fällen tödlich; als Therapie werden die bereits erwähnten Antimonpräparate sowie Amphotericin B eingesetzt.

1.3 Immunologie und Pathogenese

Parasitäre Infektionen stimulieren gewöhnlich mehr als einen Abwehrmechanismus im Organismus ihres Wirtes, so dass z.B. die Produktion von Antikörpern und gleichzeitig die so genannte zellvermittelte Immunität induziert werden können. Welche dieser beiden Antworten letztlich überwiegt, ist im wesentlichen von der Art des Parasiten abhängig. Im allgemeinen ist die zellvermittelte Immunantwort am wirksamsten gegen intrazelluläre Erreger, während bei extrazellulären Parasiten die Bildung von Antikörpern induziert wird.

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, werden Leishmanien von Gewebsmakrophagen durch Phagozytose aufgenommen. Werden diese Makrophagen durch ein bestimmtes Signal, z.B. IFN- γ aktiviert, erfolgt die gesteigerte Synthese hydrolytischer Enzyme, reaktiver Sauerstoffintermediate (O_2^- , H_2O_2 , $\bullet OH$) sowie Stickoxid (NO), die zur Zerstörung der Leishmanien führen. Dabei ist die zytotoxische Wirkung der reaktiven Sauerstoffintermediate hauptsächlich auf Schädigungen von Lipiden und Proteinen der Zellmembranen zurückzuführen, während NO für die Zerstörung von Fe-S-Bindungen und den damit verbundenen Schäden an Mitochondrien verantwortlich ist (Cox, 1993). Der partielle Abbau der Leishmanien, die immunologisch ein Antigen darstellen, erfolgt im Phagolysosom der Makrophagen; dieser Vorgang wird auch als Antigen-Prozessierung bezeichnet. In einem nächsten Schritt binden die Antigenfragmente an MHC-Klasse-II-Moleküle und werden zusammen mit diesen an die Zelloberfläche transportiert; die Makrophagen fungieren in diesem Fall als antigenpräsentierende Zellen (APC). Die bereits in Kapitel 1.1 erwähnten, zur Phagozytose von Leishmania befähigten dendritischen Zellen der Haut zeichnen sich durch eine hohe Fähigkeit zur Antigen-Präsentation aus; bei den Makrophagen ist diese Eigenschaft nicht so stark ausgeprägt, da sie in erster Linie für die Eliminierung der Parasiten und weniger für die Induktion einer T-Zell-Immunantwort verantwortlich sind (Moll, 1997; Moll, 2000). Der Komplex aus Antigen und MHC-Klasse-II-Molekül wird von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Helfer-Lymphozyten erkannt. Bei diesen T-Helfer-Lymphozyten handelt es sich um $CD4^+$ -Zellen, die in 2 Gruppen unterteilt werden können. Während T_H1 -Zellen verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit Zytotoxizität und lokalen Entzündungs-

reaktionen vermitteln, also intrazelluläre Pathogene bekämpfen, stimulieren T_H2 -Zellen die Proliferation von B-Zellen und deren Antikörperproduktion; dadurch wirken sie hauptsächlich als Schutz gegen freilebende Mikroorganismen. Im folgenden soll auf diese beiden Möglichkeiten der zellulären Immunantwort im Zusammenhang mit einer *Leishmania*-Infektion näher eingegangen werden.

Durch eine T_H1 -Immunantwort wird eine protektive Immunität gegenüber einer *Leishmania*-Infektion vermittelt. Dabei werden hauptsächlich die Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-12 freigesetzt. Das von T-Zellen und NK-Zellen gebildete IFN- γ bewirkt u.a. die Aktivierung von Makrophagen und die damit verbundenen leishmaniziden Mechanismen; IL-2 hat eine fördernde Wirkung auf die Aktivierung von Monozyten sowie auf das Wachstum und die Mediatorfreisetzung (z.B. IFN- γ) von T-Zellen. Das erst seit kurzem bekannte, von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildete IL-12 ist für die IFN- γ -Produktion in den o.g. Zelltypen verantwortlich. Aus diesem Grund spielt IL-12 die entscheidende Rolle bei der Induktion einer T_H1 -Antwort (Scott, 1993; Fowell *et al.*, 1995; Hsieh *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen belegen, dass IL-12 nicht nur für die Induktion, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer T_H1 -Immunantwort - insbesondere im Zusammenhang mit muriner Leishmaniasis - von Bedeutung ist (Park & Scott, 2001).

Eine T_H2 -Immunantwort ist im allgemeinen mit einer Anfälligkeit gegenüber *Leishmania*-Infektionen assoziiert. Dabei werden von T_H2 -Zellen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sowie IL-13 freigesetzt; von diesen fungiert IL-4 als Auslöser der T_H2 -Immunantwort. Zu den wichtigsten Funktionen von IL-4 gehören die Förderung der Proliferation von T_H2 -Zellen und des Wachstums von B-Zellen sowie die Induktion der Antikörper-Isotypen IgG1 und IgE. IL-5 wirkt ebenfalls auf Wachstum und Differenzierung von B-Zellen und fördert die Selektion von IgA-Antikörper-Isotypen. Während IL-6 einen Einfluss auf die B-Zell-Differenzierung hat, wirkt IL-10 gezielt auf die Hemmung der Zytokinsynthese in T_H1 -Zellen; IL-13 ähnelt in seinen Funktionen denen von IL-4.

Zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen bestehen diverse, meist negative Regulationsmechanismen. Während IL-4 gezielt die Reifung von T_H2 -Zellen fördert, wirkt das von T_H1 -Zellen gebildete IFN- γ antagonistisch auf diesen Prozess. Außerdem konnte gezeigt werden, dass T-Helferzellen unter dem Einfluss von IL-4 nicht mehr auf IL-12 reagieren (Szabo *et al.*, 1995). Da IL-4 im Gegensatz zu dem von Makrophagen gebildeten IL-12 ein eigenes Produkt der T-Zellen ist, wird hier ein entscheidender Unterschied zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen deutlich: T_H2 -Zellen können, im Gegensatz zu T_H1 -Zellen, direkt die Ausbildung ihres eigenen Phänotyps unterstützen (Lohoff *et al.*, 1998). Des Weiteren kann IL-4 eine Hemmung der NO-Produktion in Makrophagen bewirken (Vouldoukis *et al.*, 1997).

Im Zusammenhang mit einer *Leishmania*-Infektion wird davon ausgegangen, dass das im Säugerwirt während der ersten 5-36 h der Infektion vorherrschende Zytokinmilieu von entscheidender Bedeutung für den Krankheitsverlauf ist (Solbach & Laskay, 2000). Die bisher erwähnten immunologischen Prinzipien sollen im folgenden Abschnitt gezielt auf die Pathogenese von humaner VL und CL bezogen werden, bevor auf die experimentelle *Leishmania*-Infektion und die Übertragbarkeit von in Tiermodellen gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen eingegangen wird.

1.3.1 Humane Leishmaniasis

1.3.1.1 Viszerale Leishmaniase

Bei der klassischen VL kommt es im allgemeinen an der Stelle des Sandmückenbisses zu keiner Läsionsbildung. Die Leishmanien werden von ihren Wirtszellen aufgenommen, und es erfolgt eine Disseminierung in makrophagenreiche Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark. Die Infektion wird von einer Hemmung der zellvermittelten Immunantwort begleitet; dies kann durch das Fehlen einer so genannten verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH = *delayed type hypersensitivity*) nachgewiesen werden (Turk & Bryceson, 1971; Wyler *et al.*, 1979). Im Gegensatz dazu haben der andauernde Antigenstimulus und die massive Produktion von IL-4 eine polyklonale B-Zell-Proliferation zur Folge (Harms-Zwingenberger & Bienzle, 2000). Untersuchungen an Patienten mit aktiver *Kala azar* ergaben sowohl für IFN- γ als auch für IL-10 erhöhte mRNA-Syntheseraten im Knochenmark (Karp *et al.*, 1993) und im Lymphknotengewebe (Ghalib *et al.*, 1993); nach erfolgreicher Behandlung konnte im Lymphknoten kein IL-10 mehr nachgewiesen werden, während IFN- γ nach wie vor produziert wurde. Zytokinmessungen im Serum von VL-Patienten ergaben neben einem Anstieg der IL-10-Produktion auch eine Zunahme der IL-4-Synthese (Sundar *et al.*, 1997). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der humanen VL kein klares T_H1- bzw. T_H2-Profil der Immunantwort vorliegt. Die durch IFN- γ vermittelte, protektive T_H1-Antwort wird vermutlich durch die Produktion der antagonistisch wirkenden Zytokine IL-4 und/oder IL-10 gehemmt bzw. davon überlagert (Sundar *et al.*, 1997).

1.3.1.2 Cutane Leishmaniase

Die spontan abheilende CL beim Menschen wird von einer effektiven zellulären Immunantwort kontrolliert, die sich durch starke DTH-Reaktionen äußert. Histologisch bildet sich an der Bissstelle ein Granulom, das aus infiltrierenden Lymphozyten, Epithelzellen und Parasiten besteht. Im Gegensatz zur VL erfolgt keine Disseminierung der Erreger in die inneren Organe. Der genaue Mechanismus der Kontrolle einer *L. major*-Infektion beim Menschen ist noch nicht bekannt. Kemp *et al.* (1994) führten Untersuchungen zur T-Zell-Antwort auf *L. major*-Antigene an mononukleären Phagozyten aus dem Blut verschiedener Patienten durch. Dabei wurden einerseits Patienten untersucht, die eine CL überstanden hatten, eine zweite Patientengruppe zeigte eine positive DTH-Reaktion ohne Anzeichen einer klinischen CL, während die dritte Gruppe aus uninfizierten Patienten bestand. In den ersten beiden Gruppen ließ sich nach Antigen-Stimulation eine starke IFN- γ -Produktion und nur eine geringe oder gar keine IL-4-Produktion nachweisen. Im Gegensatz dazu wurde von den Zellen der uninfizierten Patienten entweder IFN- γ oder IL-4 synthetisiert. Dieses Ergebnis zeigt eine T_H1-Immunantwort bei Patienten mit überstandener oder subklinischer *L. major*-Infektion. Im Gegensatz dazu konnte in Läsionen von CL-Patienten sowohl die Synthese von IL-10- als auch von IL-12-mRNA nachgewiesen werden (Melby *et al.*, 1996).

1.3.2 Experimentelle Leishmaniasis im Tiermodell

Eine wichtige Aufgabe von Tiermodellen im Zusammenhang mit parasitären Erkrankungen ist die möglichst genaue Wiedergabe von pathologischen Veränderungen und Immunreaktionen, wie sie im Menschen stattfinden, um eine spätere Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Auf diese Weise kann in experimentellen Systemen die Pathogenese der Erkrankung unter definierten Bedingungen studiert werden, und es können Ursachen für Anfälligkeit bzw. Resistenz von Wirtsorganismen gegenüber bestimmten

Pathogenen gefunden werden. Eine weitere Funktion von Tiermodellen liegt in der Erhaltung von Parasitenstämmen mit natürlichen Eigenschaften, wie z.B. in Bezug auf Virulenz, da diese während einer längeren *in vitro*-Kulturphase verloren gehen können.

Im Zusammenhang mit Leishmaniasis gibt es eine Vielzahl von Tiermodellen, die – je nach Kombination von Leishmanienspezies und Wirtsorganismus – das Spektrum der möglichen Krankheitsformen weitgehend abdecken. Es existiert jedoch kein Tiermodell, welches in der Lage ist, die Situation im Menschen exakt widerzuspiegeln (Hommel *et al.*, 1995). Aus diesem Grund kann die Übertragung von Ergebnissen experimenteller Leishmaniasis auf den Menschen nur unter Einschränkungen erfolgen. Im folgenden Abschnitt sollen einige dieser Tiermodelle für *L. donovani* bzw. *L. major* ausführlicher erläutert werden.

1.3.2.1 *L. donovani*-Infektion im Tiermodell

Der Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) lässt sich erfolgreich mit verschiedenen Stämmen von *L. donovani* infizieren; dabei kommt es zu einer ausgeprägten VL, die schließlich zum Tod der Tiere führt (Hommel *et al.*, 1995). Der Krankheitsverlauf ähnelt einer humanen VL. Obwohl immunologisch eine starke Expression T_H1-spezifischer Zytokine (IL-2, IFN- γ) in Leber, Milz und Knochenmark festgestellt wurde, kam es in diesen Organen zu einer unkontrollierten Vermehrung der Parasiten (Melby *et al.*, 2001a). Trotz starker IFN- γ -Produktion konnte keine NOS2 mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die im weiteren Verlauf der Infektion messbare Produktion von TGF- β und IL-10 – Zytokine, die die Aktivierung von Makrophagen und die damit verbundene Bildung von NO unterdrücken – deutet darauf hin, dass die systemische Erkrankung aus einer defekten NO-Synthese resultiert (Melby *et al.*, 2001a). Ein Problem bei der Verwendung des Goldhamsters als Modellorganismus liegt in den relativ langen Infektionszeiträumen, die bis zu einem Jahr betragen können (Lira *et al.*, 1998). Außerdem besteht keine Möglichkeit, den Krankheitsverlauf äußerlich zu verfolgen, da sich bei subkutaner Inokulation der Parasiten keine Läsionen bilden. Um die Infektionszeit zu verkürzen, wird häufig eine intracardiale Infektion durchgeführt; eine Dokumentation des Krankheitsverlaufs ist auch in diesem Fall nicht möglich.

Die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) stellt einen der anfälligsten Modellorganismen für *L. donovani* dar und soll deshalb an dieser Stelle kurz erwähnt werden. Nach intraperitonealer Inokulation der Parasiten verläuft die Infektion während der ersten 3-4 Monate subklinisch, obwohl die Parasitenlast zu dieser Zeit schon recht hoch ist. Nach dem ersten Auftreten von Krankheitssymptomen nimmt die Infektion schnell einen tödlichen Verlauf; dabei sind die Parasitenlasten in Milz und Leber außerordentlich hoch (Hommel *et al.*, 1995). Aufgrund der relativ langen Infektionszeiten wird die Baumwollratte nur in Ausnahmefällen, beispielsweise für die Produktion echter amastigoter Stadien von *L. donovani*, verwendet.

Im Gegensatz zu Hamster und Baumwollratte weisen Mäuse eine natürliche Resistenz gegenüber *L. donovani*-Infektionen auf. Diese Resistenz wird von einem auf Chromosom 1 lokalisierten Gen, welches für das so genannte *natural resistance-associated macrophage protein 1* (NRAMP1) kodiert, hervorgerufen (Vidal *et al.*, 1993). NRAMP1 reguliert *priming* und Aktivierung von Makrophagen (Blackwell *et al.*, 1991); diese Prozesse sind für die antimikrobiellen Funktionen der Phagozyten notwendig. Bei der Infektion von Mäusen mit *L. donovani* kommt es in der Anfangsphase zu einem Anstieg der Parasitenlast; nach 4-8

Wochen kontrollieren die Mäuse die Infektion über eine zellvermittelte Immunantwort (Melby *et al.*, 2001a). Dabei wird von T-Zellen der Milz IFN- γ produziert (Murray *et al.*, 1982; Squires *et al.*, 1989); diese T-Zellen werden durch IL-12 zur Ausprägung eines T_H1-Phänotyps angeregt (Murray, 1997). Über die Bildung von NO erfolgt letztendlich die Kontrolle der Infektion. Im Falle der auch von uns verwendeten BALB/c-Maus konnte in infizierten Organen zunächst die Induktion der IL-4- und IL-10-Expression, also einer T_H2-Antwort, nachgewiesen werden; diese T_H2-Antwort wurde jedoch schnell von einem protektiven T_H1-Mechanismus überlagert (Miralles *et al.*, 1994). Aus den genannten Gründen kann das Mausmodell im Fall von *L. donovani* nur für die frühe Infektionsphase herangezogen werden; eine progressive VL, wie sie beim Menschen auftritt, wird in der Maus nicht beobachtet.

1.3.2.2 *L. major*-Infektion im Tiermodell

Im Fall von *L. major* kommen ausschließlich Mäuse als Modellorganismen in Frage. Die überwiegende Zahl der zu Laborzwecken verwendeten Maus-Inzuchtstämme, wie z.B. C57BL/6, CBA und C3H/He, entwickeln nach einer Infektion mit *L. major* cutane Läsionen, die spontan innerhalb von 4-8 Wochen abheilen. Diese Mäuse werden, da es bei einer weiteren Infektion mit *L. major* zu keiner Läsionsbildung kommt, auch als resistente Mausstämmen bezeichnet. Die Kontrolle der Infektion erfolgt vermutlich über einen T_H1-Mechanismus, da in Lymphknoten von mit *L. major* infizierten C57BL/6-Mäusen die Bildung von T_H1-Zellen nachgewiesen werden konnte (Heinzel *et al.*, 1991).

Im Gegensatz zu den eben genannten Mausstämmen sind BALB/c-Mäuse extrem anfällig für eine *L. major*-Infektion. Bei diesen Tieren kommt es zur Bildung ulzerierender Hautläsionen sowie zu einer Disseminierung der Parasiten in die inneren Organe, die schließlich zum Tod führt (Howard *et al.*, 1980; Howard *et al.*, 1982). Die genetischen Ursachen für die Unfähigkeit der BALB/c-Maus, eine Infektion mit *L. major* zu kontrollieren, sind noch nicht genau bekannt. Sie könnten mit dem auf Chromosom 11 lokalisierten *susceptibility locus Sc11* in Zusammenhang stehen (Mock *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993). In dieser Region liegt das für iNOS kodierende Gen *Nos2* (Mock *et al.*, 1994); außerdem sind dort die Gene für diverse Monokine, welche von aktivierten Makrophagen exprimiert werden, lokalisiert. BALB/c-Mäuse reagieren auf eine *L. major*-Infektion mit einer T_H2-Immunantwort. In diesem Zusammenhang konnte schon 16 h nach subkutaner Infektion ein früher *burst* von IL-4 mRNA in CD4⁺ T-Zellen der drainierenden Lymphknoten von BALB/c-Mäusen nachgewiesen werden, der bei resistenten C57BL/6-Mäusen nicht zu verzeichnen war (Launois *et al.*, 1995). Ein zweiter Anstieg der IL-4-Transkripte konnte bei BALB/c-Mäusen ab dem 5. Infektionstag gemessen werden, der die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zum T_H2-Phänotyp widerspiegelt. Die exogene Gabe von IL-12 innerhalb der ersten 48 h nach Infektion konnte die IL-4-Produktion unterbinden; nach dieser Zeit zeigte die Zufuhr von IL-12 keine Wirkung mehr (Launois *et al.*, 1997). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Anfälligkeit bzw. Resistenz von Mäusen auf eine *L. major*-Infektion von ihrer Reaktion auf IL-12 abhängt. Können CD4⁺ T-Zellen eines infizierten Tieres auch 48 h nach Infektion noch auf IL-12 reagieren, führt dies zur Entwicklung einer protektiven T_H1-Antwort; sprechen die T-Zellen nicht mehr auf IL-12 an, kommt es zu einer T_H2-Immunantwort (Solbach & Laskay, 2000).

1.4 Virulenz und Tropismus von *Leishmania*

Für den Begriff Virulenz existiert eine Vielzahl von Definitionen. Im allgemeinen wird darunter die Fähigkeit eines Pathogens, sich im Wirt zu vermehren und diesen zu schädigen, verstanden. Dabei wird die Pathogenität eines Krankheitserregers häufig als Maß für dessen Virulenz verwendet. Virulenzfaktoren sind demnach parasitenspezifische Eigenschaften, die eine erfolgreiche Invasion des Wirtsorganismus sowie die Ausbreitung und Vermehrung der Parasiten gewährleisten. Um den Einfluss eines Gens auf die Virulenz sicherzustellen, müssen bestimmte Kriterien, die so genannten molekularen Koch's Postulate (Falkow, 1988), erfüllt sein. Nach diesen Kriterien sollte die Abwesenheit bzw. Inaktivierung des entsprechenden Gens einen attenuierten oder avirulenten Phänotyp bewirken; die Wiederherstellung der Genfunktion sollte zur vollständigen Rückkehr der Virulenzeigenschaften führen.

Im Zusammenhang mit Leishmaniasis sind eine Reihe von Virulenzfaktoren beschrieben worden. Die Rolle von Lipophosphoglykan während des Invasionsprozesses wurde bereits in Kapitel 1.1 dargelegt; dies gilt jedoch nur für *L. donovani* und *L. major*. Bei *L. mexicana* ist LPG als Virulenzfaktor nicht von Bedeutung, da LPG-defiziente Promastigote in der Lage waren, erfolgreich Makrophagen *in vitro* zu infizieren; außerdem konnten in Mausinfektionsexperimenten keine Virulenzunterschiede dieser Mutanten im Vergleich mit *L. mexicana* WT festgestellt werden (Ilg, 2000).

Die Zink-Proteinase gp63, auch Leishmanolysin genannt, ist das am häufigsten vorkommende Oberflächenprotein von *Leishmania*. Das gp63-Molekül schützt Promastigote vor dem Angriff hydrolytischer Enzyme im Phago lysosom der Makrophagen (Seay *et al.*, 1996); des weiteren wird die Komplement-vermittelte Lyse inhibiert sowie die Aufnahme der Parasiten durch Makrophagen gefördert (Brittingham *et al.*, 1995; Brittingham & Mosser, 1996). Eine Überexpression von gp63 in gp63-defizienten *Leishmania*-Mutanten konnte außerdem die Bindung an Makrophagenrezeptoren sowie die Überlebensfähigkeit im Makrophagen erhöhen (Liu & Chang, 1992; McGwire & Chang, 1994). Somit stellt gp63 einen Virulenzfaktor von *Leishmania* dar.

Des weiteren kommen in *Leishmania* spp. eine Anzahl von Cysteinproteinasen (CP) vor; in *L. mexicana* konnten 3 verschiedene CP-Gene identifiziert werden. Zwei dieser Gene, *cpa* und *cpc*, sind *single copy*-Gene, die keinen Einfluss auf die Infektiosität der Parasiten im Mausmodell haben (Souza *et al.*, 1994; Bart *et al.*, 1997). Bei den *cpb*-Genen handelt es sich um 19 tandemartig hintereinander angeordnete Genkopien, die hauptsächlich im Amastigotenstadium exprimiert werden (Mottram *et al.*, 1997; Mottram *et al.*, 1998). Die Fähigkeit von *L. mexicana* Δ *cpb*-Mutanten zur Infektion von Makrophagen ist im Vergleich mit *L. mexicana* WT zu 80% reduziert; dabei wird jedoch nicht der Invasionsprozess, sondern die Überlebensfähigkeit der Parasiten im Makrophagen beeinträchtigt (Mottram *et al.*, 1996). Die Re-Expression einer einzigen *cpb*-Genkopie konnte die ursprüngliche Infektiosität wiederherstellen – eine Indiz für die Funktion dieser Gene als Virulenzfaktoren. Außerdem konnte bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. mexicana* Δ *cpb* eine Änderung in der Immunreaktion zugunsten einer protektiven T_H1-Antwort festgestellt werden (Alexander *et al.*, 1998); demnach haben Cysteinproteinasen zusätzlich immunmodulatorische Funktionen.

Potentielle Kandidaten für Virulenzfaktoren stellen außerdem solche Moleküle dar, die nur im Amastigotenstadium exprimiert werden und die möglicherweise essentiell für das Überleben

der Parasiten im Säugerwirt sind. Bislang konnten nur sehr wenige solcher amastigoten-spezifischen Gene identifiziert werden. Ein Beispiel stellen die A2-Gene aus *L. donovani* dar (Charest & Matlashewski, 1994). Das A2-Genprodukt ist eine Familie von Proteinen mit einer Größe von 45-100 kDa, die ausschließlich im amastigoten Stadium der Parasiten zu finden sind (Zhang *et al.*, 1996). Des weiteren bestehen Homologien zum S1-Antigen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*; dieses Gen wird ebenfalls stadienspezifisch exprimiert (Charest & Matlashewski, 1994). Die A2-Gene konnten nur in Vertretern des *L. donovani*- bzw. des *L. mexicana*-Komplexes nachgewiesen werden (Ghedini *et al.*, 1997). A2-defiziente Amastigote von *L. donovani* zeigten in Makrophageninfektionen *in vitro* verringerte Proliferationsraten und konnten in BALB/c-Mäusen nicht überleben (Zhang & Matlashewski, 1997). Demnach stellt die A2-Proteine amastigotenspezifische Virulenzfaktoren dar, die für das Überleben von *L. donovani* im Säugerwirt notwendig sind.

Ein weiteres Beispiel ist das 100 kDa-Hitzeschockprotein (HSP100). *ClpB* ist ein *single copy*-Gen, dessen Genprodukt, HSP100, in promastigoten Stadien von *L. major* bzw. *L. donovani* nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist (Hübel *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist während eines Hitzestresses bzw. im Amastigotenstadium eine starke Zunahme der intrazellulären HSP100-Konzentration zu verzeichnen (Hübel *et al.*, 1995; Hübel *et al.*, 1997; Krobitch *et al.*, 1998). Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen zeichneten sich *L. major* Δ *clpB*-Mutanten durch keine bzw. eine stark verzögerte Läsionsbildung aus (Hübel *et al.*, 1997); in Makrophageninfektionsexperimenten konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion in der Virulenz dieser Mutanten dokumentiert werden. Durch episomale Expression des *clpB*-Gens in *L. major* Δ *clpB*-Mutanten ließ sich nur *in vivo* ein Selektionsdruck zugunsten von HSP100 nachweisen, während *in vitro* bei nicht vorhandenem Antibiotikum-Selektionsdruck ein Verlust des HSP100-Plasmids zu verzeichnen war (Hübel *et al.*, 1997). Untersuchungen von Krobitch *et al.* (1998) ergaben eine reduzierte Expression des Amastigoten-spezifischen A2-Gens in axenischen Amastigoten von *L. donovani* Δ *clpB*-Mutanten; außerdem war in echten amastigoten Stadien dieser Mutanten eine Veränderung der Morphologie zu verzeichnen. Alle diese Resultate weisen auf die Bedeutung von HSP100 in der frühen Phase einer *Leishmania*-Infektion, insbesondere bei der Differenzierung zum amastigoten Stadium, hin.

Bei den Virulenzfaktoren unterscheiden Chang & McGwire (2002) zwei Gruppen: während invasive/evasive Determinanten für eine erfolgreiche Infektion von Bedeutung sind, verursachen so genannte pathoantigenische Determinanten immunpathologische Veränderungen im Wirtsorganismus, die letztendlich zu den spezifischen Krankheitssymptomen führen. Die oben genannten Virulenzfaktoren gehören fast ausschließlich zur Gruppe der invasiven/evasiven Determinanten; was jedoch die Immunpathologie bei der Leishmaniasis ausmacht, ist noch größtenteils unbekannt. Der Nachweis hoher Antikörpertiter in Patienten mit aktiver *Kala azar* gegen konservierte, B-Zell-Epitope aufweisende *Leishmania*-Antigene (z.B. Hitzeschock-Proteine, ribosomale und nukleosomale Proteine, etc.) führte zur Entwicklung eines hypothetischen Modells der Immunogenität dieser so genannten Panantigene während einer *Leishmania*-Infektion (Requena *et al.*, 2000). Die Bildung von Antikörpern gegen *Leishmania*-Antigene ist jedoch völlig wirkungslos, da sich die Proteinkomplexe im Zytoplasma von intrazellulären Amastigoten und somit außer der Reichweite von Antikörpern befinden. Diese fehlgeleitete Immunantwort ist nicht nur

unproduktiv, sondern sie kann auch zu immunpathologischen Veränderungen im Wirtsorganismus beitragen (Chang *et al.*, 1999; Chang & McGwire, 2002).

Der spezielle Gewebstropismus ist ein weiteres auffälliges Merkmal von *Leishmania*; dabei sind im allgemeinen makrophagenreiche Organe wie Leber, Milz und Knochenmark betroffen. Die Tatsache, dass bestimmte *Leishmania*-Spezies nur lokale Hautläsionen verursachen, während es bei anderen zur Aussaat in die inneren Organe des Wirtsorganismus kommt, deutet auf eine Assoziation von Tropismus und Temperaturtoleranz der Parasiten hin. Aus diesem Grund wurden die meisten Untersuchungen zum Tropismus von *Leishmania* ausschließlich in Zusammenhang mit Temperaturtoleranz durchgeführt (Berman & Neva, 1981; Sacks *et al.*, 1983; Leon *et al.*, 1995; Callahan *et al.*, 1996). Die Ergebnisse dieser zumeist *in vitro* durchgeführten Experimente sind kontrovers und weisen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den beiden Phänomenen nach. Die Beobachtung, dass beispielsweise *L. tropica* oder *L. infantum* sowohl CL als auch VL verursachen können, spricht ebenfalls gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen Temperaturtoleranz und Tropismus. Die bereits erwähnten A2-Gene aus *L. donovani* haben neben ihrer Eigenschaft als Virulenzfaktoren einen zusätzlichen Einfluss auf die Viszeralisierung. Episomale Expression des *L. donovani*-A2-Gens in *L. major*, die natürlicherweise kein A2-Gen besitzen, und Infektion von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten Parasiten führte zu einer signifikanten Milzvergrößerung; außerdem war die Parasitenlast in diesen Organen um das dreifache erhöht (Zhang & Matlashewski, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse begünstigt die Expression der A2-Gene die Viszeralisierung von *L. donovani* und die Entstehung von Splenomegalie, einem typischen Krankheitssymptom der humanen VL.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, verursachen Protozoen der Gattung *Leishmania* ein breites Spektrum verschiedener Krankheitsformen. Alle Leishmaniasen beginnen mit dem Biss einer infizierten Sandmücke als kutane Infektionen. Aufgrund von weitgehend unbekanntem Mechanismen bleiben einige Infektionen lokal auf die Haut in der Umgebung der Bissstelle beschränkt, während es bei anderen zu einer Aussaat der Parasiten in die inneren Organe des Wirtsorganismus kommt. Dabei hängt die Art der Erkrankung im wesentlichen von der infizierenden *Leishmania*-Spezies ab; zu einem geringeren Teil ist auch die Immunreaktion des Säugetierwirtes an der Ausprägungsform der Krankheit beteiligt.

Untersuchungen zur Pathogenität der Parasiten ergaben eine Reihe von Faktoren, die einen Einfluss auf allgemeine Virulenzeigenschaften von *Leishmania* haben. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Moleküle, die für den Invasionsprozess bzw. das Überleben der Parasiten in ihren Wirtszellen, den Makrophagen, von Bedeutung sind. Die Tatsache, dass beispielsweise *L. major* ausschließlich cutane Läsionen hervorruft, während eine Infektion mit *L. braziliensis* zu einer mucocutanen Leishmaniase führt und *L. donovani* eine systemische VL verursacht, wirft die Frage nach den genetischen Grundlagen des Organtropismus auf. Gibt es Gene, die für die Viszeralisierung bestimmter *Leishmania*-Spezies verantwortlich sind?

Um diese Frage zu beantworten, haben wir uns einer genetischen Komplementationsstrategie bedient. Genetische Komplementation wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich angewendet, beispielsweise bei der Identifizierung von Genen, die bei der

Glykokonjugat-Synthese involviert sind (Ryan *et al.*, 1993a; Turco *et al.*, 1994; Descoteaux *et al.*, 1995; Beverley & Turco, 1995). Dabei wurden *Leishmania*-Mutanten mit speziellen Eigenschaften, wie z.B. fehlender Virulenz, durch Transfektion mit Cosmid-Genbank-DNA funktionell komplementiert. Nach Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps in den Transfektanden konnten die beteiligten Gene durch eine Analyse der betreffenden Cosmide ermittelt werden.

Zur Identifizierung von Genen, die einen Einfluss auf die Viszeralisierung haben, sollte eine dermatrope *Leishmania*-Spezies, *L. major*, mit Cosmid-Genbank-DNA einer viszeralisierenden Spezies, *L. donovani*, transfiziert werden. Über eine anschließende Infektion von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten *L. major* sollte *in vivo* eine Selektion auf Cosmide erfolgen, die den Leishmanien einen Selektionsvorteil in den inneren Organen der Mäuse verschaffen. Dabei sollte die Selektion rekombinanter *L. major* in den drainierenden Lymphknoten sowie in den Milzen der Mäuse separat untersucht werden; gegebenenfalls sollten mehrere aufeinander folgende Selektionsrunden durchgeführt werden. Nach erfolgreicher Einengung auf bestimmte Cosmidtypen sollte die Identifizierung der für die Viszeralisierung verantwortlichen Gene und eventuell deren weitere Charakterisierung erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid	Biomol, Hamburg
Adenin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Agar	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
APS	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Ampicillin	Grünenthal, Aachen
ATP	Boehringer, Mannheim
BCIP	Biomol, Hamburg
6-Biopterin	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Chloroform	Merck, Darmstadt
Circle Grow	Bio 101, Carlsbad, U.S.A.
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt
DIG-11-dUTP	Boehringer, Mannheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-heptahydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Hybridisierungslösung HYB-9	Biozym, Hess. Oldendorf
dNTPs	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Serva, Heidelberg
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticinsulfat (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Gentamicin (Gencin 80)	Curasan Pharma AG, Kleinostheim
Giensa	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted, England
Glycin	Biomol, Hamburg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidiniumhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Haemin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt

HEPES	Biomol, Hamburg
Hexanukleotidgemisch	Boehringer, Mannheim
His Bind Resin-Säulenmaterial	Novagen, Madison, U.S.A.
I-Block-Reagenz	Tropix, Bedford, U.S.A.
Imidazol	Merck, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Calbiochem, La Jolla, U.S.A.
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Merck, Darmstadt
L.R. White	London Resign Company, Berkshire, England
M199-Medium	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Magermilchpulver (Sucofin)	TSI, Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maltose	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Serva, Heidelberg
NBT	Biomol, Hamburg
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Nourseothricin	Werner BioAgents, Jena
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penstrept	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Phenol/Tris-gesättigt	Biomol, Hamburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
Polyethylenglycol 6000	Fluka, Buchs, Schweiz
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylenyanol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Weitere Materialien und Geräte

Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
CASY-Zellcounter & Analyzer	Schärfe System, Reutlingen
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim

Easy Pure DNA Purification Kit
 Elektroporationsküvetten (0,4 cm)
 GenePulser™
 GFX Micro Plasmid Prep Kit
 Gigapack[□] III Gold Packaging Extract
 His Bind Resin
 Hybridisierungsöfen
 MasterAmp™ PCR Optimization Kit
 MasterAmp™ Extra Long PCR Kit
 Nitrocellulose-Membranfilter (BA 85)
 Nuc Trap[□] push columns
 Nylonmembranen
 Poly-Prep Chromatography Columns
 Puregene DNA Purification Kit
 PVDF-Membranen
 QIAGEN Plasmid Maxi Kit
 Röntgenfilme Biomax MR
 Spektralphotometer
 Stratalinker
 Thermocycler
 3 MM-Whatman Papier

Biozym, Hess. Oldendorf
 BioRad, München
 BioRad, München
 Amersham Bioscience, Piscataway, U.S.A.
 Stratagene, La Jolla, U.S.A.
 Novagen, Madison, U.S.A.
 Biometra, Göttingen
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Schleicher & Schüll, Dassel
 Stratagene, La Jolla, U.S.A.
 Pall Europe, Portsmouth, England
 BioRad, München
 Genra Systems, Minneapolis, U.S.A.
 Pall Europe, Portsmouth, England
 Qiagen, Hilden
 Eastman Kodak, Rochester, U.S.A.
 Hewlett-Packard
 Stratagene, La Jolla, U.S.A.
 Biometra, Göttingen
 Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)
 Klenow-Polymerase
 Proteinase K
 RNase A
 Taq-Polymerase
 T4-DNA-Ligase
 Restriktionsenzyme

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

2.1.4 Marker

DNA-Längenstandards:
 1 kb DNA Ladder
 100 bp DNA Ladder
 Lambda-DNA
 Lambda-DNA/Hind III-Marker

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Protein-Molekulargewichtsmarker:
 Bench Mark™ Protein Ladder
 Perfect Protein™ Marker, 10-225 kDa

Invitrogen, Paisley, U.K.
 Novagen, Madison, U.S.A.

2.1.5 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente

Boehringer, Mannheim

Anti-Huhn-IgY-AP-Konjugat
 Anti-Huhn-IgY
 Protein A-10 nm Gold

Dianova, Hamburg
 Dianova, Hamburg
 Universität Utrecht, Niederlande

2.1.6 Bakterienstämme

Zur Herstellung der Cosmid-Genbank wurde der *E. coli*-Bakterienstamm DH5 α verwendet; als Positivkontrolle für die Verpackungsreaktion diente der mit den Verpackungsextrakten gelieferte Wirtsbakterienstamm VCS 257 (Stratagene). Für Transformationen im Rahmen von Klonierungsexperimenten wurden *E. coli* DH5 α Subcloning Efficiency Competent Cells bzw. Library Efficiency Competent Cells (Gibco BRL) sowie XL1-Blue Subcloning Grade Competent Cells (Stratagene) eingesetzt. Die rekombinante Expression von ORF2 und ORF3 erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q]; diese wurden uns von O. Fayet (Centre National De La Recherche Scientifique, Toulouse) zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Leishmania-Stämme

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

2.1.8 Vektoren und Plasmide

pcosTL:

Zur Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank von *L. donovani* wurde der Cosmid-Vektor pcosTL verwendet, der uns von J. M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine) zur Verfügung gestellt wurde. Die Vektorkarte ist in Abbildung 1 dargestellt. Es handelt sich um einen sogenannten *cosmid shuttle vector* von 8,5 kb, der für die Einbringung großer DNA-Fragmente in *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania donovani* konstruiert wurde (Kelly *et al.*, 1994).

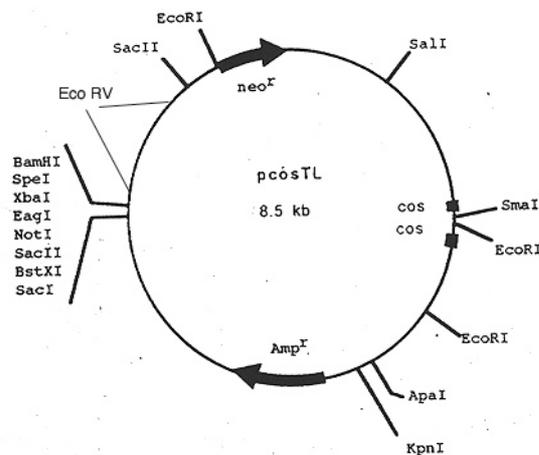


Abbildung 1: Plasmid-Karte von pcosTL (modifiziert nach Kelly *et al.*, 1994)

Zur Herstellung einer Cosmid-Genbank wurde pcosTL mit den Restriktionsendonukleasen *Sma* I und *Bam* HI geschnitten. Die Ligation der Vektorarme mit den genomischen DNA-Fragmenten erfolgte über die *Bam* HI-Schnittstellen; die abgebildeten zwei *cos*-sites ermöglichten die Verpackung in

Phagenpartikel. Die schwarzen Pfeile symbolisieren zwei verschiedene Antibiotika-Resistenzgene. Das β -Lactamase-Gen verleiht Resistenz gegen Ampicillin und dient zur Selektion in Bakterien. Durch das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das von 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des gGAPDH-Gens (= Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) aus *Trypanosoma cruzi* flankiert wird, erhalten die rekombinanten Leishmanien Resistenz gegen das Antibiotikum G418. Die zwei eingezeichneten *Eco* RV-Schnittstellen dienen zur Veranschaulichung des bei der Cosmidanalyse standardmäßig durchgeführten *Eco* RV/*Xba* I-Restriktionsverdaus.

pJC45:

Das bakterielle Expressionsplasmid pJC45 stammt von J. Clos und ist in Abbildung 13 dargestellt. Es handelt sich um ein Derivat des Plasmids pJC40 (Clos & Brandau, 1994), das neben dem Promotor für die T7-RNA-Polymerase auch einen *lac*-Operator enthält. Die rekombinant exprimierten Proteine erhalten eine N-terminale Addition von 20 Aminosäuren inklusive Histidin-*tag*, der eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht. In pJC45 wurden die offenen Leserahmen von ORF2 und ORF3 aus *L. donovani* subkloniert; diese Gene wurden im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsstrategie identifiziert. Die rekombinante Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)[pAPlac^Q].

pIRSAT-3:

Das Expressionsplasmid pIRSAT-3 ist ein Derivat des Plasmids pIR1-SAT, das uns von S. Beverley (Washington University Medical School, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich hierbei um ein Plasmid, das eine stadienspezifische Expression in *Leishmania* ermöglicht. Durch Verdau von pIR1-SAT mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III, eine nachfolgende Klenow-Auffüllreaktion zur Herstellung glatter Enden und eine abschließende Religation wurde die *Hind* III-Schnittstelle aus dem Originalplasmid entfernt (J. Clos, unveröffentlicht), und es entstand pIRSAT-3 (Abbildung 19). Die Klonierung von ORF2 bzw. ORF3 erfolgte in die amastigotenspezifische Expressions-*site* des Plasmids; dabei kontrollieren 3'-UTR-Sequenzen einer ausschließlich im Amastigotenstadium exprimierten Cysteinproteinase aus *L. mexicana mexicana* die stadienspezifische Expression. Das mit *Swa* I linearisierte Plasmid wurde bei der Tranfektion stabil in das *Leishmania*-Genom integriert; die Selektion erfolgte unter Nourseothricin. Die rekombinanten *L. major* wurden für *in vivo*-Selektionsexperimente eingesetzt.

2.1.9 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für Amplifikations- bzw. Sequenzierreaktionen mittels PCR eingesetzt; unterstrichene Bereiche markieren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die für Klonierungszwecke eingefügt wurden.

Amplifikation von *L. donovani*-ORF2 zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde bzw. zur Klonierung in pJC45:

10654 (ORF2, *Nde* I) 5'-GGGGTACCCATATGATGGGAATGCTGTCG-3'
 # 10655 (ORF2, *Bam* HI) 5'-GGGGATCCTCACCCTTTCACACAAAGC-3'

Amplifikation von *L. donovani*-ORF7 zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde:

#10656 (ORF7, *Nde* I) 5'-GGGGTACCCATATGTGCTCCCCTGCTGTG-3'
 #10657 (ORF7, *Bam* HI) 5'-GGGGATCCTAGTTCTCCATCTGTATC-3'

Amplifikation von *L. donovani*-ORF3 zur Klonierung in pJC45:

#CL031 (ORF3, *Nde* I) 5'-GGGGTACCATATGAAGCGTTTCCGTGAGG-3'

#CL033 (ORF3, *Bcl* I/*Bgl* II) 5'-GGGGTGTATCAGATCTTACTCGGCAAATTGCAGTC-3'

Amplifikation von *L. donovani*-ORF3 zur Klonierung in pIRSAT-3:

#CL023 (ORF3, *Eco* RV) 5'-GGGATATCTTCCCTCCCGCTTGCCGATG-3'

#CL024 (ORF3, *Xba* I) 5'-GCTCTAGACTACTCGGCAAATTGCAGTCG-3'

Multiplex-PCR zum Nachweis spezifischer Fragmente für pIRSAT-3, *L. donovani*-ORF2 und *L. donovani*-ORF3 in genomischer DNA von *L. major*-Transfektanden:

#CL015 (5'-pIR/A) 5'-GACCACAACGGTTTCCCTCTAG-3'

#CL063 (5'-ORF2) 5'-GAATCGACAGTTGATGCTTGACG-3'

#CL064 (5'-ORF3) 5'-CAACTCTTCGCATGCTTGCCTG-3'

#CL010 (3'-pIR/A) 5'-CAAAGTAGTGGAAGATATCGCTG-3'

Sequenzierprimer für pcosTL (zur Sequenzierung der genomischen DNA-Fragmente von den Enden her):

#CH-2 5'-CCGTGTGATATCAGATGCCC-3'

#M13R 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

2.1.10 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

1 x PBS (pH 7,0):
 2,6 mM Kaliumchlorid
 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 136 mM Natriumchlorid
 8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-heptahydrat

TE-Puffer (pH 8,0):
 10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA

1 x TAE-Puffer:
 40 mM Tris-Acetat
 1 mM EDTA

1 x TBE-Puffer:
 89 mM Tris-Borat
 2 mM EDTA

1 x TBS-Puffer:
 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 150 mM Natriumchlorid

2.1.11 Häufig verwendete Medien

M199-Medium (pH 7,0):
 1 x M199-Medium
 25% FCS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)
 0,2% Natriumhydrogencarbonat
 20 µg/ml Gentamicin

Einfriermedium:	30% M199-Medium mit 25% FCS 50% FCS (hitzeinaktiviert) 20% DMSO
M199-Medium (pH 5,5):	1 x M199-Medium 25% FCS (hitzeinaktiviert) 25 mM MES 20 µg/ml Gentamicin
modifiziertes M199-Medium (pH 7,0): (nach Kapler <i>et al.</i> , 1990)	1 x M199-Medium 25% FCS (hitzeinaktiviert) 0,2% Natriumhydrogencarbonat 40 mM HEPES (pH 7,4) 100 µM Adenin 1,2 µg/ml 6-Biopterin 10 µg/ml Haemin 20 µg/ml Gentamicin
<i>circle grow</i> -Medium:	40 g/l <i>circle grow</i>
<i>circle grow</i> -Platten:	40 g/l <i>circle grow</i> 15 g/l Agar 100 µg/ml Ampicillin bzw. ohne Antibiotikum

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung promastigoter *Leishmania*-Zellen erfolgte in M199-Medium (pH 7,0) bei 25°C in Zellkulturflaschen aus Polystyren (Greiner). Bei rekombinanten *Leishmania*-Stämmen wurden dem Medium die jeweiligen Antibiotika hinzugefügt. Die Zellkulturen wurden zweimal pro Woche verdünnt, um ein logarithmisches Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Für Experimente wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit einer Dichte von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml eingesetzt. Die Zellzählung erfolgte mit dem CASY-Zellcounter & Analyzer (Schärfe System).

2.2.2 Einfrieren von Stammkulturen

Leishmania-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 min, 720 x g, 4°C). Das Zellsediment wurde in je einem Volumen Einfriermedium und einem Volumen eisgekühltem M199-Medium aufgenommen, so dass die Zelldichte $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde in 1 ml-Aliquots in vorgekühlte Zellkultur-röhrchen (Nalgene, 1,5 ml) pipettiert und in einem Styroporbehälter für mindestens 2 h oder über Nacht bei -70°C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.2.3 *In vitro*-Kultivierung von axenischen Amastigoten

Rekombinante *L. donovani* aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in M199-Medium (pH 7,0) eingestellt und in Zellkulturflaschen mit gasundurchlässigem Deckel bei 37°C in einem Brutschrank mit Kohlendioxid/Luftgemisch-Begasung (5% CO₂, 95% Luft) für 24 h kultiviert. Um ein großes Oberflächen : Volumen-Verhältnis zu schaffen, wurden Zellkulturflaschen von 25 cm² mit maximal 12 ml, Zellkulturflaschen von 75 cm² mit maximal 30 ml sowie 150 cm²-Flaschen mit höchstens 120 ml Zellsuspension befüllt. Nach 24 h hatte sich die Zelldichte auf ca. 1×10^7 Zellen/ml erhöht; die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min, 720 x g, RT) und das Sediment in dem doppelten Ausgangsvolumen M199-Medium (pH 5,5) resuspendiert. Die Zellkulturen wurden für weitere 5 Tage bei 37°C inkubiert, wobei der Differenzierungsprozess mikroskopisch kontrolliert wurde. Die Gewinnung axenischer amastigoter Parasiten diente ausschließlich zur Herstellung von Proteinproben; üblicherweise wurden zu diesem Zweck Zellysate vom 3. Tag der Kultivierung in saurem Medium verwendet.

2.2.4 Transfektion durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellsuspensionen zusammen mit der zu transfizierenden DNA kurzen elektrischen Pulsen ausgesetzt. Dadurch werden in der Zellmembran Poren erzeugt, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann.

Die Elektroporation promastigoter Leishmanien wurde nach Kapler *et al.* (1990) durchgeführt. *Leishmania*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 min, 720 x g, 4°C), zweimal mit eisgekühltem PBS (pH 7,0) und einmal mit eisgekühltem Elektroporationspuffer (21 mM HEPES, pH 7,5; 137 mM Natriumchlorid; 5 mM Kaliumchlorid; 0,7 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-heptahydrat; 6 mM Glukose) gewaschen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in Elektroporationspuffer aufgenommen. 400 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit der zu transfizierenden DNA in einer auf Eis gekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4 cm) vorgelegt. Zum Zweck der homologen Rekombination wurden 2 µg linearisierte DNA verwendet; bei Transfektion von Episomen wurden 50 µg zirkuläre DNA eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Transfektionsansatz ohne DNA ("Mock"). Mit Hilfe des Gene Pulser™ (BioRad) erfolgte die Elektroporation durch drei Stromstöße bei 3750 V/cm und 25 µF; die Zeitkonstante lag zwischen 0,5 und 1 ms. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Transfektionsansätze in 10 ml M199-Medium überführt. Nach 24 h wurden die Zellkulturen zentrifugiert (10 min, 720 x g, RT) und in 10 ml frischem M199-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 µg/ml G418 bzw. 150 µg/ml Nourseothricin) zur Selektion der rekombinanten Leishmanien aufgenommen. Die Selektionsdauer betrug im allgemeinen 10-14 Tage; die rekombinanten *Leishmania*-Zellen wurden anschließend für eine Mausinfektion eingesetzt bzw. zur Langzeitlagerung eingefroren (Kapitel 2.2.2).

2.2.5 Mausinfektionsexperimente mit rekombinanten *L. major*

Rekombinante *L. major* wurden in modifiziertem M199-Medium bei 25°C bis zum Erreichen der spätlogarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Über 2-3 Tage erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, so dass sich die Zellkulturen am Ende mit einer Dichte von $6-8 \times 10^7$ Zellen/ml in der Stationärphase befanden. Nach Sedimentation der *Leishmania*-Zellen (10 min, 720 x g, 4°C) und zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS (pH 7,0) wurden

üblicherweise 5×10^7 Zellen/25 μ l PBS subkutan in den rechten Hinterfuß weiblicher BALB/c-Mäuse (6-8 Wochen alt) inokuliert. Die Dokumentation des Infektionsverlaufs erfolgte durch wöchentliche Dickenmessung der Fußballen, wobei die Läsionsgröße als Differenz zwischen infiziertem und uninfiziertem Fuß ermittelt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 10-12 Wochen wurden die Mäuse getötet und drainierende Lymphknoten sowie Milzen entnommen. Die Organe wurden in 6 ml modifiziertem M199-Medium homogenisiert. Ein Teil des Homogenats wurde für eine *limiting dilution*-Analyse (Kapitel 2.2.6) zur Bestimmung der Parasitenlast eingesetzt, während der Rest bei 25°C kultiviert wurde. Nach dem Anwachsen der Leishmanien wurden die Zellkulturen auf ein größeres Volumen erweitert und entweder für eine weitere Mausinfektion oder zur Präparation von Cosmid-DNA (Kapitel 2.2.13.2) bzw. zur Selektion von Einzelklonen (Kapitel 2.2.7) und deren weiterer Analyse verwendet.

2.2.6 Limiting dilution-Analyse

Für eine *limiting dilution*-Analyse wurden in einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Nunc) in jeder Vertiefung mit Ausnahme der ersten Reihe 150 μ l modifiziertes M199-Medium vorgelegt. In die Vertiefungen der ersten Reihe wurden je 300 μ l der entsprechenden Zellsuspension pipettiert. Aus der ersten Reihe wurden 150 μ l entnommen und in die Vertiefungen der zweiten Reihe überführt; durch Wiederholung der Arbeitsschritte wurde eine serielle Verdünnung auf zwei Mikrotiterplatten hergestellt. Nach Inkubation der Platten bei 25°C über einen Zeitraum von 2-3 Wochen wurde die Verdünnungsstufe ermittelt, bei der in 37,5% der Vertiefungen einer Reihe noch Zellwachstum festgestellt werden konnte. Dieser Verdünnung wurde die Ausgangskonzentration von einem Parasiten pro Vertiefung zum Zeitpunkt des Ausplattierens zugrunde gelegt und daraus die Gesamtzahl der Parasiten im Versuchsansatz berechnet. Die *limiting dilution*-Analyse wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz sowie zur Quantifizierung der Parasitenlast in den Organen der mit rekombinanten *L. major* infizierten BALB/c-Mäuse eingesetzt.

2.2.7 Selektion von Einzelklonen

Für die Selektion von Einzelklonen rekombinanter Leishmanien nach einem Mausinfektionsexperiment wurden die Zellen nach dem Anwachsen in der Kultur zunächst auf eine Ausgangskonzentration von 1×10^7 Zellen/ml gebracht. Im folgenden wurde über mehrere Verdünnungsschritte eine Endkonzentration von 5 Zellen/ml hergestellt und mit dieser Zellsuspension eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Nunc) mit je 200 μ l pro Vertiefung befüllt. Theoretisch befand sich in jeder Vertiefung eine Zelle. Nach 2-3-wöchiger Inkubation bei 25°C konnte bei 33,3% Wachstum auf einer Platte davon ausgegangen werden, dass Einzelklone selektiert wurden. Diese wurden daraufhin in ein größeres Kulturvolumen überführt und zur Herstellung von genomischer DNA (Kapitel 2.2.9.2) verwendet.

2.2.8 In vitro-Makrophageninfektion

Aus den Oberschenkelknochen frisch getöteter BALB/c-Mäuse wurde das Knochenmark mit PBS (pH 7,0) herausgespült. Nach Zentrifugation (5 min, 600 x g, 4°C) wurde das Zellsediment zur Lyse der Erythrozyten mit sterilem H₂O versetzt und nach 30 Sekunden durch Zugabe von 10 x PBS auf eine Endkonzentration von 1 x PBS eingestellt, wodurch der Prozess der Erythrozytenlyse gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde erneut sedimentiert (5 min, 600 x g, 4°C) und in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Um größere Gewebestücke

aus der Suspension zu entfernen, wurde diese durch eine sterile Kompresse filtriert und nachfolgend in eine beschichtete Zellkultur-Petrischale (Greiner Cellstar, 94/16 mm, TC) pipettiert. Nach Zugabe von 1,5 ml CSF-1-konditionierten Mediums, das aus dem Kulturüberstand von L929-Zellen gewonnen wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen in frische, unbeschichtete Petrischalen überführt (eine Schale pro Maus); das Volumen wurde mit RPMI-Medium auf 8,5 ml aufgefüllt, und es erfolgte erneut die Zugabe von 1,5 ml CSF-1-konditionierten Mediums. Im folgenden wurden die Zellen über eine Woche bei 37°C inkubiert und während dieser Zeit zweimal mit CSF-1-konditioniertem Medium versetzt. CSF-1 bewirkt die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen. Nach einer Woche wurde der Überstand entfernt und die Makrophagen durch Zugabe von eiskaltem PBS (pH 7,0) und durch leichtes Abschaben vom Plattenboden gelöst. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 600 x g, 4°C), in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Makrophagen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und nach Sedimentation (5 min, 600 x g, 4°C) in eiskaltem modifiziertem M199-Medium in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen. 200 μ l dieser Makrophagensuspension (2×10^5 Zellen) wurden in *chamber slides* (Nunc) überführt und zur Adhäsion der Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Promastigote Stadien verschiedener *L. major*-Stämme wurden mit Hilfe des CASY-Zellcounters gezählt und in modifiziertem M199-Medium auf eine Dichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 40 μ l dieser *Leishmania*-Kulturen (4×10^5 Zellen) wurden zu den Makrophagen gegeben und für 4 h bei 35°C inkubiert. Die Ansätze wurden daraufhin zweimal mit modifiziertem M199-Medium gespült, um nicht-phagozytierte Leishmanien zu entfernen, und über 1-3 Tage bei 35°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Methanol fixiert und nach einer Giemsa-Färbung mikroskopisch untersucht.

2.2.9 Isolierung von genomischer DNA aus *Leishmania*-Zellen

2.2.9.1 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA zur Herstellung der Cosmid-Genbank

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien wurde ein Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) benutzt. $3-4 \times 10^9$ *Leishmania*-Zellen wurden sedimentiert (10 min, 720 x g, 4°C), zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^9 Zellen/ml in TE aufgenommen. Nach Zugabe von 10 Vol. DNA-Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA, pH 8,0; 20 μ g/ml RNase A; 0,5% SDS) wurde die Zellsuspension für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Dem Zelllysate wurde 100 μ g/ml Proteinase K hinzugefügt und es erfolgte eine dreistündige Inkubation unter leichtem Schütteln bei 50°C. Nach Abkühlung auf RT wurde zur Entfernung der Proteine dreimal mit 1 Volumen Phenol (Tris-HCl-gesättigt, pH 8,0) extrahiert. Um Scherkräfte zu vermeiden, wurde die Phasentrennung nicht durch Zentrifugation beschleunigt und der wässrige Überstand erst nach der letzten Phasentrennung, die über Nacht erfolgte, mit einer weiten Pipettenspitze abgenommen. Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die genomische DNA durch Fällung mit 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol als weiße Flocke sichtbar und mit Hilfe einer zu einem Haken ausgezogenen Pasteurpipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde in TE (pH 8,0) aufgenommen und für 1-2 Tage bei RT auf dem Rollenmischer zur vollständigen Resuspension inkubiert. Die Qualitätskontrolle der genomischen DNA

erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.16); die Konzentration wurde durch photometrische Messung bestimmt.

2.2.9.2 Isolierung von genomischer DNA mit Hilfe des *Puregene DNA Purification Kit* (Genra Systems)

Die Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien für eine Multiplex-PCR-Analyse (Kapitel 2.2.15.1) bzw. aus den Lymphknoten und Milzen von mit *Leishmania* infizierten BALB/c-Mäusen für eine *real time*-PCR (Kapitel 2.2.15.2) erfolgte mit Hilfe des *Puregene DNA Purification Kit*, da in diesen Fällen keine hochmolekulare DNA benötigt wurde. Für eine genomische DNA-Präparation wurden $1-2 \times 10^8$ *Leishmania*-Zellen sedimentiert (10 min, 720 x g, 4°C) und zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Im Falle der Lymphknoten bzw. Milzen wurden die Organisolatate zunächst homogenisiert; für die DNA-Isolation wurde ein gesamtes Lymphknoten-Homogenat bzw. die Hälfte eines Milz-Homogenats eingesetzt. Das Prinzip der DNA-Extraktion beruht bei dieser Methode auf einer Lyse der Zellen in Anwesenheit eines DNA-Stabilisators, der die DNase-Aktivität einschränkt und so die DNA vor einem vorzeitigen Abbau bewahrt. Nach Entfernung der RNA werden die Proteine ausgefällt; die im Überstand enthaltene DNA wird durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert und in einem Hydratationspuffer mit DNA-Stabilisator aufgenommen. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerprotokoll, wobei die Reagenzienmengen der eingesetzten Zellzahl bzw. dem Organgewicht angepasst wurden.

2.2.10 Herstellung einer Cosmid-Genbank

Die Herstellung der Cosmid-Genbank von *L. donovani* erfolgte weitgehend nach den Protokollen von Sambrook *et al.* (1989) und Descoteaux *et al.* (1994).

2.2.10.1 Partialverdau genomischer DNA

Für die Herstellung einer Cosmid-Genbank in dem Cosmid-*Shuttle*-Vektor pcosTL (Abbildung 1) wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 30-45 kb benötigt. Zu diesem Zweck sollte die genomische DNA möglichst zufällig und unabhängig von der Basensequenz in Fragmente der erforderlichen Größe zerlegt werden. Dies kann einerseits durch Scherung der genomischen DNA erfolgen; eine weitere Möglichkeit ist der Partialverdau mit einem Restriktionsenzym, das eine häufig auftretende Tetranukleotidsequenz erkennt und außerdem überhängende Enden erzeugt, die mit dem Vektor kompatibel sind. In unserem Fall wurden die genomischen DNA-Fragmente durch Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease *Sau* 3AI hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 300 µg genomische DNA mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 10 x Restriktionspuffer A (Boehringer) so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 0,2 µg DNA/µl in 1 x Restriktionspuffer A erreicht wurde. In mehreren Vorversuchen wurden je 12,5 µl der DNA-Verdünnung (d.h. 2,5 µg DNA) mit verschiedenen *Sau* 3AI-Konzentrationen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 20 mM EDTA und 10-minütiger Inkubation bei 70°C. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die Enzymkonzentration ermittelt, die zur Herstellung von DNA-Fragmenten der gewünschten Größe führte. In einem präparativen Partialverdau wurden 40 µg DNA eingesetzt und mit der entsprechenden *Sau* 3AI-Konzentration für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol präzipitiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt (Kapitel 2.2.14.2). Die Dephosphorylierung des Partialverdaus sollte

bei einer späteren Ligationsreaktion die Zusammenlagerung genomischer DNA-Fragmente verhindern, wodurch möglicherweise Cosmide mit normalerweise nicht im Genom benachbarten DNA-Sequenzen entstehen könnten (Ish Horowicz & Burke, 1981). Es erfolgte eine dreimalige Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) sowie eine dreimalige Extraktion mit 1 Volumen Chloroform. Nach dem Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNA erneut durch Zugabe von 0,1 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 30 μ l TE *low* (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA) gelöst.

2.2.10.2 Ligationsreaktion mit dem Cosmidvektor pcosTL

Der Cosmidvektor pcosTL wurde nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen *Sma* I und *Bam* HI geschnitten, wodurch zwei Vektorarme entstanden. In einer Ligationsreaktion sollten diese Vektorarme über ihre *Bam* HI-Enden mit den genomischen DNA-Fragmenten aus dem *Sau* 3AI-Verdau verknüpft werden. Um eine Religation des Vektors über die *Sma* I-Enden zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA nach Linearisierung durch *Sma* I dephosphoryliert (Kapitel 2.2.14.2) und die Ligationsbedingungen so gewählt, dass eine *blunt end*-Ligation unterdrückt wurde. Dies kann durch eine niedrige Ligasekonzentration sowie durch eine hohe ATP-Konzentration (Ferretti & Sgaramella, 1981) erreicht werden. In einem 20 μ l-Ligationsansatz wurden 1 μ g der genomischen DNA-Fragmente und 2,13 μ g der Vektorarme (entsprechend einem molaren Vektor : Insert-Verhältnis von 10 : 1) sowie 2 μ l 10 x Ligationspuffer, 5 mM ATP und 1 Weiss-Unit T4-Ligase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 4°C.

2.2.10.3 *In vitro*-Verpackung

Durch die Ligationsreaktion entstehen linearisierte DNA-Moleküle, die aus einem Abschnitt genomischer DNA, flankiert von zwei Vektorarmen mit jeweils einer *cos*-Stelle, bestehen. Bei der *in vitro*-Verpackung werden die *cos*-Stellen geschnitten und die rekombinierten Cosmide in Phagenpartikel befördert. Diese Verpackungsreaktion funktioniert jedoch nur, wenn die beiden *cos*-Stellen in einem Abstand von 38-52 kb, d.h. innerhalb der Verpackungsgrenzen der Phagenpartikel liegen. Daher können Vektorarme, die bei der Ligation über ihre *Bam* HI-Enden verknüpft wurden und kein Insert enthalten, aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht in Phagenköpfe verpackt werden. Mit den Phagenpartikeln werden nachfolgend *E. coli*-Kulturen infiziert. Die in die Wirtsbakterien eingeschleuste linearisierte DNA wird dabei über die *cos*-Stellen wieder zum Ring verknüpft und verhält sich in der Bakterienzelle wie Plasmid-DNA, da der Vektor pcosTL sowohl einen Replikationsursprung als auch ein Ampicillinresistenzgen besitzt.

Für die Verpackungsreaktion wurde der Gigapack \square III Gold Packaging Extract (Stratagene) verwendet. Zu 25 μ l schnell aufgetautem Verpackungsextrakt wurden 4 μ l des Ligationsansatzes (entsprechend 0,2 μ g Insert-DNA) pipettiert, vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und für 1,5-2 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l SM-Puffer (100 mM Natriumchlorid; 20 mM Magnesiumsulfat; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01% Gelatine) und 20 μ l Chloroform wurde der Ansatz nach leichtem Mischen zentrifugiert (5 min, 12000 x g, RT), um Zelltrümmer zu entfernen. Der die Phagensuspension enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Als Qualitätskontrolle der Verpackungsextrakte wurde eine mit den Extrakten gelieferte Test-Lambda-DNA nach Herstellerangaben verpackt.

2.2.10.4 Vorbereitung der Wirtsbakterien

Als Wirtsbakterienstamm wurde *E. coli* DH5 α verwendet. 5 ml CG-Medium mit 10 mM Magnesiumsulfat und 0,2% Maltose wurden mit einer DH5 α -Kolonie aus einer frischen Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5-1 und mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 500 x g, RT) und das Zellsediment in 2 ml 10 mM Magnesiumsulfat aufgenommen. Bis zur Infektionsreaktion wurden die Wirtsbakterien bei 4°C gelagert und unmittelbar vor Zugabe der Phagensuspension mit 10 mM Magnesiumsulfat auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Für die Positivkontrolle der Verpackungsextrakte wurde der mitgelieferte Wirtsbakterienstamm VCS 257 eingesetzt; die Vorbereitung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.10.5 Infektion von *E. coli* und Bestimmung der Effizienz der Verpackungsreaktion

Von der Phagensuspension (2.2.10.3) wurde eine 1:10- und eine 1:50-Verdünnung in SM-Puffer (100 mM Natriumchlorid; 20 mM Magnesiumsulfat; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01% Gelatine) hergestellt. 25 μ l aus jeder Verdünnung wurden mit 100 μ l Wirtsbakterien (2.2.10.4) gemischt, 15 min bei RT und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml CG erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C zur Expression des Ampicillinresistenzgens. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 1040 x g, RT), der Überstand wurde bis auf 200 μ l abgenommen und das Zellsediment nach Resuspension auf CG-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt und die Effizienz der Cosmid-DNA-Verpackungsreaktion in *colony forming units* (cfu)/ μ g eingesetzter DNA ermittelt. Bei einer ausreichenden Anzahl von cfu/ μ g DNA wurden die restlichen 16 μ l des Ligationsansatzes ebenfalls, wie unter 2.2.10.3 beschrieben, verpackt. Nach Infektion von *E. coli* mit jeweils einer 1:10- und 1:50-Verdünnung der Phagensuspension wurde die durchschnittliche Verpackungseffizienz aus dem Mittelwert aller 5 Verpackungsreaktionen berechnet.

2.2.10.6 Amplifikation der Cosmid-Genbank und Bestimmung des Titers

Zur Amplifikation der Cosmid-Genbank wurden alle 5 Verpackungsansätze vereinigt. Aus der durchschnittlichen Verpackungseffizienz wurde die Menge an Phagensuspension ermittelt, die 10⁴ cfu lieferte; pro Infektionsreaktion wurde diese Phagensuspension mit 2 Volumen der vorbereiteten Wirtsbakterien gemischt. In dieser Weise wurde der gesamte Verpackungsansatz zur Infektion von *E. coli* DH5 α eingesetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT und weiteren 15 Minuten bei 37°C wurden 4 Volumen CG dazugegeben und die Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (10 min, 720 x g, RT), der Überstand bis auf 500 μ l entfernt und die Bakterien nach Resuspension auf CG-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterienkolonien mit CG-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) und mit Hilfe eines *cell scraper* (Costar, Cambridge, USA) von den Platten abgeschwemmt und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Die Bakteriensuspension wurde mit 18% Glycerin versetzt und in 1 ml-Aliquots in Nunc-Cryoröhrchen pipettiert. Nach 1,5-2 h bei -20°C wurde die amplifizierte Cosmid-Genbank zur Langzeitlagerung in -70°C überführt. Zur Bestimmung des Titers wurde eine 10⁻⁶- und eine 10⁻⁷-Verdünnung der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen CG-Platten (100 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Auszählung der Kolonien wurde der Titer der Cosmid-Genbank in cfu/ml ermittelt.

2.2.11 Transformation

50 μ l kompetente DH5 α -Zellen (Subcloning Efficiency Competent Cells, Gibco BRL) wurden mit 1 μ l Plasmid-DNA bzw. 2 μ l eines Ligationsansatzes gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation von Cosmid-DNA wurden 5 μ l DNA und 25 μ l DH5 α -Zellen (Library Efficiency Competent Cells, Gibco BRL) eingesetzt. Nach einem Hitzeschock bei 37°C (25 s bei Retransformation von Plasmid-DNA, 45 s bei einem Ligationsansatz), der die DNA-Aufnahme durch die Zellen erleichtern soll, und zweiminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml-CG-Medium. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C geschüttelt, zentrifugiert (5 min, 1040 x g, RT) und der Überstand bis auf 100-200 μ l verworfen. Nach Resuspension der Bakterienzellen wurden diese auf CG-Platten mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Transformation von *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] wurden 25 μ l kompetente Zellen mit 1 μ l Plasmid-DNA zusammengegeben und 30 min auf Eis gehalten. Daraufhin erfolgte für 30 s eine Hitzebehandlung bei 42°C, eine zweiminütige Inkubation auf Eis sowie die Zugabe von 500 μ l CG-Medium. Die Zellen wurden nach einstündigem Schütteln bei 37°C und Sedimentation auf CG-Platten mit Ampicillin (100 μ g/ml) und Kanamycin (10 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.12 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.12.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Mini-Präparation)

Die Plasmid-DNA-Minipräparation wurde zur Analyse transformierter *E. coli*-Zellen eingesetzt. 2,5 ml CG-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin wurden mit einzelnen Bakterienkolonien beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (2 min, 16100 x g, RT) und in 200 μ l Lösung I (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 400 μ l Lösung II (0,2 M Natriumhydroxid, 1% SDS), vorsichtigem Mischen und zweiminütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden Zelltrümmer, Proteine und SDS durch Zugabe von 300 μ l Lösung III (3 M Kaliumacetat, 2 M Eisessig) und 5-minütiger Inkubation auf Eis gefällt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (30 min, 16100 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 0,7 Vol. Isopropanol zur Fällung der DNA (10 min, RT) überführt. Nach Zentrifugation (20 min, 16100 x g, RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 30 μ l TE mit RNase A (20 μ g/ml) aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse der isolierten Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.14.1) und Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.16).

2.2.12.2 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Midi-Präparation)

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden 200 ml CG-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde, wie in Kapitel 2.2.12.1 beschrieben, aufgearbeitet; die Volumina der einzusetzenden Plasmid-Lösungen wurden auf 5 ml Lösung I, 10 ml Lösung II und 7,5 ml Lösung III erhöht. Die Zentrifugation zur Abtrennung von Proteinen, Zelltrümmern und SDS erfolgte in einer Beckman-Zentrifuge (Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C); der Überstand wurde durch einen Rundfilter (Melitta) filtriert und nach Zugabe von 20 μ g/ml RNase A für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) durchgeführt. Nach Zentri-

fugation (5 min, 720 x g, RT) wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei RT gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (30 min, 3000 x g, RT), das DNA-Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 200-400 μ l TE gelöst.

2.2.12.3 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation)

Zur Isolierung hochreiner superhelikaler DNA wurde die Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation angewendet.

400 ml CG-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin wurden mit einer Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA10, 20 min, 4000 upm, 4°C) wurde das Bakteriensediment in 10 ml Lösung I resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 20 ml Lösung II und 5-minütiger Inkubation auf dem Rollenmischer bei RT lysiert. Durch Hinzufügen von 15 ml Lösung III, 10-minütiger Inkubation auf Eis, anschließender Zentrifugation (30 min, 8000 upm, 4°C) und Filtration des Überstandes durch einen Rundfilter (Melitta) wurden Zelltrümmer, ausgefällte Proteine und SDS aus der Lösung entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol gefällt, 10 min bei RT inkubiert und durch Zentrifugation (30 min, 3000 x g, RT) sedimentiert. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Sediment nach dem Trocknen in 4 ml TE vollständig gelöst.

Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 150 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 4,9 g Cäsiumchlorid versetzt, gut gemischt und in ein 5 ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Quick Seal, Beckman) überführt. Die Probenröhrchen wurden durch Zugabe von 50%iger Cäsiumchloridlösung austariert und luftblasenfrei verschweißt. Nach dem Zentrifugationslauf (Beckman Ultrazentrifuge/Rotor NVT90, 60000 upm, 25°C, 16 h) wurde das Röhrchen geöffnet und die superhelikale DNA-Bande mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen. Zur weiteren Aufreinigung konnte die DNA in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit 50%iger Cäsiumchloridlösung aufgefüllt, zugeschweißt und erneut zentrifugiert werden (6 h, 60000 upm, 25°C). Auf diesen zweiten Zentrifugationsschritt wurde jedoch häufig verzichtet. Die superhelikale DNA wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit 0,5-1 Volumen Ammoniumacetat-gesättigtem Isopropanol von interkalierendem Ethidiumbromid befreit. Nach Zugabe von 2 Volumen A. dest. wurde die DNA mit 0,1 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gefällt, zentrifugiert (30 min, 3000 x g, RT), das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 0,5-1 ml TE über Nacht gelöst.

Als Alternative zur Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation wurde DNA in größerem Maßstab auch mit Hilfe des QIAGEN-tip 500 Plasmid Maxi-Kit hergestellt; die Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ einer Menge von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA; die DNA-Konzentration berechnet sich also nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 / 1000$$

2.2.13 Isolierung von Cosmid-DNA

2.2.13.1 Präparation von Cosmid-Genbank-DNA

Für die Transfektion von *L. major* wurde die *L. donovani*-Cosmid-Genbank-DNA aus *E. coli* DH5 α isoliert.

500 ml CG-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einem 1 ml-Aliquot der in *E. coli* amplifizierten Cosmid-Genbank (Kapitel 2.2.10.6) beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA10, 5000 upm, 10 min, 4°C) wurde das Bakteriensediment in 12 ml Lösung I (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert, durch Hinzufügen von 24 ml Lösung II (0,2 M Natriumhydroxid, 1% SDS) und 10-minütiger Inkubation bei RT auf dem Rollenmischer lysiert und nach Zugabe von 18 ml Lösung III (3 M Kaliumacetat, 2 M Eisessig) für 20 min auf Eis gelagert. Der Ansatz wurde 30 min bei 0°C und 10000 upm (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA10) zentrifugiert, der Überstand durch einen Rundfilter (Melitta) filtriert und nach Hinzufügen von 40 µg/ml RNase A für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1), bei der die obere wässrige Phase nach Sedimentation (30 min, 1860 x g, RT) in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Fällung der Cosmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und Zentrifugation (30 min, 1860 x g, RT). Das DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach in 7,5 ml A. dest. gelöst. Zur Reinigung der Cosmid-DNA wurde eine weitere Fällungsreaktion durchgeführt. Nach Zugabe von 1 Volumen PEG-Lösung (13% PEG 6000, 0,8 M Natriumchlorid), einer einstündigen Inkubation auf Eis und nachfolgender Sedimentation (1 h, 3000 x g, 4°C) wurde das Cosmid-DNA-Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 200 µl TE aufgenommen und über Nacht bei 37°C gelöst.

2.2.13.2 Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien

Aus rekombinanten *L. major*, die nach einer Mauspassage aus Lymphknoten und Milzen reisoliert werden konnten (Kapitel 2.2.5), wurde Cosmid-DNA präpariert. Zu diesem Zweck wurden 1-2 x 10⁹ *Leishmania*-Zellen zentrifugiert (10 min, 1174 x g, 4°C) und zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei einer Cosmid-DNA-Mini-Präparation (Kapitel 2.2.12.1); die Mengen der einzusetzenden Plasmid-Lösungen betragen dabei 2 ml Lösung I, 4 ml Lösung II und 3 ml Lösung III. Außerdem wurde der Reaktionsansatz nach Abtrennung von Zelltrümmern, Proteinen und SDS zusätzlich durch einen Rundfilter (Melitta) filtriert. Die Cosmid-DNA wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* DH5α (Kapitel 2.2.11) eingesetzt, um Einzelklone zu erhalten. Durch Cosmid-DNA-Minipräparation und anschließende Restriktionsanalyse wurden Cosmide identifiziert, die während der Mauspassage in den rekombinanten *L. major* erhalten geblieben waren.

2.2.14 Enzymatische Modifizierung von DNA

2.2.14.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurde 1 µg DNA mit 1 U des entsprechenden Enzyms in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 10-15 µl für mindestens 1 h inkubiert. Die weitere Analyse erfolgte durch Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.16).

Für präparative Zwecke wurden 10-20 µg DNA in einem 100 µl-Reaktionsansatz mit 10-20 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert (Kapitel 2.2.16.1).

2.2.14.2 Dephosphorylierung von DNA

Die Behandlung von linearisierter DNA mit Alkalischer Phosphatase (CIP) führt zu Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen. Auf diese Weise wird die Rezirkulation linearisierter Vektor-DNA während einer Ligationsreaktion verhindert; dies hat eine erhöhte Klonierungseffizienz zur Folge.

Ein Restriktionsansatz von 100 μ l wurde mit 0,11 Vol. 10 x Dephosphorylierungspuffer (1 M Natriumchlorid; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,9; 0,1 M Magnesiumchlorid; 10 mM DTT) und 1 U CIP versetzt. Bei Plasmid-DNA mit 5'-Überhängen erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C; gegebenenfalls wurde nochmals Enzym dazugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Im Falle von 3'-Überhängen oder bei glatten Enden wurde zunächst für 15 min bei 37°C inkubiert; nach erneuter Zugabe von 1 U CIP erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 55°C. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration: 5mM) und 10-minütiger Inkubation bei 75°C erreicht. Zur Aufreinigung der dephosphorylierten Plasmid-DNA wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit nachfolgender gelelektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 2.2.16) durchgeführt. Nach Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel (Kapitel 2.2.16.1) wurden diese in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

2.2.14.3 Klenow-Auffüllreaktion zur Herstellung glatter Enden

Die große Untereinheit der DNA-Polymerase I wird auch als Klenow-Fragment bezeichnet. Ihm fehlt die 5' \rightarrow 3'-Exonukleaseaktivität, während die Polymerisierungsreaktion in gleicher Weise wie beim Holoenzym verläuft. Aus diesen Gründen eignet sich die Klenow-Polymerase zur Auffüllung doppelsträngiger DNA mit 5'-Überhang; dadurch werden glatte Enden erzeugt.

In einem 200 μ l-Reaktionsansatz wurden 10 μ g DNA in einem Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM Magnesiumchlorid; 7,5 mM DTT) mit 33 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 10 U Klenow-Polymerase für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 10 mM) sowie 10-minütiger Inkubation bei 75°C. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und darauffolgender Isolation der DNA-Fragmente (Kapitel 2.2.16.1) konnten diese in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

2.2.14.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylenden doppelsträngiger DNA-Moleküle.

100 ng Vektor-DNA und eine äquimolare Menge an Insert-DNA wurden in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM Magnesiumchlorid; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 μ g/ml BSA) unter Zugabe von 5 Einheiten T4-DNA-Ligase inkubiert; das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 10-20 μ l. Bei der Verknüpfung überhängender Enden wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert; im Falle glatter Enden erfolgte eine 4-stündige Inkubation bei RT. Bis zur Transformation (Kapitel 2.2.11) wurde der Reaktionsansatz bei -20°C gelagert.

2.2.15 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten (Saiki *et al.*, 1988).

Im allgemeinen wurde in eine PCR-Reaktion 0,7-1 μ g Cosmid-DNA als Matrize eingesetzt. Da die Zusammensetzung des Reaktionspuffers einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer PCR hat, wurde der *MasterAmp*TM PCR Optimization Kit verwendet. Dieser enthält 12 Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen von Magnesiumchlorid sowie von *MasterAmp* PCR-Enhancer und bietet die Möglichkeit, die für die jeweilige PCR optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. In einem 50 μ l Reaktionsansatz wurden 25 μ l 2 x PreMix (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 100 mM KCl; je 400 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 3-7 mM Magnesiumchlorid; 0-8 x PCR-Enhancer), 0,7 μ g Matrizen-DNA, Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,2 μ M sowie 2,5 U *Taq*-Polymerase eingesetzt. Kontrollansätze enthielten entweder keine Matrizen-DNA oder nur einen der beiden Oligonukleotid-Starter, um Kontaminationen durch Fremd-DNA bzw. unspezifische Amplifikationsprodukte nachzuweisen.

Für die Amplifikation besonders langer DNA-Fragmente wurde der *MasterAmp*TM Extra-Long PCR Kit verwendet. Neben 9 verschiedenen PCR-Puffern enthält dieser Kit einen Polymerase-Mix aus *Taq*-Polymerase und einem weiteren Enzym mit 3' \rightarrow 5'- Korrekturleseaktivität, wodurch der fehlerhafte Einbau von Nukleotiden stark vermindert wird. In einem Reaktionsvolumen von 50 μ l wurden 25 μ l 2 x PreMix (Extra-Long PCR 2 x Buffer, je 400 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 3-7 mM Magnesiumchlorid, 0-6 x PCR-Enhancer), 0,7-1 μ g Matrizen-DNA, Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,2 μ M sowie 2,5 U *MasterAmp*TM Extra-Long DNA Polymerase-Mix eingesetzt.

Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler (Biometra) zunächst für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die speziellen Amplifikationsbedingungen sind im folgenden aufgeführt; die verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.9 beschrieben.

Amplifikation von *L. donovani*-ORF2 bzw. *L. donovani*-ORF7 (*MasterAmp*TM PCR Optimization Kit):

Oligonukleotide: #10654, #10655 (ORF2) bzw. # 10656, #10657 (ORF7)

Matrizen-DNA: pcosVL-1

Denaturierung: 0,5 min, 95°C

Anlagerung der Primer: 0,5 min, 54°C

Elongation: 1,5 min, 72°C

Amplifikation von *L. donovani*-ORF3 für Klonierung in pIRSAT-3 (*MasterAmp*TM Extra-Long PCR Kit):

Oligonukleotide: #CL023, #CL024

Matrizen-DNA: pcosVL-1

Denaturierung: 0,5 min, 95°C

Anlagerung der Primer: 0,5 min, 64°C

Elongation: 6 min, 72°C

Amplifikation von *L. donovani*-ORF3 für Klonierung in pJC45 (*MasterAmp*TM Extra-Long PCR Kit):

Oligonukleotide: #CL031, #CL033

Matrizen-DNA: pcosVL-1

Denaturierung: 0,5 min, 95°C

Anlagerung der Primer: 0,5 min, 56°C

Elongation: 6 min, 72°C

Die Amplifikation erfolgte jeweils in 30 Zyklen. Um eine vollständige Synthese der DNA-Fragmente zu gewährleisten, wurde der letzte Elongationsschritt für 4 min bei 72°C durchgeführt; bei langen DNA-Fragmenten betrug die finale Elongationszeit 10 min. Das PCR-Produkt wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt (Kapitel 2.2.16.1).

2.2.15.1 Multiplex-PCR

Bei dieser Methode können unter Verwendung eines Starter-Oligonukleotid-Gemisches verschiedene DNA-Fragmente in einem PCR-Reaktionsansatz amplifiziert werden. Die Multiplex-PCR wurde zur Identifizierung stabil transfizierter *L. major* nach einer Mauspassage eingesetzt. Dazu wurde ein Oligonukleotid-Gemisch, bestehend aus verschiedenen spezifischen 5'-Primern und einem einheitlichen 3'-Primer, benutzt. Ein 50 μ l-Reaktionsansatz enthielt 1-2 μ l genomische DNA rekombinanter *L. major* (Kapitel 2.2.9.2) in 1 x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 1,5 mM Magnesiumchlorid; 0,1% Triton[®]X-100), jeweils 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die entsprechenden Oligonukleotide (Kap. 2.1.9) in einer Endkonzentration von 0,4-0,5 μ M sowie 2,5 U *Taq*-Polymerase (Promega). Nach 2-minütiger initialer Denaturierung bei 95°C im Thermocycler (Biometra) wurden folgende Amplifikationsbedingungen gewählt:

Denaturierung: 0,5 min, 95°C

Anlagerung der Primer: 0,5 min, 64°C

Elongation: 1,5 min, 72°C

Die Amplifikation wurde in 30 Zyklen und einem zusätzlichen finalen Elongationsschritt von 4 min bei 72°C durchgeführt. Je 3-4 μ l eines PCR-Ansatzes wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.16); anhand der Größe der entstandenen DNA-Fragmente konnte die Identifizierung der rekombinanten *L. major* erfolgen.

2.2.15.2 Real time-PCR

Die Bestimmung der Parasitenlast in Milz und Lymphknoten von mit *Leishmania* infizierten BALB/c-Mäusen erfolgte durch *real time*-PCR. Bei dieser Methode kann der Verlauf einer PCR direkt verfolgt werden; außerdem kann anhand der Reaktionskinetik eine Quantifizierung der zu amplifizierenden DNA erfolgen. Zu diesem Zweck wird die exponentielle Phase der Amplifikation untersucht; diese wird um so schneller erreicht, je höher die Ausgangskonzentration der Matrizen-DNA ist. Der sogenannte C_T -Wert (C_T = *threshold cycle*) ergibt sich aus der Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal einen definierten Hintergrundwert übersteigt. Da zwischen dem Logarithmus der DNA-Ausgangskonzentration und dem C_T -Wert eine lineare Abhängigkeit besteht, kann aus einem Vergleich der Werte mit einer C_T -Standardkurve die Konzentration der zu amplifizierenden DNA ermittelt werden.

Aus dem Gewebe der infizierten Mäuse wurde die DNA, wie in Kapitel 2.2.9.2 beschrieben, isoliert. Die Bestimmung des relativen Gehaltes an *Leishmania*- bzw. Maus-DNA erfolgte durch zwei verschiedene PCR-Reaktionen; aus dem Verhältnis beider Werte konnte die relative Parasitenlast pro Organ ermittelt werden. Die *real time*-PCR wurde von Frau U. Klauenberg und Herrn Dr. S. Graefe aus der Abteilung Medizinische Zentraldiagnostik am BNI durchgeführt und ausgewertet.

Zur Bestimmung der relativen Menge an *Leishmania*-DNA wurde eine *real time*-PCR nach dem FRET-System (FRET = *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) durchgeführt. Bei diesem System werden neben den zwei Oligonukleotiden zur Amplifikation eines spezifischen Fragments zwei so genannte *real time*-Proben eingesetzt. Diese *real time*-Proben müssen in unmittelbarer Nähe zueinander an die DNA-Zielsequenz hybridisieren; außerdem trägt die erste Probe an ihrem 3'-Ende einen Donor-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein), während bei der zweiten Probe ein Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff (LC Red 640) am 5'-Ende lokalisiert ist. Während des *annealing* erfolgt ein Energietransfer des angeregten Donor-Farbstoffes zum benachbarten Akzeptor-Farbstoff, der daraufhin ein messbares Fluoreszenzsignal aussendet. Hierdurch wird das amplifizierte DNA-Fragment quantitativ gemessen. Während der Elongation werden die *real time*-Proben von der Matrize verdrängt oder durch die 5' → 3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase degradiert. Die Durchführung der PCR erfolgte wie bei Schulz *et al.* (2003) beschrieben; dabei wurde ein *Leishmania*-spezifisches 483 bp-Fragment aus dem ribosomalen Genlocus amplifiziert.

Die Quantifizierung des Maus-DNA-Gehaltes erfolgte über eine *real time*-PCR nach dem TaqMan-System. Dabei wird neben den 5'- und 3'-Oligonukleotiden eine doppeltmarkierte *real time*-Probe eingesetzt, die an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (FAM: 6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende bzw. intern ein so genanntes *quencher*-Molekül (TAMRA: 6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin) aufweist. Während der Bindung der spezifischen Oligonukleotide und der *real time*-Probe an die Matrizen-DNA wird das vom Fluorophor emittierte Licht vom benachbarten *quencher*-Molekül absorbiert. Sobald jedoch die *Taq*-Polymerase während der Elongation an das 5'-Ende der *real time*-Probe gelangt, wird dieses aufgrund der 5' → 3'-Exonukleaseaktivität des Enzyms abgespalten. Der auf diese Weise von *quencher*-Molekül getrennte Fluorophor kann nach Anregung Licht emittieren, und das Fluoreszenzsignal kann während der weiteren PCR-Zyklen kontinuierlich gemessen werden.

Zur Bestimmung des Maus-DNA-Gehaltes wurde ein spezifisches β -Actin-Fragment von 437 bp unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide amplifiziert:

5'-Oligonukleotid: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

3'-Oligonukleotid: 5'-TGGGTATGGAATCCTGTGGCATCC-3'

real time-Probe: 5'-(FAM)TATGCTC(TAMRA)TCCCTCACGCCATCCTGCGT-3'

Ein 50 μ l-Ansatz enthielt 5 μ l genomische DNA (aus einer 1:10- bzw. 1:100-Verdünnung), 0,2 μ M der spezifischen Oligonukleotide, 0,1 μ M *real time*-Probe, jeweils 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 3 mM Magnesiumchlorid, 10 μ M EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM Kaliumchlorid sowie 1 U AmpliTaqGold (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Amplifikation erfolgte mit einem ABI Prism 7700 SDS-Gerät (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Nach einer initialen Denaturierung (15 min, 95°C) folgten 45 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (20 s, 95°C) sowie Anlagerung der Primer und Elongation (40 s, 58°C).

2.2.16 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates sind Nukleinsäuren negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode; dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearisierter DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Über die Agarosekonzentration kann der Trennbereich eines Gels beeinflusst werden. Bei hohen

Konzentrationen wird die Porengröße im Gel und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA verringert; dies ist für die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle von Vorteil.

50-100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) wurden mit der entsprechenden Menge an Agarose (0,3-1,5%) aufgeköcht, nach dem Abkühlen mit 2,5-5 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in den Träger einer horizontalen Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Nach Überschichtung des erkalteten Gels mit TAE-Puffer wurden die mit 20% Ladepuffer (85% Formamid; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1 mg/ml Bromphenolblau; 1 mg/ml Xylenxanol) versetzten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Fragmentlängenbestimmung wurden die in Kapitel 2.1.4 aufgeführten DNA-Längenstandards aufgetragen; die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm. Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnten die DNA-Banden aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

2.2.16.1 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des Easy Pure DNA Purification Kit durchgeführt. Unter Bestrahlung mit UV-Licht wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 3 Vol. SALT-Lösung für 5 min bei 55°C inkubiert, bis die Agarose gelöst war. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 5 μ l + 1 μ l/1 μ g erwarteter DNA-Ausbeute an BIND-Lösung; diese enthält eine Silikatmatrix zur Bindung der DNA. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Suspension zentrifugiert (5 s, 16100 x g, RT); der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml WASH-Lösung resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Sedimentation; nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 10-20 μ l A. dest. resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und nochmals zentrifugiert (1 min, 16100 x g, RT). Die im Überstand enthaltene DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Gelelektrophorese überprüft; die Lagerung des Eluats erfolgte bei -20°C.

2.2.17 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem so genannten Kettenabbruch-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Bei dieser auch enzymatische DNA-Sequenzierung genannten Methode wird mit Hilfe eines Starter-Oligonukleotides und der DNA-Polymerase ein komplementärer Strang der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA synthetisiert. Neben 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz zusätzlich 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Durch den Einbau von ddNTPs kommt es aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem Abbruch der DNA-Synthese, so dass DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an ihrem 3'-Ende markierte ddNTPs tragen. Nach Auftrennung des Fragmentgemisches in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und Erfassung der Fluoreszenzsignale kann mit Hilfe einer computergestützten Auswertung die Abfolge der Nukleotide ermittelt werden.

Die Sequenzierungsreaktion wurde unter Verwendung des ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein 20 μ l-Reaktionsansatz enthielt 1 μ g Plasmid- bzw. 1,5 μ g Cosmid-DNA, 10 pmol eines der in Kapitel 2.1.9 aufgeführten Sequenzier-Oligonukleotide sowie 4 μ l Terminator Ready Reaction Mix (enthielt dNTPs, mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte ddNTPs, AmpliTaq[®]-Polymerase FS, Magnesiumchlorid sowie Tris-HCl, pH 9,0). Die Cycle Sequencing-Reaktion

wurde in einem Thermocycler (Biometra) in 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung: 10 s, 96°C

Anlagerung der Primer: 5 s, 50°C

Elongation: 4 min, 60°C.

Im Anschluss erfolgte die Fällung der DNA unter Zugabe von 80 μ l HPLC-H₂O, 10 μ l 3 M Natriumacetat (pH 4,6) sowie 250 μ l Ethanol. Nach Zentrifugation (15 min, 16100 x g, RT) wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde nach Entfernen des Überstandes für 10 min bei 37°C vollständig getrocknet und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -20°C gelagert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und darauf folgende Analyse der Sequenzierreaktion wurde von Frau H. Buß und Frau S. Ofori unter Verwendung eines Online-DNA-Sequenzierungsgerätes (ABI PRISM™ 377 DNA-Sequencer, Applied Biosystems) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proben mit 4 μ l Ladepuffer (80% deionisiertes Formamid; 50 mM EDTA, pH 8,0) versetzt, für 2 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. In einem denaturierenden, 6%igen Polyacrylamidgel (6% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 1 x TBE, 8,3 M Harnstoff, 0,03% APS, 1/2500 Vol. TEMED) wurden jeweils 1,5 μ l der Ansätze aufgetragen und elektrophoretisch in 1 x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware Sequencing Analysis, Version 3.0, Applied Biosystems.

2.2.18 Herstellung von DNA-Sonden

Die Herstellung von DNA-Sonden wurde nach der von Feinberg & Vogelstein (1983) entwickelten Methode des *random primed DNA-labeling* durchgeführt. Unter Verwendung eines Gemisches verschiedenartiger Hexanukleotide, die an einzelsträngige DNA binden und somit als Startpunkte für die Klenow-Polymerase dienen können, erfolgte der Einbau von markierten dNTPs bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges. Dabei wurden sowohl nicht-radioaktive, Digoxigenin-markierte Sonden als auch solche mit radioaktiver Markierung hergestellt.

2.2.18.1 Digoxigenin-markierte DNA-Sonden

Digoxigenin wird aus dem Fingerhut (*Digitalis purpurea* bzw. *Digitalis lanata*) gewonnen. Der Einbau von Digoxigenin-markiertem dUTP kann mit Hilfe eines gegen Digoxigenin-gerichteten Antikörpers, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, enzymatisch nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.20.2). Da Digoxigenin als Naturstoff ausschließlich in *Digitalis*-Pflanzen vorkommt, zeichnet sich das Nachweissystem durch eine hohe Spezifität und einen geringen Hintergrund aus.

1 μ g DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 15 μ l für 10 min bei 100°C zur Herstellung von Einzelsträngen denaturiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 μ l 10 x Hexanukleotidmix in 10 x Reaktionspuffer (Boehringer), 2 μ l DIG-dNTPs (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,66 mM dTTP, 0,33 mM dUTP) sowie 2 U Klenow-Polymerase. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute DIG-dNTPs wurden durch Gelfiltration unter Verwendung von Nuc Trap[®] push columns nach Herstellerangaben entfernt; die Lagerung der aufgereinigten Sonde erfolgte bei -20°C.

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde eine *Dot-Blot*-Analyse der Sonden im Vergleich mit einer DIG-markierten Kontroll-DNA bekannter Konzentration (DIG DNA

Labeling and Detection Kit, Boehringer) durchgeführt. Nach Herstellung serieller Verdünnungsreihen von Sonden- bzw. Kontroll-DNA wurde je 1 μ l der Proben auf eine Nylonmembran aufgetragen und durch *crosslinking* kovalent fixiert. Der Nachweis erfolgte wie in Kapitel 2.2.20.2 beschrieben.

2.2.18.2 Radioaktiv markierte DNA-Sonden

1 μ g DNA wurde für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem 20 μ l-Reaktionsansatz wurde die denaturierte DNA mit 2 μ l 10 x Hexanukleotidmix in 10 x Reaktionspuffer, 2 μ l einer Mischung von dATP, dGTP und dTTP (Endkonzentration jeweils 0,1 mM), 50 μ Ci [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol) und 2,5 U Klenow-Polymerase für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von unmarkiertem dCTP (0,1 mM) erfolgte eine weitere einstündige Inkubation bei 37°C. Die nicht-inkorporierten Nukleotide wurden durch Gelfiltration unter Verwendung von Nuc Trap[®] push columns nach Herstellerangaben entfernt.

2.2.19 Transfer von DNA auf eine Membran

2.2.19.1 Southern-Blot

Das Verfahren zum Transfer von DNA auf eine Membran wurde von Southern (1975) entwickelt; die Durchführung erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Sambrook *et al.* (1989).

DNA wurde nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.2.14.1) in einem Agarosegel bei einer Spannung von ca. 2 V/cm über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (100 μ g/ml) gefärbt und kurz in A. dest. entfärbt; die Banden wurden durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Um die Transfereffizienz großer DNA-Fragmente zu erhöhen, wurde das Gel für 15-20 min in 0,2 N HCl-Lösung geschwenkt, was zu einer partiellen Depurinierung der DNA führt. Nach dem Waschen mit A. dest. führte die anschließende einstündige Behandlung mit Blotlösung (0,2 M Natriumhydroxid, 1,5 M Natriumchlorid) zur Denaturierung der DNA. Für den Blotaufbau wurde ein als Salzbrücke dienendes 3 MM Whatman-Papier auf den Träger der Blotkammer gelegt; dabei bestand nach beiden Seiten eine Verbindung zur Blotlösung (0,2 M Natriumhydroxid, 1,5 M Natriumchlorid). Auf dieses Papier wurde das denaturierte Gel mit der Oberseite zuunterst gelegt; es folgte eine in A. dest. und Blotlösung äquilibrierte Nylonmembran, 4 in Blotlösung getränkte Schichten 3 MM Whatman-Papier sowie ein Stapel trockenes Zellstoffpapier. Durch Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit von unten nach oben in das trockene Filterpapier gesaugt; dadurch erfolgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran. Nach mindestens 4 h wurde der Blot gestoppt und die DNA durch *crosslinking* mit Hilfe von UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden. Diese konnte direkt in eine Hybridisierung (Kapitel 2.2.20.1) eingesetzt werden bzw. getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert werden.

2.2.19.2 Kolonie-Transfer

Die von Grunstein & Hogness (1975) entwickelte Methode der Kolonie-Hybridisierung ist ein schnelles und effektives Verfahren, das sich besonders zum Durchmustern von genomischen DNA-Bibliotheken eignet. Dabei werden Bakterienkolonien direkt von der Agarplatte auf einen Filter transferiert, auf dem die Isolierung und Fixierung der DNA erfolgt.

Von den *Leishmania*-Cosmid-DNA-Genbanken in *E. coli* wurden ca. 1000 cfu/Platte (15 g/l Agar, 40 g/l CG, 100 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Bakterienkolonien auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Zu diesem Zweck wurde der Filter luftblasenfrei auf die Platte gebracht; zur späteren Orientierung wurden Filter und Platte seitlich markiert. Nach 1 min wurde der Filter abgehoben und getrocknet. Durch 15 min Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M Natriumhydroxid, 1,5 M Natriumchlorid, 0,1% SDS) wurden die Bakterienzellen aufgebrochen und die DNA denaturiert. Es folgten weitere Behandlungsschritte: für 5 min mit A. dest, für 5 min mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M Natriumchlorid) sowie für 15 min mit 2 x SSC (20 x SSC-Stammlösung: 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat). Dabei wurde der Filter jeweils auf Whatmanpapier, das mit den entsprechenden Lösungen getränkt wurde, inkubiert. Die Fixierung der DNA erfolgte durch 30-minütiges Backen im Vakuum bei 80°C. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden die Filter in Rollglasflaschen für 1-2 h mit 3 x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die anschließende Hybridisierung und der Nachweis positiver Signale erfolgte wie in Kapitel 2.2.20 beschrieben. Zur Kontrolle wurden die vermeintlich positiven Kolonien gepickt, ausgestrichen und einer nochmaligen Hybridisierung unterzogen.

2.2.20 Hybridisierung von Membranen und Nachweis definierter DNA-Sequenzen

2.2.20.1 Hybridisierung

Nylonmembranen bzw. Nitrocellulosefilter wurden in Rollglasflaschen überführt und für mindestens 1 h in einem Hybridisierungssofen bei 65°C mit Hybridisierungslösung HYB-9 (Biozym) prähybridisiert. Die DIG- bzw. radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde für 10-15 min im kochenden Wasserbad denaturiert und zusammen mit 4-6 ml HYB-9-Hybridisierungslösung in die Rollglasflasche gegeben; die Hybridisierung der Membranen erfolgte über Nacht bei 65°C. Im Anschluss wurde die mehrfach verwendbare Sonde abgegossen und bei -20°C gelagert. Die Entfernung überschüssigen Sondenmaterials und die Aufhebung unspezifischer Basenpaarungen zwischen Sonde und fixierter DNA erfolgte über mehrere Waschschrte mit jeweils steigender Stringenz:

2 x 5 min mit 2 x SSC / 0,5% SDS bei RT

1 x 20 min mit 2 x SSC / 0,5% SDS bei 65°C

1 x 20 min mit 1 x SSC / 0,5% SDS bei 65°C

1 x 30 min mit 0,5 x SSC / 0,5% SDS bei 65°C

1 x 30 min mit 0,2 x SSC / 0,5% SDS bei 65°C.

Der anschließende Nachweis der markierten DNA erfolgte immunologisch (Kapitel 2.2.20.2) bzw. durch Autoradiographie (Kapitel 2.2.20.3).

2.2.20.2 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierter DNA

Digoxigenin-markierte DNA wurde unter Verwendung eines mit Alkalischer Phosphatase konjugierten anti-DIG-Antikörpers kolorimetrisch nachgewiesen. Als Substrat der Reaktion diente BCIP zusammen mit dem Farbverstärker NBT.

Die Membranen bzw. Membranfilter wurden zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h in Blockierungslösung (1 x PBS, 0,2% I-Block-Reagenz, 0,02% Natriumazid, 0,02% Tween 20) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die darauf folgende Behandlung mit anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Fab-Fragmenten (1:5000 in Blockierungslösung verdünnt) erfolgte während einer einstündigen Inkubation auf dem

Schüttler. Nicht-gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges, 15-minütiges Waschen mit 1 x TBS (150 mM Natriumchlorid; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) entfernt; anschließend wurde die Membran für 15 min in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid) äquilibriert. Der Farbnachweis erfolgte im Dunkeln in 10 ml AP-Puffer mit 3,3 mg NBT (in 70% Dimethylformamid) und 1,875 mg BCIP (in Dimethylformamid). Nach Entwicklung der Banden wurde die Farbreaktion durch Zugabe von TAE-Puffer gestoppt und die Membranen bzw. Filter getrocknet.

2.2.20.3 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist eine Nachweismethode radioaktiv markierter Nukleinsäuren oder Proteine; sie beruht auf der Schwärzung eines Röntgenfilms durch die energiereiche Strahlung radioaktiver Proben.

Die Membranen wurden nach Hybridisierung und Waschen (Kapitel 2.2.20.1) in durchsichtige Folie eingeschweißt und in einer lichtundurchlässigen Filmkassette fixiert. Auf die Membran wurde ein Röntgenfilm gelegt (Kodak Biomax MR) und dieser in der geschlossenen Kassette für 12-24 h exponiert; zur Erhöhung der Empfindlichkeit konnte die Kassette bei -70°C gelagert werden. Der Film wurde nachfolgend in einem automatischen Filmentwickler (Kodak) entwickelt.

2.2.21 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* zur Antigen-Gewinnung

Die offenen Leserahmen zweier Gene aus *L. donovani*, ORF2 bzw. ORF3, wurden einzeln in das bakterielle Expressionsplasmid pJC45 (Kapitel 2.1.8) subkloniert. Auf diesem Plasmid steht die Transkription unter der Kontrolle eines von einem *lac*-Operon kontrollierten T7-Promotors (*lacT7*-Promotor). Mit den pJC45-Konstrukten erfolgte die Transformation von *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q]. In diesem Bakterienstamm ist das Gen der T7-Phagen-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors im Chromosom integriert. Im uninduzierten Zustand ist die Aktivität des *lacUV5*-Promotors aufgrund der Bindung des *lac*-Repressors, der von den Bakterien konstitutiv exprimiert wird, weitgehend unterdrückt. Für eine vollständige Repression des *lacUV5*-Promotors im uninduzierten Zustand enthalten die Bakterien zusätzlich mehrere Kopien eines Plasmids (pAPlacI^Q), das neben einem Kanamycin-Resistenzgen das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) enthält. Durch die Überexpression des *lac*-Repressors wird eine bereits im uninduzierten Zustand geringfügig vorhandene Expression der T7-RNA-Polymerase und der durch den *lacT7*-Promotor kontrollierten Gene unterbunden.

Nach Zugabe von IPTG, einem synthetischen, nicht-metabolisierbaren Lactose-Derivat, erfolgt die Bindung von IPTG an den *lac*-Repressor. Dieser erfährt daraufhin eine Konformationsänderung, aufgrund derer er nicht mehr an das *lac*-Operon binden kann. Die Aktivität des *lacUV5*-Promotors führt zur Produktion von T7-RNA-Polymerase, die eine Transkription der rekombinanten, vom T7-Promotor kontrollierten Gene bewirkt. Da sich die T7-RNA-Polymerase durch eine hohe Effizienz und eine stärkere Aktivität als die bakterielle RNA-Polymerase auszeichnet, können mit diesem System hohe Expressionsraten der rekombinanten Proteine erzielt werden.

2.2.21.1 Herstellung kompetenter *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q]

Durch Behandlung von *E. coli*-Zellen mit Calciumchlorid wird die Aufnahme von Plasmid-DNA während einer Transformation gefördert (Cohen *et al.*, 1972).

200 ml CG-Medium mit 10 μ g/ml Kanamycin wurden mit *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] inokuliert und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 3000 x g, 4°C). Das Zellsediment wurde nachfolgend bei 4°C im Kühlraum auf Eis in 20 ml einer 50 mM Calciumchloridlösung resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (15 min, 1690 x g, 4°C); nach Resuspension des Sediments in 2 ml 50 mM Calciumchlorid mit 50% Glycerin und 7% DMSO wurden jeweils 200 μ l-Aliquots in einer Mischung aus Methanol/Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

2.2.21.2 Induktion der Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q]

Die Transformation kompetenter *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] mit pJC45-Konstrukten erfolgte wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben. Für eine Proteinexpression im präparativen Maßstab wurden 400 ml CG-Medium (100 μ g/ml Ampicillin und 10 μ g/ml Kanamycin) mit einer Kolonie frisch transformierter *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] beimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,1 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert; für Test-Expressionen wurde ein 10 ml-Ansatz verwendet. Es erfolgte die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM und eine 1,5-stündige Inkubation unter Schütteln bei 37°C. Zur Kontrolle wurde vor und nach Induktion 2 ml Bakteriensuspension zur Herstellung von Proteinproben entnommen; die Aufarbeitung der Proben sowie die anschließende SDS-PAGE erfolgte wie in Kapitel 2.2.23 beschrieben. Die Zellen wurden sedimentiert (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA10, 10 min, 5000 upm, 4°C) und zweimal mit je 30 ml PBS gewaschen. Nachfolgend wurde das Zellsediment in 23 ml Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 5 mM Imidazol; 500 mM Natriumchlorid) aufgenommen; die Extraktion und Aufreinigung der Proteine erfolgte durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.2.21.3) bzw. durch fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid (Kapitel 2.2.21.4).

2.2.21.3 Aufreinigung der Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die in Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 5 mM Imidazol; 500 mM Natriumchlorid) aufgenommenen Bakterienzellen wurden durch Behandlung mit Ultraschall (7 x 20 s, 45% "output") aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C) wurden die unlöslichen *inclusion bodies* von den löslichen Proteinen im Überstand abgetrennt. In Proteinproben des Überstandes nach Ultraschallbehandlung konnte kein rekombinant exprimiertes Protein nachgewiesen werden, d.h. die Proteine lagen in Form von Einschlusskörpern vor, die unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert werden mussten. Zu diesem Zweck wurde das Sediment in 10 ml Homogenisierungspuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C) abgetrennt, und die sich im Überstand befindenden rekombinant exprimierten Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Bei dieser Methode binden die rekombinant exprimierten Proteine über ihren N-terminalen Histidin-*tag* an eine mit Nickelionen beladene Säulenmatrix. Nach dem Entfernen ungebundener Proteine erfolgt die Elution durch Zugabe von Imidazol, welches das Histidin-enthaltende Protein kompetitiv von der Affinitäts-Matrix verdrängt.

Die Vorbereitung der Säule erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml Säulenmaterial (His Bind Resin, 50% "slurry"), das nach dem Absetzen zunächst mit A. dest. gespült und darauf folgend mit 50 mM Nickelsulfat beladen wurde. Nach dem Äquilibrieren mit

denaturierendem Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 5 mM Imidazol; 500 mM Natriumchlorid; 8 M Harnstoff) wurde das rekombinant exprimierte Protein auf die Säule gegeben. Es folgten drei Waschschrte mit je 10 ml denaturierendem Homogenisierungspuffer mit steigenden Imidazolkonzentrationen (5 mM, 20 mM sowie 60 mM); im Anschluss wurden die Zielproteine mit 4 ml denaturierendem Homogenisierungspuffer (250 mM Imidazol) in 4 x 1 ml-Aliquots eluiert. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.23) und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (Kapitel 2.2.24) analysiert. Zur Immunisierung wurde die Fraktion mit dem größten Anteil an reinem, rekombinanten Protein verwendet.

2.2.21.4 Fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid

Die fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid wurde nach mehrmals fehlgeschlagener Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des rekombinant exprimierten *L. donovani*-ORF3-Genproduktes angewendet. Dabei kommt es durch die Behandlung mit steigenden GuaHCl-Konzentrationen zum Aufschluss der *inclusion bodies*.

Das in 23 ml Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 5 mM Imidazol; 500 mM Natriumchlorid) resuspendierte Bakteriensediment (Kapitel 2.2.21.2) wurde mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes wurden die im Sediment enthaltenen *inclusion bodies* in 2 ml 1 x PBS/1 M GuaHCl resuspendiert und auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation (20 min, 16100 x g, 0°C). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde das Sediment weiteren Behandlungen mit je 1 ml 1 x PBS/3M GuaHCl bzw. mit 1 x PBS/6M GuaHCl unterworfen; die Inkubation erfolgte jeweils für 15 min auf Eis mit nachfolgender Zentrifugation (20 min, 16100 x g, 0°C). Die verschiedenen GuaHCl-Fractionen wurden abschließend einer Dialyse gegen PBS unterzogen, um das bei einer SDS-PAGE störende GuaHCl zu entfernen. Nach Entnahme von jeweils 50 μ l zur Herstellung von Proteinproben und der darauf folgenden Analyse durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.23) wurden die rekombinant exprimierten Proteine bis zur weiteren Verwendung als Antigen zur Immunisierung von Hühnern bei -70°C gelagert.

2.2.22 Immunisierung von Hühnern und Antikörpergewinnung (IgY)

Zur Immunisierung legerer Hühner wurden 200-300 μ l (ca. 200-400 μ g) gereinigtes, rekombinant exprimiertes Protein verwendet. Nach Mischung mit komplettem Freundschem Adjuvanz im Verhältnis 1:1 wurde die Emulsion subkutan in den Halsbereich der Hühner injiziert. Zuvor wurde aus den Eiern - wie im folgenden Absatz beschrieben - Präimmenserum hergestellt und im Immun-Blot (Kapitel 2.2.26) gegen *Leishmania*-Proteine getestet; fand eine Reaktion von Präimmenserum mit *Leishmania*-Proteinen statt, konnte das Huhn nicht zur Immunisierung eingesetzt werden. 4 Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte ein *boost*; dabei wurde die gleiche Menge an Antigen im Verhältnis 1:1 mit inkomplettem Freundschem Adjuvanz gemischt und injiziert. 2-3 Wochen nach dieser zweiten Immunisierung wurden aus den Eiern erstmalig Antikörper isoliert und getestet. Im Fall von LdORF3 wurde 4 Wochen nach der zweiten Immunisierung ein zusätzlicher *boost* durchgeführt.

Die Gewinnung von Antikörpern aus dem Eigelb (IgY) erfolgte durch fraktionierende Polyethylenglykol-Fällung (Polson *et al.*, 1980; Polson *et al.*, 1985). Zu diesem Zweck wurde

das Eigelb vom Eiweiß getrennt, mit A. dest. gespült und nach Entfernen der Dotterhaut mit 1 Volumen Kaliumphosphat-Puffer (10 mM Kaliumphosphat, pH 7,2; 100 mM NaCl) gemischt. Durch Zugabe von 1 Volumen Kaliumphosphat-Puffer mit 7% Polyethylenglykol (PEG) 6000 und 30-minütiger Inkubation auf dem Rollenmischer bei 4°C wurden kontaminierende Lipidverbindungen bei einer Endkonzentration von 3,5% PEG ausgefällt und im Anschluss abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 10 min, 10000 upm, 4°C). Nach Filtrieren des Überstandes wurden die Antikörper durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 12%) unter ständigem Mischen ausgefällt und sedimentiert (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 10 min, 10000 upm, 4°C). Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in einem Volumen von 10 ml Kaliumphosphat-Puffer pro Eidotter unter Rühren resuspendiert. Durch Zugabe von 1 Volumen Kaliumphosphat-Puffer mit 24% PEG 6000 wurden die Antikörper nochmals bei einer Endkonzentration von 12% PEG gefällt und abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C). Der Niederschlag wurde in Kaliumphosphat-Puffer (5 ml pro Ei) resuspendiert. In einem abschließenden Zentrifugationsschritt (Beckman-Zentrifuge/Rotor JA12, 30 min, 10000 upm, 4°C) erfolgte die Abrennung ungelösten Materials; die klare Antikörperlösung wurde in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 0,02% Natriumazid in 1 ml-Aliquots bei -70°C gelagert. Die Qualität der Antikörper wurde nach einer SDS-PAGE (Kap. 2.2.23) im Immun-Blot (Kap. 2.2.26) überprüft.

2.2.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. In Gegenwart eines Überschusses von negativ geladenem SDS, das sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine anlagert, werden deren individuelle Ladungen unterdrückt; dadurch wandern alle Proteine zur Anode. Gleichzeitig bewirkt SDS eine vollständige Denaturierung der Proteine, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hauptsächlich von ihrer molekularen Masse abhängt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970).

Zur Herstellung von Proteinproben wurden *Leishmania*-Zellen sedimentiert (10 min, 1174 x g, 4°C), zweimal mit PBS gewaschen, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ μ l in 1 x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 50 mM DTT; 2% SDS; 0,01% Bromphenolblau; 10% Glycerin) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Im Falle von *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] wurden 1-2 ml Bakteriensuspension sedimentiert (2 min, 16100 x g, 4°C) und nach zweimaligem Waschen mit PBS in 50-100 μ l 1 x SDS-Probenpuffer - wie bereits beschrieben - denaturiert. Rekombinantes *E. coli*-Protein aus den verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung wurde im Verhältnis 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM DTT; 4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 20% Glycerin) gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Die aus 2 Glasplatten und einem Abstandhalter bestehende Gelapparatur wurde vor dem Zusammensetzen gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 6-7,5%ige Trenngels (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 6-7,5% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1); 0,1% APS; 0,08%(v/v) TEMED) in die Gelkassette gegossen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde dieses mit einem 5%igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 5% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1); 0,1% APS; 0,1%(v/v) TEMED) überschichtet und ein Kamm mit der erforderlichen Anzahl von Taschen eingesetzt. Die Gelkassette wurde nach

Polymerisation des Sammelgels in eine Vertikal-Apparatur (Novex) eingebaut. Die Pufferkammern wurden mit SDS-Elektrodenpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 250 mM Glycin; 0,1% SDS) gefüllt, und es erfolgte die Auftragung von 5-20 μ l Probe sowie eines unter 2.1.4 aufgeführten Größenstandards. Die Elektrophorese wurde bei 15 V/cm durchgeführt; im Anschluss wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau (Kapitel 2.2.24) gefärbt bzw. nach Transfer auf eine Membran (Kapitel 2.2.25) immunologisch nachgewiesen (Kapitel 2.2.26).

2.2.24 Anfärbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blau

Die Färbung und Fixierung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte über Nacht durch Schwenken in Coomassie-Färbelösung (1 g/l Coomassie-Brilliant-Blau R 250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure). Im Anschluss wurde das Gel durch Behandlung mit Entfärbelösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure) entfärbt; dabei wurde die Lösung mehrmals erneuert, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Nach abschließendem Schwenken in A. dest. mit Glycerin wurde das Gel in einen Rahmen zwischen zwei Zellophan-Folien gespannt und getrocknet.

2.2.25 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Beim Western-Blot werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen, auf der sie im folgenden qualitativ und quantitativ mit Hilfe geeigneter Antikörper nachgewiesen werden können. Der Transfer wurde nach der *Semi-Dry Blotting*-Methode durchgeführt.

Auf die Kathode der *Blot*-Apparatur wurden 4 Lagen 3 MM Whatman-Papier, die zuvor in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol) getränkt wurden, gelegt. Auf diese Unterlage wurde das Gel mit der Vorderseite nach unten platziert; es folgte eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, die vorher mit Methanol angefeuchtet, mit A. dest. gespült und ebenfalls in Transfer-Puffer äquilibriert wurde. Als oberste Schicht dienten 4 Lagen in Transferpuffer getränktes 3 MM Whatman-Papier; der gesamte *Blot*-Aufbau sollte luftblasenfrei sein. Nach dem Auflegen der Anode, die mit einem Gewicht beschwert wurde, erfolgte der Protein-Transfer für 1-1,5 h bei 1 mA/cm². Nachfolgend wurde die Bahn, die den Proteinmarker enthielt, abgeschnitten, für 1 min in Coomassie-Färbelösung (Kapitel 2.2.24) geschwenkt, kurz entfärbt und getrocknet. Die Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde direkt einem immunologischen Nachweis unterzogen (Kapitel 2.2.26) oder zunächst getrocknet und bis zur weiteren Verwendung zwischen Whatman-Papier aufbewahrt.

2.2.26 Immunologischer Nachweis von auf einer Membran immobilisierten Proteinen (Immun-Blot)

Unter dem Begriff des Immun-Blots versteht man immunologische Techniken, bei denen auf Membranen transferierte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden.

Die auf einer PVDF-Membran fixierten Proteine wurden für 1 h mit Blockierungslösung (1 x TBS, 5% Milchpulver, 0,1% Tween 20, 0,02% Natriumazid) behandelt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nachfolgend wurde die Membran für 1 h mit dem in Blockierungslösung verdünnten Primär-Antikörper (Präimmunserum bzw. anti-LdORF2 oder anti-LdORF3, jeweils 1:500) behandelt. Durch dreimaliges, 5-minütiges Schwenken in Waschlösung (1 x TBS, 0,05% Tween 20) wurde nicht gebundener Antikörper entfernt; im

Anschluss erfolgte eine weitere einstündige Inkubation unter Schwenken mit dem in Blockierungslösung verdünnten zweiten Antikörper (anti-Huhn-IgY-AP-Konjugat, 1:2500). Die Membran wurde erneut 3 x für jeweils 5 min in Waschlösung geschwenkt und für 15 min in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid) äquilibriert. Der enzymatische Nachweis erfolgte im Dunkeln in 10 ml AP-Puffer mit 3,3 mg NBT (in 70% Dimethylformamid) und 1,875 mg BCIP (in Dimethylformamid). Nach Entwicklung der Banden wurde die Farbreaktion durch Zugabe von TAE-Puffer gestoppt und die Membran getrocknet.

2.2.27 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Zytokinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ , IL-4 und IL-12 im Blut bzw. von IFN- γ und IL-2 an stimulierten Milzzellen von mit *Leishmania* infizierten BALB/c-Mäusen erfolgte durch ELISA. Dabei wurden die spezifischen Antikörper zunächst auf Mikrotiterplatten fixiert; im Anschluss erfolgte die Bindung von gelöstem Antigen und der Nachweis mit Hilfe eines Antigendetektionssystems. Diese so genannte Sandwich-Anordnung ermöglicht den Nachweis von sehr geringen Antigenkonzentrationen, da es durch den Einsatz eines fixierten Antikörpers zur Aufkonzentrierung des Antigens kommt. Die Experimente wurden von Frau S. Ehrlich im Labor von Herrn PD Dr. Arne von Bonin am BNI durchgeführt.

Für die Stimulation reisolierter Milzzellen wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen (1000 ng/ml, 333 ng/ml, 111 ng/ml bzw. 0 ng/ml) eines in PBS verdünnten anti-CD3-Antikörpers (145-2C11) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Nunc) pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die aus infizierten BALB/c-Mäusen reisolierten Milzzellen in einer Konzentration von jeweils 1×10^5 Zellen/200 μ l dazugegeben und für 24 h inkubiert. Der Überstand wurde nachfolgend abgenommen und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C aufbewahrt.

Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Nunc) wurden mit je 50 μ l/Vertiefung eines in *coating*-Puffer verdünnten Antikörpers befüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei den Antikörpern handelte es sich um anti-Maus-IFN- γ (Endkonzentration 2 μ g/ml), anti-Maus-IL-2 (Endkonzentration 1 μ g/ml), anti-Maus-IL-4 (Endkonzentration 1 μ g/ml) bzw. anti-Maus-IL-12 (Endkonzentration 2 μ g/ml) von PharMingen. Nach dreimaligem Waschen (1 x PBS, 0,05% Tween) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von je 100 μ l Blockierungslösung (1 x PBS, 1% BSA) und 2-stündiger Inkubation bei RT abgesättigt. Nach Entfernen der Blockierungslösung erfolgte die Zugabe von 50 μ l (Blutserum) bzw. 120 μ l (Zellüberstand) bzw. den jeweiligen Standards mit nachfolgender Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Platten wurden mehrmals gewaschen (1 x PBS, 0,05% Tween) und im Anschluss mit jeweils 50 μ l eines biotinylierten Zweitantikörpers (anti-Maus-IFN- γ , Endkonz. 0,5 μ g/ml; anti-Maus-IL-2, Endkonz. 1 μ g/ml; anti-Maus-IL-4, Endkonz. 0,5-1 μ g/ml bzw. anti-Maus-IL-12, Endkonz. 0,5 μ g/ml) für 1 h inkubiert. Nach Entfernung des Antikörpers und Behandlung mit Waschlösung wurde für 30-60 min mit 50 μ l eines 3. Antikörpers (Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-AK, 1:10000 in PBS mit 0,1% BSA verdünnt) inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach dreimaligem Waschen durch Zugabe von je 100 μ l Tetramethylbenzidin(TMB)-Substratpuffer (12 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 5,5; 1,2 mg TMB; 1,2 μ l H₂O₂); die Farbreaktion wurde mit je 25 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt. Durch anschließende Messung der OD_{450 nm} konnten anhand der Werte parallel bestimmter Zytokin-Standards die Konzentrationen der Proben ermittelt werden

2.2.28 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation des LdSTF1-Genprodukts erfolgte an rekombinanten, promastigoten *L. donovani* [LdSTF1] sowie an Gewebematerial aus dem Milzpunktat eines VL-Patienten, der sich zur Behandlung im BNI befand. Die Einbettung der Proben, die Anfertigung der Ultradünnschnitte sowie die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von M. Krömer durchgeführt.

1×10^7 Leishmanien wurden sedimentiert (10 min, 720 x g, RT), zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h in einer 2%igen, mit PBS gepufferten Paraformaldehydlösung mit 0,025% Glutaraldehyd fixiert; die Fixierung des Gewebematerials erfolgte in gleicher Weise über einen Zeitraum von 2 h. Die Proben wurden in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% Ethanol) für jeweils 30 min entwässert. Im Anschluss erfolgte über Nacht eine Inkubation in 90% Ethanol mit 10% L.R.White; nachfolgend wurde in 4 Schritten die Ethanolkonzentration stufenweise verringert bzw. die L.R.White-Konzentration kontinuierlich erhöht, bis die Zellen zum Schluss in 100% L.R.White vorlagen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 100% L.R.White, das zur Härtung mit L.R.White-Accelerator versetzt wurde, aufgenommen und in Gelatine kapseln überführt. Die Anfertigung von Ultradünnschnitten (80 nm) erfolgte nach Aushärtung der Blöcke unter Verwendung eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut-E). Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Pinzette auf so genannte *grids* gezogen und über Nacht getrocknet.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben für 1 h mit Blockierungslösung (3% BSA und 0,1% Tween 20 in PBS) behandelt; bei diesem und den folgenden Behandlungsschritten wurden die *grids* jeweils auf einen Tropfen der entsprechenden Lösung gelegt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen LdSTF1-Antikörper bzw. mit Präimmenserum (1:500 in Blockierungslösung) über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden dreimal gewaschen und im Anschluss für 1 h mit einem aus Kaninchen gewonnenen anti-Huhn-IgY (1:1500 in Blockierungslösung) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen folgte eine einstündige Behandlung mit Protein A-Goldpartikeln (10 nm, 1:65 in Blockierungslösung). Im Anschluss wurden die Schnitte jeweils dreimal mit PBS/0,1% Tween 20 bzw. A. dest gewaschen und zur Kontrastierung für 5 min mit einer gesättigten Uranylacetatlösung (in A. dest) behandelt; nach 3 weiteren Waschschrinen und mindestens einstündiger Trocknung konnten die Präparate mit einem Philips TEM 301-Gerät mikroskopisch untersucht werden.

2.2.29 Elektronische Bildbearbeitung

Proteingele, Immun-Blots, Autoradiogramme und Photographien von Agarosegelen wurden mit einem Flachbettscanner (Agfa Snapscan 600) digitalisiert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop 5.0 bearbeitet. Die Digitalisierung von Diapositiven erfolgte mit einem Nikon Coolscan 35 mm-Film-Scanner; die anschließende Bearbeitung wurde ebenfalls unter Verwendung von Adobe Photoshop 5.0 durchgeführt. Schemazeichnungen und Beschriftungen wurden in Claris Draw 1.0 angefertigt und mit den Halbtonbildern zusammengefügt.

2.2.30 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Analysen von Milzgewichten, Parasitenlasten sowie Zytokinkonzentrationen erfolgte standardmäßig mit Hilfe des U-Tests von Wilcoxon, Mann und Whitney zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (Sachs, 1984). Dabei handelt

es sich um ein Gegenstück zum parametrischen t-Test, der jedoch nur bei normalverteilten Daten angewendet werden kann. Im Gegensatz dazu werden beim parameterfreien U-Test weder Normalverteilung noch Gleichheit der Varianzen vorausgesetzt; es muss jedoch eine Gleichheit der Verteilungsform zwischen den Stichproben vorliegen.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung einer genomischen DNA-Bibliothek von *L. donovani* in einem Cosmidvektor

Für die im Rahmen dieser Arbeit angewandte genetische Komplementationsstrategie war die Konstruktion einer Cosmid-Genbank der viszerotropen Spezies *L. donovani* erforderlich; diese Genbank sollte später durch Elektroporation in *L. major* transfiziert werden. Die Konstruktion der Cosmid-DNA-Genbank erfolgte wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben.

3.1.1 Durchschnittliche Verpackungseffizienz und Repräsentativität der Cosmid-DNA-Genbank

Zur Herstellung der Cosmid-Genbank wurde 1 µg genomischer DNA-Fragmente in die Ligationsreaktion mit dem Cosmidvektor pcosTL eingesetzt. Im Anschluss daran erfolgte eine *in vitro*-Verpackung in Phagenpartikel, mit denen *E. coli*-Wirtsbakterien infiziert wurden (siehe Kapitel 2.2.10). Die Effizienz der Verpackungsreaktion wurde dabei als *colony forming units* (cfu)/µg DNA ermittelt; sie betrug durchschnittlich 100.000 cfu/µg DNA.

Um zu überprüfen, ob die Cosmid-Genbank das *L. donovani*-Genom vollständig repräsentiert, wurde die durchschnittliche Größe der genomischen DNA-Fragmente bestimmt. Durch Transformation von *E. coli* mit Cosmid-Genbank-DNA und anschließender Cosmid-DNA-Minipräparation aus jeweils 12 *E. coli*-Klonen wurde mittels Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung aus der Summe der Banden (abzüglich der Größe des Cosmidvektors von 8,5 kb) eine durchschnittliche Insert-Größe von 34,5 kb ermittelt. Bei der Größe des *Leishmania*-Genoms von $3,6 \times 10^7$ bp würden theoretisch 1044 Klone zur Abdeckung des *L. donovani*-Genoms ausreichen. Da sich unter den genomischen DNA-Fragmenten jedoch auch solche mit teilweise überlappenden Sequenzen befinden, ist die tatsächliche Anzahl der erforderlichen Klone wesentlich höher. Sie berechnet sich nach der Poisson-Verteilung mit $N = \ln(1-P) / \ln[1 - (F/G)]$, wobei N für die Zahl der benötigten unabhängigen Klone, G für die Größe des *Leishmania*-Genoms, F für die durchschnittliche Länge der DNA-Fragmente und P für die Wahrscheinlichkeit von 99 % stehen. Nach dieser Formel ergibt sich ein Wert von 4800 erforderlichen unabhängigen Klonen. Die hergestellte Cosmid-Genbank repräsentiert demnach mit 100.000 cfu das 21-fache *L. donovani*-Genom.

3.1.2 Überprüfung der Heterogenität

Neben der Vollständigkeit ist auch die Heterogenität ein wichtiges Kriterium für die Qualität einer Genbank, da sich eine Bevorzugung bestimmter DNA-Sequenzabschnitte nachteilig auf die Repräsentativität auswirken kann. Um dies auszuschließen, wurden 2 µg Cosmidbank-DNA (siehe Kapitel 2.2.13.1) mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Sac* II behandelt und die Reaktionsansätze in einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 2). Wird das Genom in der Cosmidbank gleichmäßig und vollständig repräsentiert, sollten in dem Gel nur die vektorspezifischen Banden zu erkennen sein (ca. 3,3 kb bei *Eco* RI und 7,1 kb bei *Sac* II) sowie ein Schmier aus genomischen DNA-Fragmenten der unterschiedlichsten Größen. Dies war, wie in Abbildung 2 dargestellt, der Fall. Des Weiteren wurden Koloniehybridisierungen (Kapitel 2.2.19.2) mit Digoxigenin-markierten Sonden bekannter *Leishmania*-Hitzeschock-Gene, wie z.B. *HSP70*, *HSP90* und *CLPB*, durchgeführt; die Sonden wurden freundlicherweise von Cornelia Hoyer zur Verfügung gestellt. In allen Fällen konnten Klone identifiziert werden, die Cosmide mit den spezifischen Gensequenzen enthielten; sogar

bei dem nur in einer Kopie vorliegenden *CLPB*-Gen war der Nachweis erfolgreich. Diese Ergebnisse deuten auf eine gute Qualität der Cosmidbank hin.

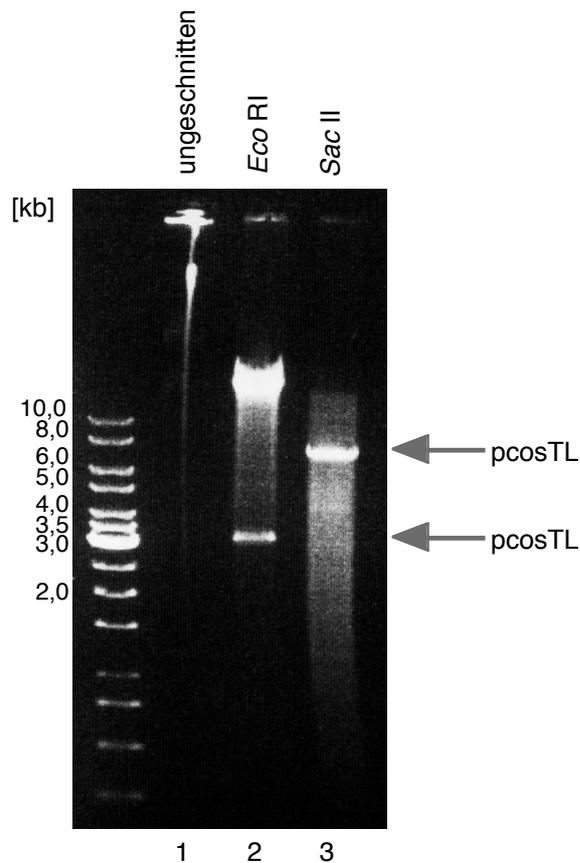


Abbildung 2: Nachweis der Heterogenität innerhalb der Cosmid-DNA-Genbank

Die Abbildung zeigt ein 0,7%iges, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. 2 μ g Cosmidbank-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI (Bahn 2) und *Sac* II (Bahn 3) verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt; in Bahn 1 ist die ungeschnittene Cosmidbank-DNA aufgetragen. Die Pfeile markieren die vektorspezifischen Banden von 3,3 kb (*Eco* RI) bzw. 7,1 kb (*Sac* II); auf der linken Seite sind die Längen und Positionen des DNA-Standards (1 kb-Marker) angegeben.

3.2 Herstellung rekombinanter *L. major* durch Transfektion mit *L. donovani*-Cosmidbank-DNA

L. major-Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, mit Cosmid-Genbank-DNA aus *L. donovani* transfiziert. Dabei wurden pro Elektroporationsansatz 4×10^7 *Leishmania*-Zellen und 50 μ g Cosmid-Genbank-DNA eingesetzt; für eine darauf folgende *in vivo*-Selektion wurden durchschnittlich 6 Transfektionsansätze verwendet.

3.2.1 Transfektionseffizienz

Neben der bereits in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Repräsentativität der Cosmidbank ist für die vollständige Einbringung des *L. donovani*-Genoms in *L. major* auch die Anzahl der rekombinanten Leishmanien pro Transfektionsansatz, die sogenannte Transfektionseffizienz, von Bedeutung. Wenn man davon ausgeht, dass bei der Elektroporation nur je ein Cosmid in die *Leishmania*-Zellen gelangt, benötigt man 4800 rekombinante *L. major*, um das *L. donovani*-Genom komplett abzudecken (siehe Kapitel 3.1.1). Zur Bestimmung der

Transfektionseffizienz wurden 2 Elektroporationsansätze einer *limiting dilution*-Analyse (Kapitel 2.2.6) unterzogen. In einem Transfektionsansatz ohne Zugabe des Selektionsantibiotikums G418 sollte die Anzahl der Zellen ermittelt werden, die die Elektroporation überlebt hatten (d.h. sowohl rekombinante *L. major* als auch solche, die kein Cosmid aufgenommen haben); ein weiterer Transfektionsansatz mit G418-Zusatz diente zur Bestimmung der Zahl rekombinanter *L. major*. Pro Ansatz wurden 2 Parallelbestimmungen durchgeführt.

Aus der *limiting dilution*-Analyse ergab sich eine Überlebensrate von 20%. In absoluten Zahlen heißt dies, dass von 4×10^7 eingesetzten Zellen 8×10^6 die Elektroporation überlebten. Die Zahl rekombinanter *L. major* ist jedoch wesentlich geringer; hier ergaben sich absolute Werte von 331 bzw. 662 Zellen, d.h. im Mittel 500 Zellen pro Transfektionsansatz. Bei insgesamt 6 durchgeführten Transfektionen resultierten demnach ca. 3000 rekombinante *L. major*-Klone. Da die Anzahl benötigter rekombinanter *L. major* zur kompletten Abdeckung des *L. donovani*-Genoms 4800 beträgt, wäre bei 3000 Klonen das *L. donovani*-Genom nur zu 63% repräsentiert. Legt man die ermittelte Transfektionseffizienz zu Grunde, müssten mindestens 10 Elektroporationen durchgeführt werden, um das gesamte *L. donovani*-Genom vollständig in *L. major* einzubringen.

3.2.2 Analyse der Diversität innerhalb der rekombinanten *L. major*

Innerhalb der rekombinanten *L. major* sollten die verschiedenen Cosmide der *L. donovani*-Genbank möglichst gleichmäßig vertreten sein. Dies ist wichtig, da die eigentliche Selektion auf bestimmte Cosmide erst in der BALB/c-Maus stattfinden soll und nicht bereits während der Transfektion bzw. in der Flüssigkultur während der Selektion unter G418. Um zu überprüfen, ob die Diversität der Transfektanden vor der *in vivo*-Selektion gegeben ist, wurden 5 Transfektionsansätze zu gleichen Teilen gemischt. Nach Herstellung von Cosmid-DNA und Transformation in *E. coli* wurden 34 Klone einer Cosmid-DNA-Minipräparation und anschließender Restriktionsanalyse mit *Eco* RV und *Xba* I unterzogen (Abb. 3). Von 34 untersuchten Klonen waren nur 2 aufgrund des Restriktionsmusters identisch; außerdem traten keine außer den vektorspezifischen Banden auffällig häufig in den analysierten *E. coli*-Klonen auf. Man kann demnach davon ausgehen, dass in den rekombinanten *L. major* ein breiter *L. donovani*-Cosmidpool vertreten ist, und dass sich nicht schon vor der eigentlichen Selektion in der Maus bestimmte Cosmide durchsetzen konnten.

3.3 *In vivo*-Selektion rekombinanter *L. major* in BALB/c-Mäusen

Ein Schema der genetischen Komplementationsstrategie ist in Abbildung 4 dargestellt. Aus einer Mischung der mit *L. donovani*-Cosmidbank-DNA transfizierten *L. major* wurden jeweils 5×10^7 promastigote Kulturformen subkutan jeweils in einen Hinterfuß von 4 BALB/c-Mäusen inokuliert. Nach 10-wöchiger Inkubationszeit wurden die Mäuse getötet. Es wurden Lymphknoten und Milzen entnommen, in modifiziertem M199-Medium homogenisiert und bei 25°C kultiviert. Nach Umwandlung der amastigoten Stadien in promastigote Formen wurden die Zellkulturen auf ein größeres Volumen erweitert, und es wurde Cosmid-DNA isoliert (Kap. 2.2.13.2), die zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt wurde. Es erfolgte eine Cosmid-DNA-Minipräparation (Kapitel 2.2.12.1) aus jeweils 50 *E. coli*-Klonen pro Organisolat; diese Cosmid-DNA wurde nachfolgend einer Restriktionsanalyse mit *Eco* RV und *Xba* I unterzogen. Die Identifizierung von Cosmidtypen erfolgte ausschließlich anhand des Restriktions-Fragment-Musters.

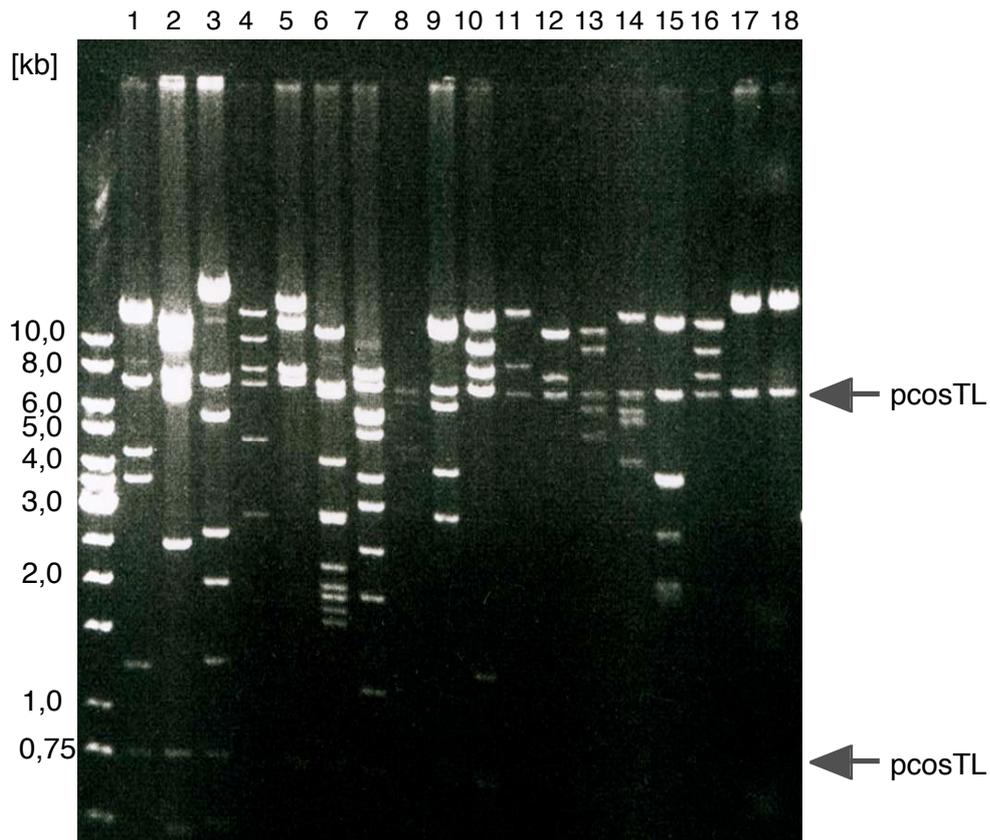


Abbildung 3: Analyse der Diversität innerhalb der rekombinanten *L. major*

Aus rekombinanten *L. major* wurde die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Nach Cosmid-DNA Minipräparation und Restriktionsverdau mit *Eco* RV und *Xba* I wurden die Proben in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard diente der 1 kb-Marker; auf der rechten Seite sind die für den Vektor pcosTL spezifischen Banden angezeigt. Die Abbildung zeigt das Restriktionsmuster von 18 *E. coli*-Klonen; insgesamt wurden 34 Klone untersucht.

Die Parasiten-Populationen aus Lymphknoten und Milzen wurden separat analysiert, um Cosmide identifizieren zu können, die für die rekombinanten Leishmanien in den jeweiligen Organen von Vorteil sind. Das Ergebnis der Restriktionsanalysen lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Innerhalb der Lymphknoten-Isolate traten zwischen verschiedenen Mäusen keine identischen Cosmide auf.
- Innerhalb der Milz-Isolate waren ebenfalls keine Cosmide zu finden, die in verschiedenen Mäusen gleichzeitig auftraten.
- Zwischen Lymphknoten und Milzen verschiedener Mäuse gab es keine Übereinstimmungen bzgl. der Cosmidtypen.
- In einigen Fällen traten in Lymphknoten und Milz derselben Maus identische Cosmide auf.

Parallel zur Analyse der Cosmide wurden die Leishmanien aus Lymphknoten- bzw. Milz-Isolaten einer zweiten Mauspassage unterworfen, wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Rekombinante *L. major*, die aus der Selektion in Lymphknoten hervorgegangen waren, wurden in 2 BALB/c-Mäuse inokuliert und nach einer Inkubationszeit von 10 Wochen wiederum aus den Lymphknoten der Mäuse reisoliert. Parallel dazu wurden rekombinante *L. major*, die aus den Milz-Isolaten stammten, einer erneuten Passage in 2 BALB/c-Mäusen unterworfen und nach der entsprechenden Inkubationszeit aus den Milzen reisoliert.

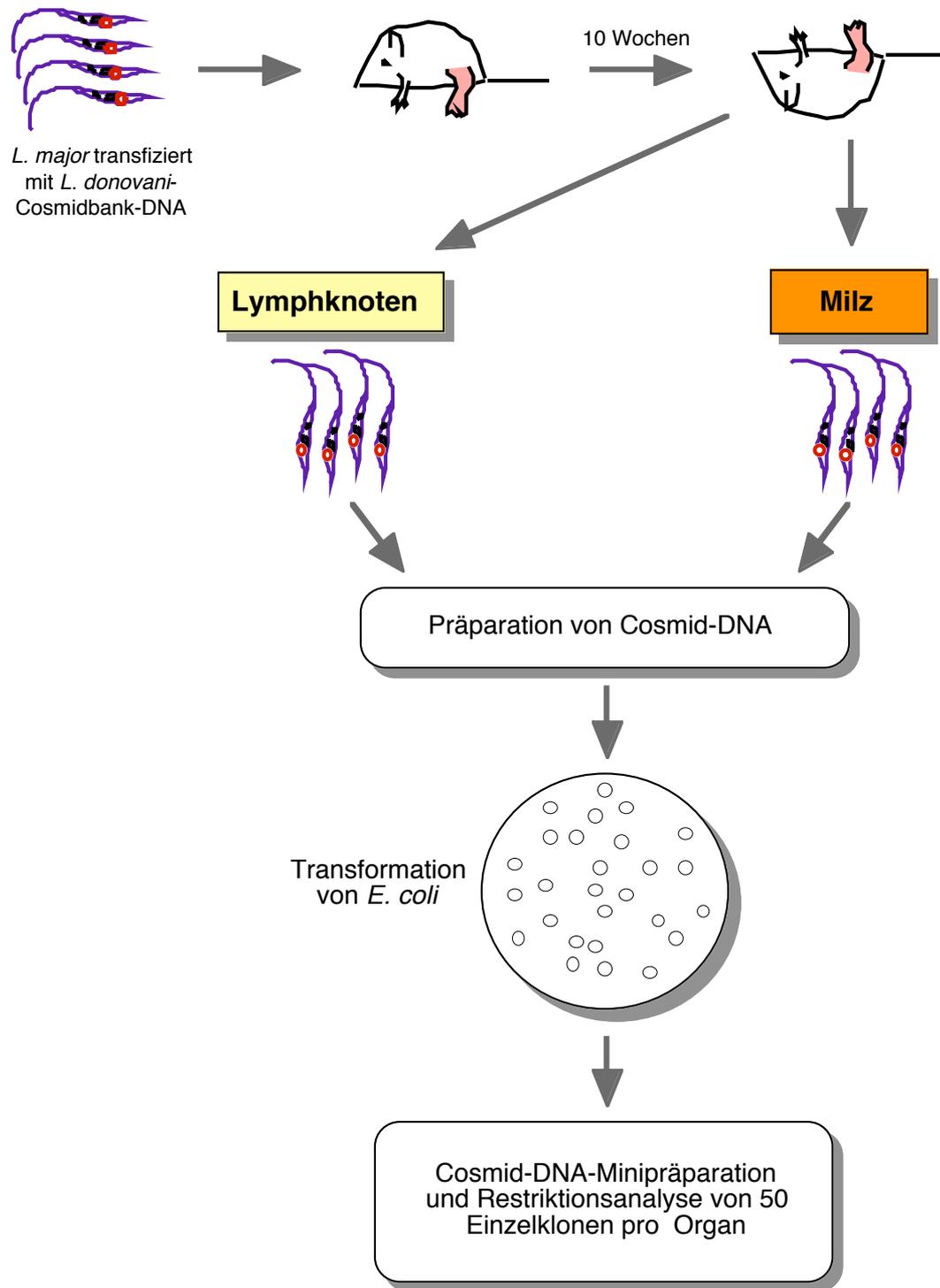


Abbildung 4: Schematische Darstellung der genetischen Komplementationsstrategie und der Identifizierung von Cosmiden

5×10^7 rekombinante *L. major* wurden subkutan jeweils in einen Hinterfuß von 4 BALB/c-Mäusen inokuliert. Nach einem Zeitraum von 10 Wochen wurden die Mäuse getötet, und es erfolgte die Entnahme von Lymphknoten und Milzen. Die homogenisierten Organisolatate wurden in modifiziertem M199-Medium bei 25°C kultiviert. Nach Umwandlung der amastigoten Stadien in promastigote Formen wurde Cosmid-DNA isoliert, die zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt wurde. Die Analyse von 50 *E. coli*-Klonen pro Organisolat erfolgte durch Cosmid-DNA-Minipräparation und Restriktionsverdau; die Cosmide wurden anhand des Restriktions-Fragment-Musters identifiziert.

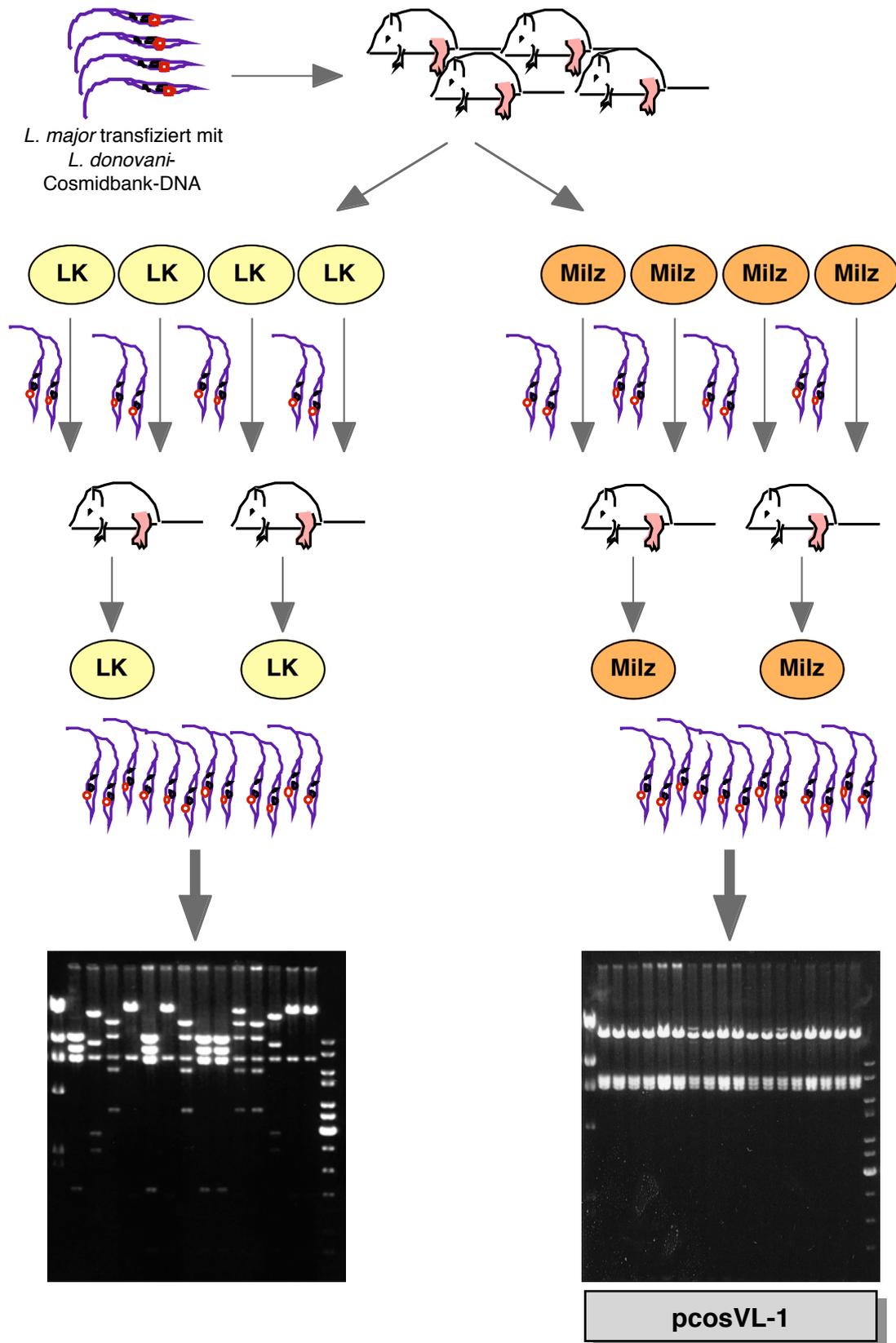


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Selektion von Cosmiden nach wiederholter Passage rekombinanter *L. major* in BALB/c-Mäusen

Rekombinante *L. major* aus Lymphknoten- bzw. Milz-Isolaten wurden einer weiteren Selektion in BALB/c-Mäusen unterworfen. In rekombinanten Leishmanien der Lymphknoten-Isolate ließ sich eine größere Anzahl z.T. ähnlicher Cosmide wiederfinden, während in rekombinanten *L. major* der Milz-

Isolate ein einzelnes Cosmid (pcosVL-1) nahezu ausschließlich vertreten war. Dargestellt ist jeweils ein 0,7%iges Agarosegel, das exemplarisch die Cosmidzusammensetzung rekombinanter *L. major* aus Lymphknoten bzw. Milzen widerspiegelt.

Im Gegensatz zur ersten Mauspassage ergab sich nach dieser zweiten *in vivo*-Selektion ein deutlicher Unterschied in der Cosmidzusammensetzung rekombinanter *L. major* aus Milzen bzw. Lymphknoten (siehe Abbildung 5). Während in den Lymphknoten nach wie vor eine größere Zahl z.T. identischer Cosmidtypen zu finden war, dominierte in den Milz-Isolaten ein einzelnes Cosmid zu jeweils 100% bzw. 94%, das wir mit pcosVL-1 bezeichnet haben (VL steht dabei für viszerale Leishmaniose). Dieses Ergebnis deutet auf einen unterschiedlichen Selektionsdruck in Milz und Lymphknoten hin. In der Milz ist der Selektionsdruck offensichtlich so stark, dass schon zwei aufeinanderfolgende Mauspassagen ausreichen, um auf ein bestimmtes Cosmid zu selektieren.

In einem Wiederholungsexperiment konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Dabei ließ sich nach zwei Milzpassagen rekombinanter *L. major* ein weiteres Cosmid, pcosA, identifizieren, das zu 60% in den Leishmanien vertreten war. Die restlichen 40% setzten sich aus 5 verschiedenen Cosmidtypen zusammen, die auch in rekombinanten *L. major* nach einer parallel durchgeführten zweimaligen Lymphknoten-Passage auftraten; im Gegensatz dazu war pcosA ausschließlich in Leishmanien aus Milz-Isolaten vertreten. Ein Kreuzhybridisierungsexperiment, bei dem pcosA-Cosmid-DNA nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert (Kapitel 2.2.19.1) und nachfolgend mit einer Digoxigenin-markierten pcosVL1-Sonde hybridisiert wurde (Kapitel 2.2.20), konnte keine Übereinstimmungen zwischen den beiden Cosmiden nachweisen. Die Sequenzanalyse von pcosA ist bislang noch nicht erfolgt; aus diesem Grund wurde das Cosmid im weiteren Verlauf der Arbeit nicht näher untersucht.

Da die Zielsetzung dieser Arbeit die Identifizierung Tropismus-relevanter Gene war, wurde der Aspekt der Lymphknoten-Selektion, bei der es sich vermutlich um eine Selektion zugunsten von Cosmiden handelt, die einen Einfluss auf die allgemeine Virulenz haben, nicht weiter verfolgt. Die folgenden Experimente dieser Arbeit befassen sich ausschließlich mit der Analyse und Charakterisierung des nach zweimaliger Milzpassage in den rekombinanten *L. major* dominierenden Cosmids pcosVL-1.

3.4 Vergleichende Untersuchungen zur Infektiosität von *L. major* [pcosVL-1] und *L. major* [pcosTL]

In den vorangegangenen Experimenten stand die Identifizierung von Cosmiden, die für die rekombinanten *L. major in vivo* und ohne Antibiotikum-Selektionsdruck von Nutzen sind, im Vordergrund. Dabei wurde auf Kontrollansätze verzichtet, um die Zahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten. Nach der Identifizierung von pcosVL-1 sollte der Effekt dieses Cosmids im Vergleich mit einer entsprechenden Negativkontrolle analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine *L. major*-Kultur mit pcosVL-1 transfiziert; bei einer zweiten *L. major*-Kultur erfolgte stattdessen die Transfektion mit der DNA des Cosmidvektors, pcosTL. Nach Selektion rekombinanter *L. major* unter Geneticin sollte die Infektiosität von *L. major* [pcosVL-1] im Vergleich mit *L. major* [pcosTL] untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine *in vitro*-Makrophageninfektion durchgeführt.

3.4.1 *In vitro*-Makrophageninfektion

Die Infektion von Makrophagen ist ein gebräuchliches System zur Untersuchung der Infektiosität von Leishmanien *in vitro*. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkszellen aus dem Oberschenkelknochen von BALB/c-Mäusen isoliert und, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben, durch Zugabe von CSF-1-konditionierten Mediums zu Makrophagen ausdifferenziert. Jeweils 2×10^5 Makrophagen wurden im Verhältnis von 1:2 mit promastigoten Stadien von *L. major* [pcosVL-1], *L. major* [pcosTL] bzw. *L. major* WT infiziert und über 3 Tage bei 35°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen in Methanol und eine Giemsa-Färbung.

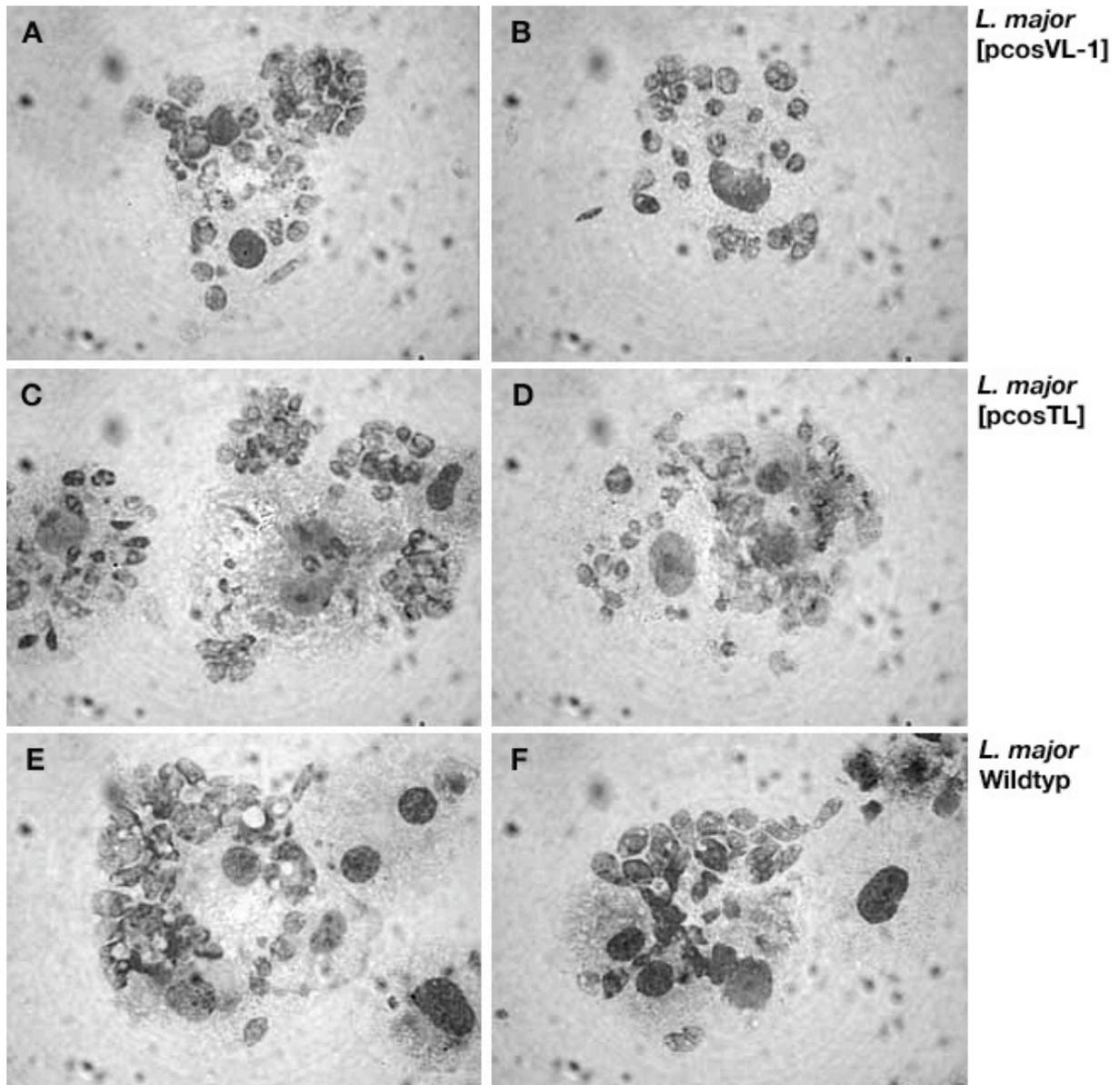


Abbildung 6: *In vitro*-Makrophageninfektion mit *L. major* [pcosVL-1], *L. major* [pcosTL] bzw. *L. major* WT

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen einer *in vitro*-Makrophageninfektion durch *L. major* [pcosVL-1] (A und B), *L. major* [pcosTL] (C und D) bzw. *L. major* WT (E und F) in einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden jeweils 2×10^5 Knochenmarks-Makrophagen im Verhältnis von 1 : 2 mit promastigoten Stadien der entsprechenden *L. major* infiziert und für 3 Tage bei 35°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss in Methanol fixiert und mit Giemsa gefärbt.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis dieser *in vitro*-Makrophageninfektion. Während des 3-tägigen Infektionszeitraumes ließ sich bei mikroskopischer Betrachtung kein Unterschied in der Infektiosität zwischen *L. major* [pcosVL-1], *L. major* [pcosTL] bzw. *L. major* WT feststellen. Dieser Eindruck bestätigte sich nach der quantitativen Auswertung, bei der nach eintägiger Inkubation die Gesamtzahl von Makrophagen sowie die Anzahl von Leishmanien, die sich innerhalb eines Makrophagen befanden, ermittelt wurden. In allen 3 Gruppen ergab sich ein durchschnittliches Verhältnis von 2 infizierenden Leishmanien pro Makrophagen; dieses Experiment ließ sich allerdings nach 3-tägiger Inkubation aufgrund der zu hohen Zahl der Parasiten nicht mehr auswerten.

3.4.2 Infektion von BALB/c-Mäusen

Die Infektiosität von *L. major*[pcosVL-1] sollte nachfolgend *in vivo* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5×10^7 promastigote Kulturformen von *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] separat in den Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (4 Mäuse pro Gruppe).

3.4.2.1 Infektionsverlauf

Die Dokumentation des Infektionsverlaufs erfolgte durch wöchentliche Dickenmessung der Fußballen, wobei die Läsionsgröße als Differenz zwischen infiziertem und uninfiziertem Fuß ermittelt wurde. Obwohl die gesamte Infektionsdauer 10 Wochen betrug, war eine exakte Messung der Fußballendicke nur innerhalb der ersten 5-6 Wochen möglich, bevor die Läsionen zu ulzerieren begannen.

In Abbildung 7A sind die Mittelwerte von jeweils 4 experimentellen Infektionen mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen ist kein Verlaufs-Unterschied der Läsionsentwicklung zwischen *L. major* [pcosVL-1]- und *L. major* [pcosTL]-infizierten Tieren zu beobachten. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei pcosVL-1 nicht um ein Cosmid handelt, das eine erhöhte generelle Virulenz vermittelt.

3.4.2.2 Milzgewichte

Nach 10-wöchiger Infektionsdauer wurden die Mäuse getötet, und es wurden die Milzen entnommen. Dabei ließ sich schon optisch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen, denn die Milzen der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse waren stark vergrößert. Bei der Bestimmung des Milzgewichts (Abbildung 7B) lag der Medianwert der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse mit 391 mg deutlich über dem der mit *L. major* [pcosTL] infizierten Kontrollgruppe (241 mg); der U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney ergab einen signifikanten Unterschied ($\square \leq 0,05$). Ebenfalls in Abb. 7B dargestellt sind die Milzgewichte uninfizierter BALB/c-Mäuse, die annähernd derselben Altersklasse entstammten; der Medianwert dieser Gruppe betrug 101 mg. Auffällig ist dabei, dass selbst die mit *L. major* [pcosTL] infizierten Kontrolltiere gegenüber den uninfizierten eine deutliche Zunahme des Milzgewichts aufwiesen. Dies lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass der von uns verwendete *L. major*-Stamm 5ASKH natürlicherweise in geringem Umfang in der BALB/c-Maus viszeralisiert (pers. Mitteilung J. Clos). Die Ergebnisse zeigen, dass pcosVL-1 einen spezifischen und selektiven Effekt auf pathologische Veränderungen der Milz von BALB/c-Mäusen hat.

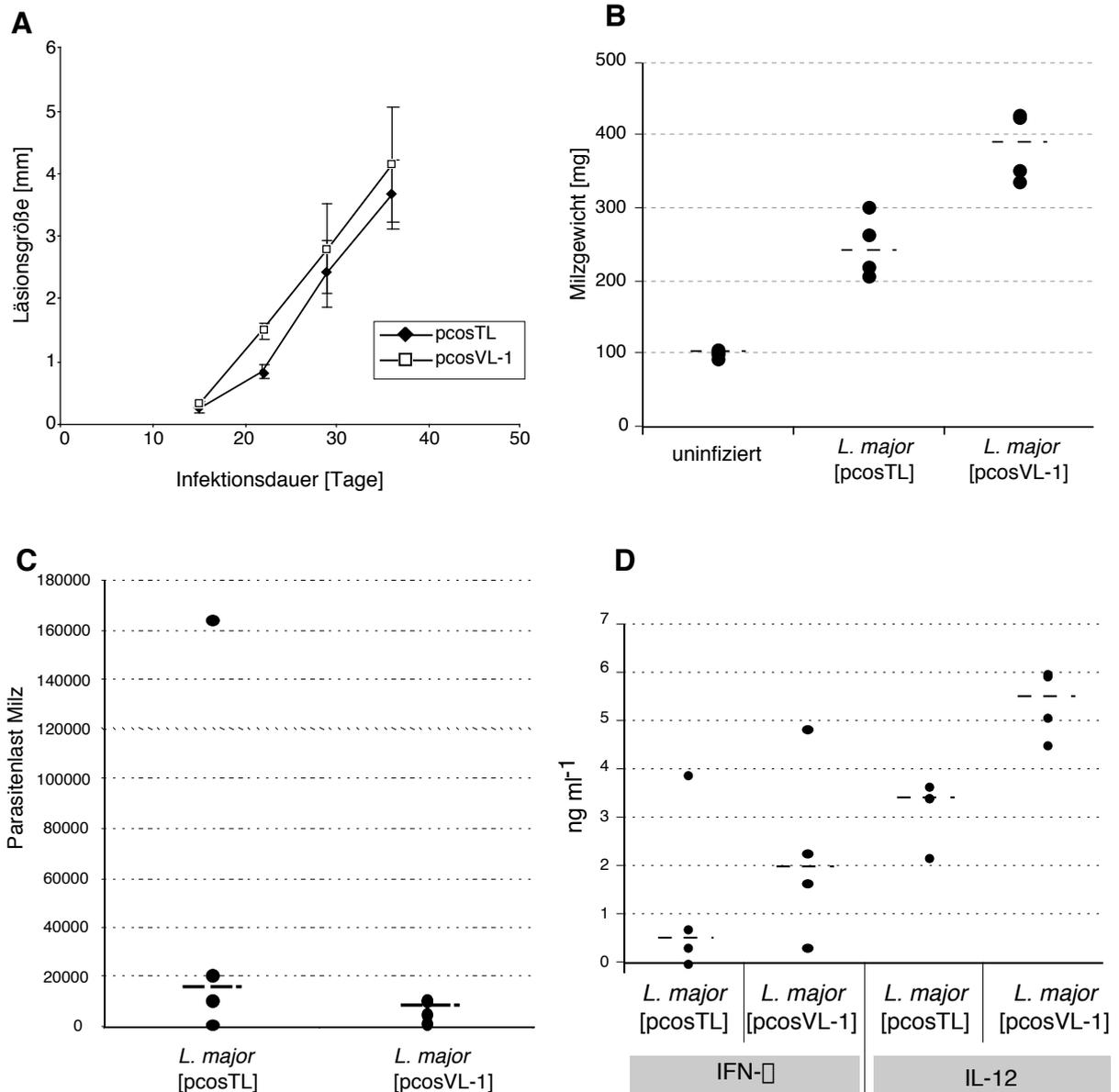


Abbildung 7: Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL]

Je 5×10^7 promastigote *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] wurden in einen Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (4 Mäuse pro Gruppe). Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliche Dickenmessung der Fußballen verfolgt und die Läsionsgröße aus der Differenz zwischen infiziertem und uninfiziertem Fuß ermittelt; dargestellt sind die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (A). Nach 10-wöchiger Inkubationsdauer wurden die Mäuse getötet und die Milzgewichte bestimmt (B). Der Medianwert jeder Gruppe ist als gestrichelte Linie dargestellt. Zum Vergleich sind die Milzgewichte von 4 uninfizierten Mäusen aufgetragen. Durch *limiting dilution*-Analyse erfolgte die Bestimmung der Parasitenlast im Milzgewebe (C). Die Konzentrationen von IFN- γ und IL-12 im Blut der Mäuse sind in (D) dargestellt; die Bestimmung wurde durch ELISA unter Verwendung spezifischer Zytokin-Antikörper (PharMingen) durchgeführt.

3.4.2.3 Parasitenlast in der Milz

Nach der Gewichtsbestimmung wurden die Milzen in modifiziertem M199-Medium homogenisiert, und die Parasitenlast wurde durch *limiting dilution*-Analyse bestimmt (Kap. 2.2.6). Abbildung 7C zeigt die Parasitenlasten pro Organ; der U-Test von Wilcoxon, Mann

und Whitney ergab keinen signifikanten Unterschied in der Parasitenlast der mit *L. major* [pcosVL-1] und *L. major* [pcosTL] infizierten Mäuse.

3.4.2.4 Zytokine

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, ist das *L. major*/BALB/c-Maus-Infektionsmodell durch eine T_H2-Immunantwort gekennzeichnet. Dabei werden von T_H2-Zellen Zytokine (z.B. IL-4, IL-10) freigesetzt, die die Proliferation von B-Zellen und deren Antikörperproduktion auslösen. Während Antikörper der Abwehr freilebender Mikroorganismen dienen, sind sie gegenüber intrazellulären Erregern, wie beispielsweise den Leishmanien, weitgehend wirkungslos. Aus diesem Grund können BALB/c-Mäuse eine *L. major*-Infektion nicht kontrollieren und gehen schließlich daran zugrunde. Protektive Immunität gegen eine *Leishmania*-Infektion wird durch eine T_H1-Antwort vermittelt, bei der IL-12 die Bildung von IFN- γ bewirkt, was wiederum die NO-Synthese in phagozytierenden Zellen auslöst und die intrazellulären Erreger zerstört (Reiner & Locksley, 1995; Bogdan & Röllinghoff, 1998; Solbach & Laskay, 2000).

Vor diesem Hintergrund sollte der mögliche Einfluss von pcosVL-1 auf die Immunantwort der Maus untersucht werden. Dazu wurde den mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten Mäusen vor der Aufarbeitung Blut durch eine Herzpunktion entnommen, das im folgenden auf IFN- γ , IL-4 und IL-12 untersucht wurde. Diese Experimente wurden freundlicherweise von Frau S. Ehrlich im Labor von Herrn PD Dr. A. von Bonin durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA, Kapitel 2.2.27) durchgeführt.

Die Ergebnisse der IFN- γ und IL-12-Messungen sind in Abbildung 7D dargestellt; in beiden Versuchstier-Gruppen ließ sich im Blut kein IL-4 nachweisen. Die gemessenen IFN- γ -Konzentrationen wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit *L. major* [pcosVL-1] und *L. major* [pcosTL] infizierten Mäusen auf; dagegen waren für IL-12 signifikant höhere Werte im Blut der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse zu verzeichnen ($p \leq 0,05$). Dieses Resultat legt die Vermutung nahe, dass die Mäuse auf die *L. major* [pcosVL-1]-Infektion mit einer verstärkten IL-12-Produktion, also möglicherweise mit einer gesteigerten Immunantwort reagieren. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich jedoch ausschließlich um Zytokinkonzentrationen im Blutserum der mit *Leishmania* infizierten Mäuse. Um die Theorie einer verstärkten Immunantwort zu untermauern, wäre zusätzlich eine Analyse der Zytokinproduktion in den lymphatischen Organen, dem eigentlichen Aufenthaltsort der Leishmanien, von Bedeutung.

3.5 Sequenzanalyse von pcosVL-1

Die Sequenzierung von pcosVL-1 wurde von Markus Schilhabel am IMB in Jena in der Arbeitsgruppe von Mathias Platzer durchgeführt. Durch mechanische Scherung wurde das Cosmid in kleinere Fragmente zerlegt, die in einen Plasmidvektor subkloniert wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Sequenzierung der Plasmid-Bibliothek sowie die Zusammensetzung der Contigs.

Die Insert-Größe von pcosVL-1 beträgt 31907 bp. Für die Identifizierung putativer Offener Leseraster (engl. *open reading frame* = ORF) wurden als Auswahlkriterien eine Mindestlänge von 450 bp sowie ein G/C-Gehalt von mehr als 60% zu Grunde gelegt. Es konnten 8 putative ORFs identifiziert werden (siehe Tabelle 2). Von diesen 8 ORFs sind die beiden ersten identisch und wir vermuten, dass es sich dabei um den Teil eines repetitiven Gen-*cluster* handelt, wie sie bei Leishmanien relativ häufig zu finden sind. ORF1 ist

allerdings im Gegensatz zu ORF2 nicht vollständig auf dem Cosmid erhalten. Insgesamt beträgt der Anteil putativer Protein-kodierender Sequenzen auf pcosVL-1 63% (20152 bp).

Tabelle 2: Sequenzanalyse von pcosVL-1

ORF Nr.	Größe [bp]	MW [Da]	BLAST score	E-Wert	signifikante Übereinstimmungen ($score > 50 / E < e^{-06}$)	keine signifikanten Übereinstimmungen
1	1052	38857	298	$5e^{-80}$	hypothetisches Protein PA 4583 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
2	1463	53833	354	$1e^{-96}$	hypothetisches Protein PA 4583 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
3	6350	226135	50	$4e^{-04}$		hypothetisches Protein in intergenischer Region ume3-hda 1 (<i>Leishmania major</i>)
4	1343	47541	108	$9e^{-23}$	hypothetisches NifU-ähnliches Protein (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	
			85	$2e^{-15}$	NU1 (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	
5	605	22051	33	2,5		Insulin-verwandter Peptid-Rezeptor (<i>Biomphalaria glabrata</i>)
6	4952	176323	96	$3e^{-18}$	leucinreiches repeat-Protein 1 (<i>Leishmania major</i>)	
			77	$2e^{-12}$	ESAG 8-Protein (<i>Trypanosoma brucei</i>)	
7	1379	49482	419	e^{-116}	Xylitol-Dehydrogenase (<i>Morganella morganii</i>)	
			271	$2e^{-71}$	NAD-abhängige Sorbitol-Dehydrogenase (<i>Prunus persica</i>)	
8	3008	107415	58	$5e^{-07}$	hypothetisches Protein T13L16.8 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	

Die DNA-Sequenz von pcosVL-1 wurde mit Hilfe der MacMolly Tetris Software auf putative *open reading frames* untersucht; die entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden einer Datenbankrecherche (BLAST-P) unterzogen. Aufgelistet sind Größe, Molekulargewicht, BLAST score und E-Wert sowie die anhand der letzten beiden Kriterien vorgenommene Einteilung in signifikante bzw. nicht signifikante Suchergebnisse.

Die Aminosäuresequenzen wurden im folgenden einer Datenbankrecherche (BLAST-P) unterzogen. Dabei ergab sich, dass 75% der auf pcosVL-1 kodierten Proteine entweder keine signifikanten Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen oder nur Homologien zu unbekannt Proteinen aufwiesen. Lediglich bei drei ORFs ließen sich Ähnlichkeiten mit

bereits bekannten Proteinen feststellen. Dabei handelt es sich zum einen um die NifU-Proteinfamilie (ORF4), die bei der Synthese von Fe-S-Gruppen der Nitrogenase stickstofffixierender Bakterien eine Rolle spielt (Yuvaniyama *et al.*, 2000). In *Trypanosoma cruzi* konnte ein Gen (*TcNUI*) identifiziert werden, das für ein 29,7 kDa Protein mit starker Identität zur C-terminalen Domäne der NifU-Proteinfamilie kodiert (Lorenzi *et al.*, 2000); die Funktion dieses Proteins ist jedoch nicht bekannt. Des Weiteren ließen sich im Fall von ORF6 Homologien zu leucinreichen *repeat*-Proteinen nachweisen, die eine wichtige Rolle bei der Genexpression in Eukaryonten spielen. In diesem Zusammenhang ist die Übereinstimmung mit dem ESAG 8-Protein (ESAG = *Expression Site-Associated Gene*) aus *Trypanosoma brucei* zu erwähnen, welches zu einer Familie von Genen gehört, die innerhalb der VSG (*Variant Surface Glycoprotein*)-Expressionsstellen liegen, und das möglicherweise an stadienspezifischen Regulationsprozessen beteiligt ist (Revelard *et al.*, 1990; Lips *et al.*, 1996). Bei ORF7 konnten Homologien zu einer Xylitol- bzw. Sorbitol-Dehydrogenase nachgewiesen werden; diese Enzyme spielen im Kohlenhydratstoffwechsel eine Rolle. Zusammenfassend lässt sich zum Ergebnis der Sequenzanalyse feststellen, dass es sich bei den auf pcosVL-1 identifizierten putativen ORFs um 7 verschiedene Gene handelt, die für Proteine mit weitgehend unbekanntem Funktionen kodieren.

3.6 Vom Cosmid zum Gen – Identifizierung relevanter *open reading frames*

Nach Abschluss der Sequenzanalyse von pcosVL-1 stellte sich die Frage, welches bzw. welche der 7 verschiedenen Gene den rekombinanten *L. major* einen Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verschaffen. Zu diesem Zweck sollte die *L. donovani*-Cosmid-Genbank auf Cosmide durchgemustert werden, die teilweise Überlappungen mit pcosVL-1 aufweisen. Die Idee war, über die Identifizierung von Cosmiden, die in verschiedenen Bereichen mit dem Originalcosmid übereinstimmen, und einer darauf folgenden *in vivo*-Selektion eine Einengung auf relevante Bereiche von pcosVL-1 vornehmen zu können. Eine Voraussetzung für die Anwendung dieser Strategie war, homologe Cosmide zu pcosVL-1 mit möglichst günstigem Überlappungsmuster zu finden.

3.6.1 Durchmusterung der *L. donovani*-Cosmid-Genbank nach pcosVL-1-Homologen

Für die Herstellung von DNA-Sonden des Anfangs- bzw. Endbereiches von pcosVL-1 wurden ORF2 und ORF7 ausgewählt, da diese beiden ORFs vollständig auf dem Cosmid erhalten sind und sich mit ihrer Größe von 1463 bp bzw. 1379 bp relativ problemlos mittels PCR amplifizieren ließen. Die Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden erfolgte wie in Kapitel 2.2.18.1 beschrieben. Für die Kolonie-Hybridisierung (Kap. 2.2.19.2) wurden ca. 8 x 1000 cfu der *L. donovani*-Cosmid-Genbank ausplattiert, auf Nitrocellulose-Membranfilter transferiert und mit einem Gemisch aus DIG-ORF2 und DIG-ORF7 hybridisiert. Positive Klone wurden einer nochmaligen Hybridisierung mit den Einzelsonden von ORF2 und ORF7 unterzogen; danach wurden solche Cosmide, die mit beiden Sonden gleichzeitig hybridisiert hatten und demnach in weiten Bereichen mit pcosVL-1 identisch sein mussten, aussortiert. Es verblieben 8 Klone, die einer Cosmid-DNA-Maxipräparation mit Hilfe des QIAGEN-tip 500 Plasmid Maxi-Kit (Kap. 2.2.12.3) unterworfen und im Anschluss von den Enden her teilsequenziert wurden. Dazu wurden zwei Oligonukleotide (CH-2 bzw. M13R, siehe Kap. 2.1.9) verwendet, die an Bereiche des Cosmidvektors, pcosTL, binden, die in unmittelbarer Nähe der *Bam* HI-Schnittstelle, d.h. dem Beginn bzw. Ende der genomischen DNA-Inserts, liegen. Da es sich bei den 8 positiven Klonen um Cosmide handelt, die nur teilweise mit pcosVL-1 überlappen, fand von den Anfangs- bzw. Endsequenzen der Cosmide nur jeweils

eine auf pcosVL-1 ihre Entsprechung. Das Überlappungsmuster der pcosVL-1-Homologe mit dem Originalcosmid ist in Abbildung 8 dargestellt.

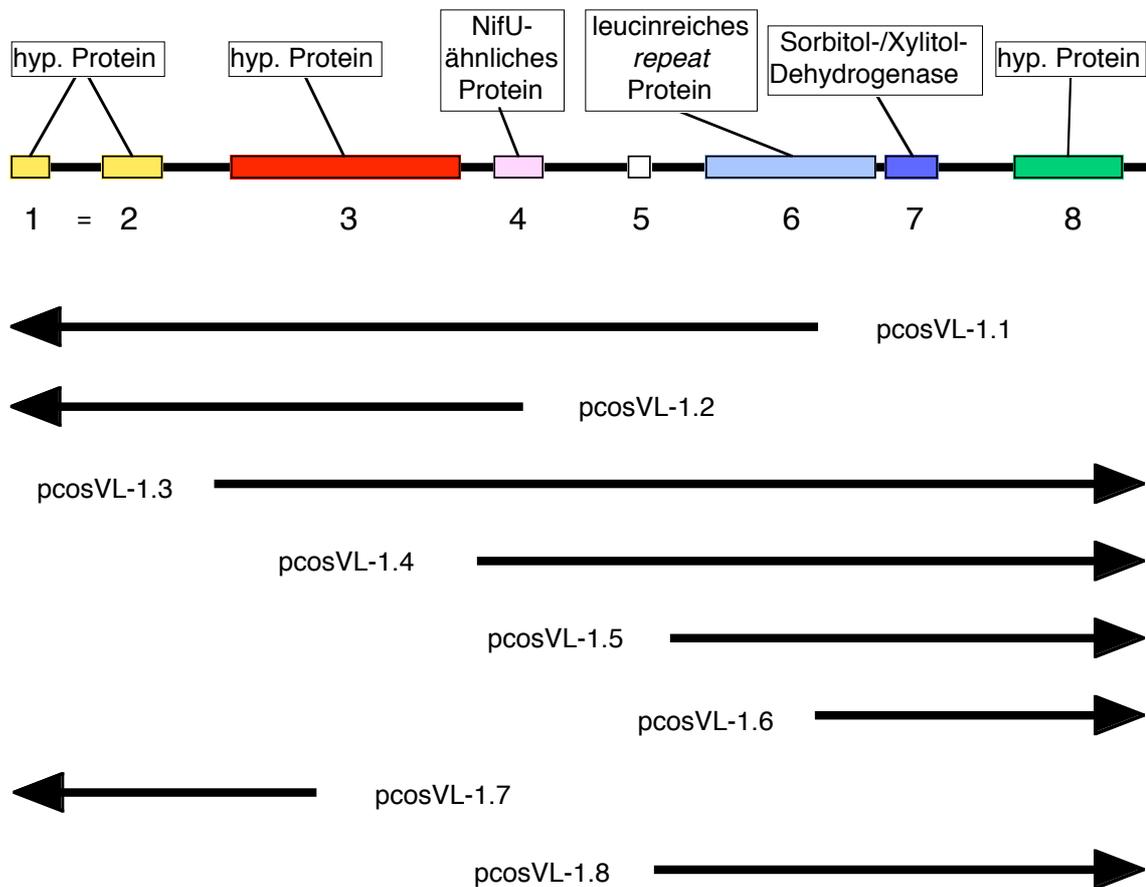


Abbildung 8: Homologe Cosmide von pcosVL-1

Bei einem *screen* der *L. donovani*-Cosmid-Genbank mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden beider Enden des Cosmids pcosVL-1 konnten 8 Cosmide identifiziert werden. Durch Teilsequenzierung dieser Cosmide von den Enden ergab sich das dargestellte Überlappungsmuster mit dem Originalcosmid pcosVL-1.

3.6.2 Transfektion von *L. major* mit pcosVL-1-Homologen und *in vivo*-Selektion

Abbildung 9 gibt schematisch die Vorgehensweise nach der Identifizierung der pcosVL-1-Homologe wieder. Jedes dieser Cosmide sowie pcosVL-1 wurde einzeln in *L. major* transfiziert. Nach Selektion rekombinanter *L. major* unter G418 wurden diese zu gleichen Teilen gemischt. Je 5×10^7 rekombinante Leishmanien dieser Mischung wurden in die re/hi Fußballen von 3 BALB/c-Mäusen inokuliert. Nach 10-wöchiger Infektionsdauer erfolgte die Reisolation rekombinanter *L. major* aus dem Milzgewebe und, nach dem Anwachsen der Zellen in Kultur, die Isolierung von Cosmid-DNA, die Transformation von *E. coli*, Cosmid-DNA-Minipräparationen sowie Restriktionsanalysen von 50 *E. coli*-Klonen pro Milz-Isolat.

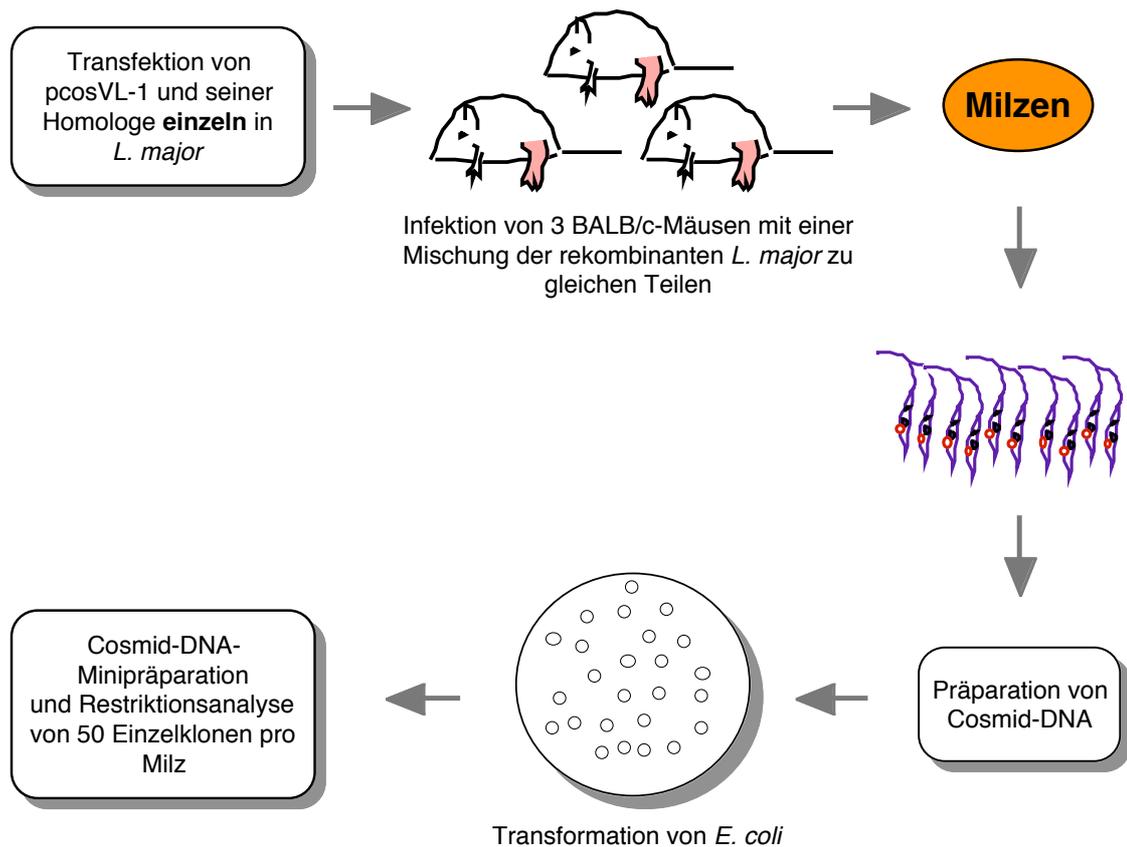


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur *in vivo*-Selektion der mit pcosVL-1 und seiner Homologe transfizierten *L. major*

Nach individueller Transfektion von *L. major* mit pcosVL-1 und seiner Homologe wurden die rekombinanten Parasiten zu gleichen Teilen gemischt, und es wurden jeweils 5×10^7 Promastigote in den rechten hinteren Fußballen von 3 BALB/c-Mäusen inokuliert. Nach 10 Wochen Infektionsdauer wurden die rekombinanten *L. major* aus den Milzen reisoliert und in der bereits mehrfach beschriebenen Weise einer klonalen Analyse in *E. coli* unterzogen.

Das Ergebnis der *in vivo*-Selektion ist in Abbildung 10A exemplarisch anhand ausgewählter *E. coli*-Klone, die nach Restriktionsverdau mit *Eco* RV/*Xba* I gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, dargestellt; insgesamt wurden 148 *E. coli*-Klone untersucht. Abbildung 10B zeigt zum Vergleich die Bandenmuster von pcosVL-1 und seiner Homologe nach Restriktionsanalyse mit *Eco* RV und *Xba* I. Es konnten lediglich 2 Cosmide in den aus den Milzen reisolierten rekombinanten *L. major* wiedergefunden werden: pcosVL-1.2 in 130 Klonen (88%) sowie das Originalcosmid pcosVL-1 in 18 Klonen (12%). Überträgt man dieses Ergebnis auf das Überlappungsmuster der Cosmide (Abbildung 11), so fällt auf, dass pcosVL-1.2 und pcosVL-1 nur zwei ORFs gemeinsam haben, nämlich ORF2 und ORF3. Das Ergebnis dieser *in vivo*-Selektion deutet auf ORF2 und ORF3 als Kandidatengene hin, die den rekombinanten *L. major* einen Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verschaffen.

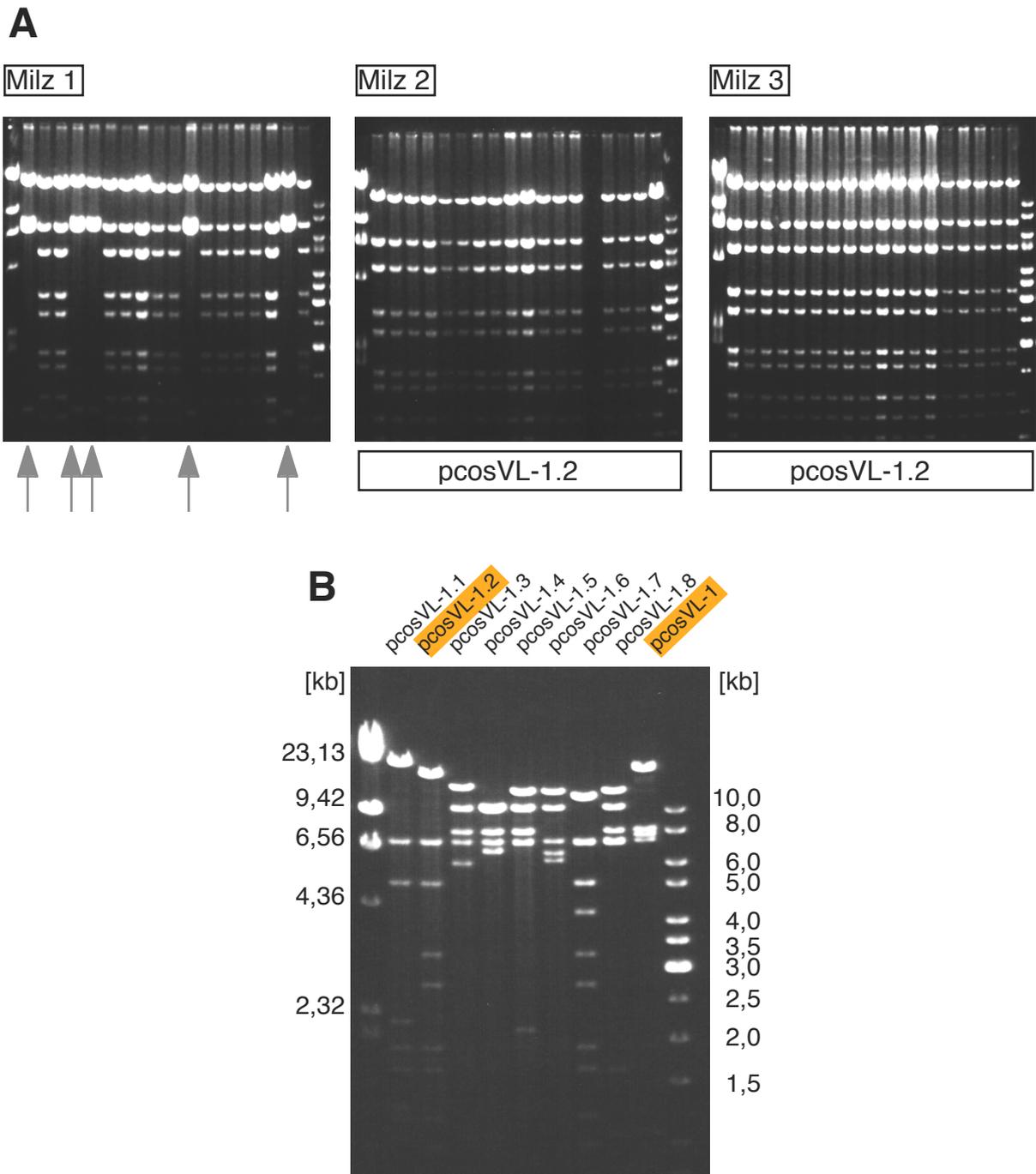


Abbildung 10: Ergebnis der *in vivo*-Selektion der mit pcosVL-1 und seiner Homologe transfizierten *L. major*

Dargestellt sind drei 0,7%ige, mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele, die exemplarisch das Ergebnis der Restriktionsanalyse von 148 *E. coli*-Klonen mit *Eco* RV/*Xba* I wiedergeben (A). Die Pfeile weisen auf das Restriktionsmuster von pcosVL-1 hin, die restlichen Klone zeigen ausschließlich pcosVL-1.2. Die Bandenmuster aller 9 Cosmidtypen nach *Eco* RV/*Xba* I-Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung sind in (B) abgebildet.

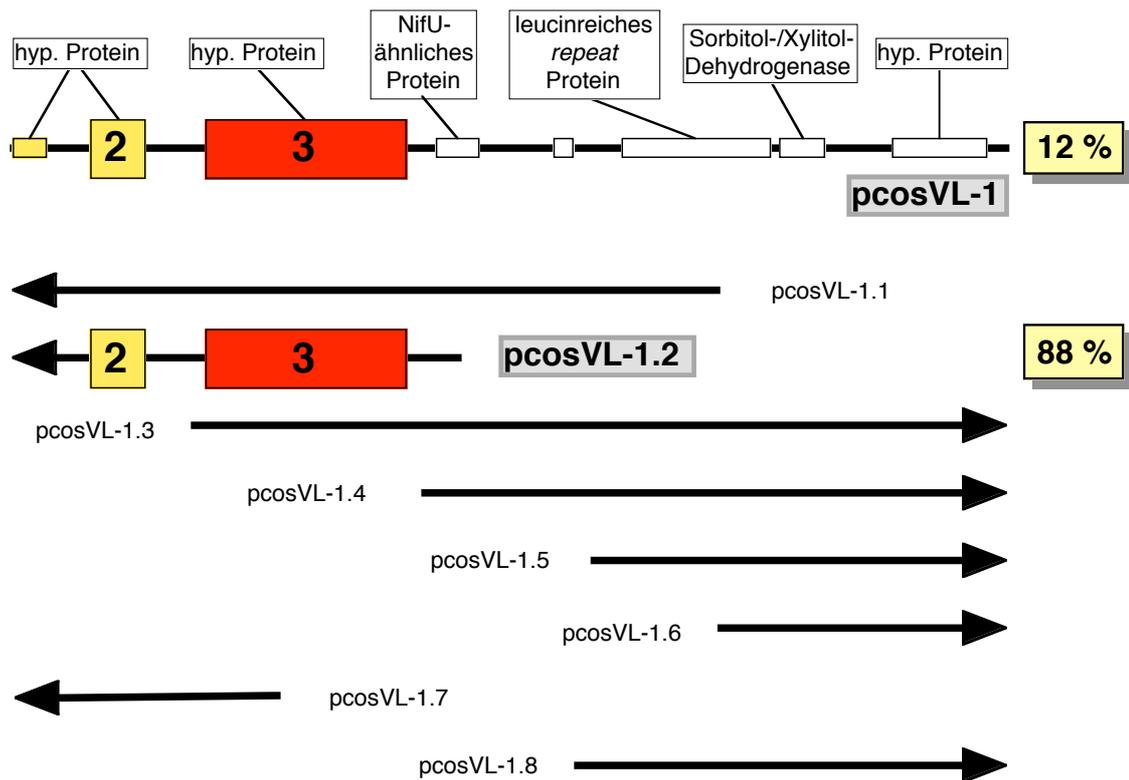


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Identifizierung relevanter ORFs nach der *in vivo*-Selektion

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der *in vivo*-Selektion der mit pcosVL-1 und seiner Homologe transfizierten *L. major* anhand des Überlappungsmusters der Cosmide. Gemeinsame Bereiche von pcosVL-1.2 und pcosVL-1, den Cosmiden, die aus der Selektion zu 88% bzw. 12% hervorgingen, sind besonders hervorgehoben. Es handelt sich dabei um zwei *open reading frames*, ORF2 und ORF3.

Fraglich ist allerdings, weshalb pcosVL-1.1, das ebenfalls ORF2 und ORF3 beinhaltet, nicht nach der *in vivo*-Selektion zu finden war. Ein möglicher Grund könnte die bevorzugte Transformation einiger Cosmide in *E. coli* sein. Um dies zu überprüfen, wurden *E. coli* mit einer Mischung aller 9 Cosmid-DNAs transformiert. Nachfolgend wurde von 50 Bakterienklonen Cosmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau charakterisiert. Das Resultat ist in Abbildung 12 dargestellt und zeigt, dass bei der Transformation von *E. coli* keine Begünstigung bestimmter Cosmide stattfindet. Eine Southern-Blot-Analyse von Cosmid-DNA der pcosVL-1-Homologe unter Verwendung Digoxigenin-markierter Sonden von ORF2 und ORF3 ergab, dass diese ORFs ausschließlich auf den in Abbildung 11 dargestellten, in entsprechenden Bereichen mit pcosVL-1 überlappenden Cosmiden lokalisiert waren; das Ergebnis der Teilsequenzierung von den Enden konnte dadurch – zumindest für ORF2 und ORF3 – bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine vorläufige Einengung der relevanten ORFs auf zwei mögliche Kandidaten, nämlich ORF2 und ORF3, vorgenommen werden konnte. Die nachfolgenden Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob durch die Überexpression eines der beiden ORFs der beobachtete Effekt in rekombinanten *L. major* erzielt werden kann.

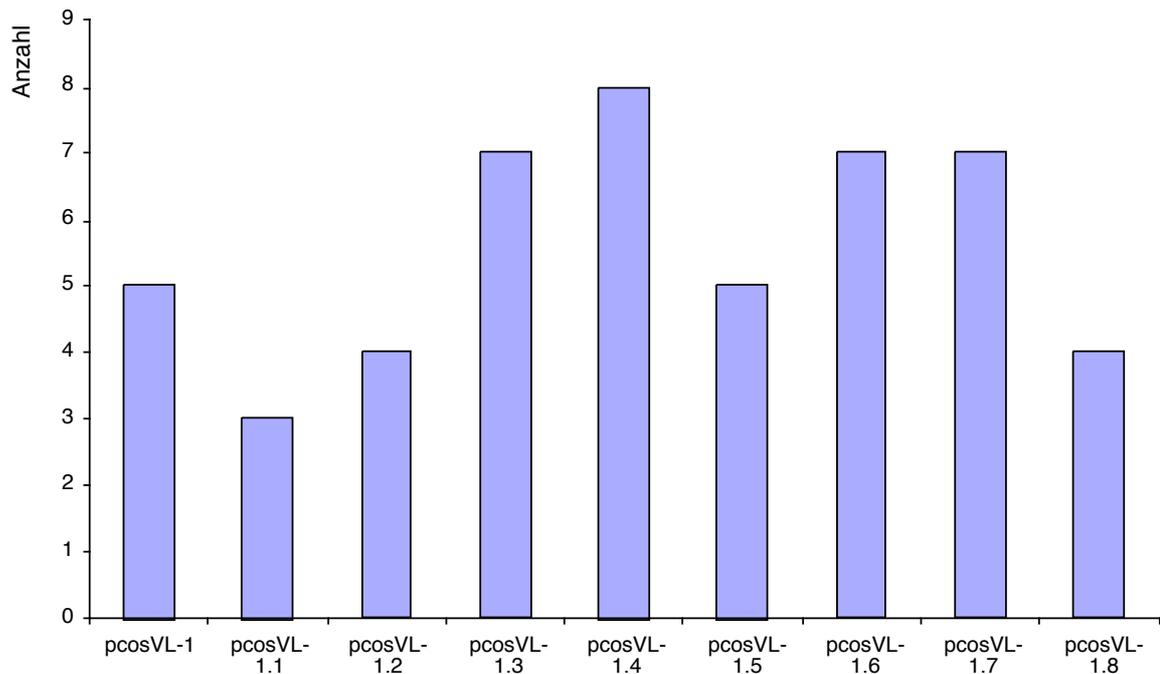


Abbildung 12: Transformationsexperiment mit pcosVL-1 und seiner Homologe

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 5 µg einer Cosmid-DNA-Mischung transformiert, die zu gleichen Teilen aus pcosVL-1 und seiner Homologe bestand. Nach Cosmid-DNA-Minipräparation aus 50 *E. coli*-Klonen und anschließender Restriktionsanalyse wurde die Anzahl der jeweiligen Cosmide bestimmt und nachfolgend graphisch aufgetragen.

3.7 Rekombinante Expression von ORF2 und ORF3 in *E. coli*

Bevor mit den vergleichenden Untersuchungen zum Effekt von ORF2 bzw. ORF3 in überexprimierenden *L. major* begonnen wurde, erfolgte zunächst die rekombinante Expression beider Proteine in *E. coli* zur Antigen-Gewinnung.

Zu diesem Zweck wurden beide ORFs durch PCR (Kapitel 2.2.15) aus dem Cosmid pcosVL-1 amplifiziert. Die dazu verwendeten spezifischen Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1.9 beschrieben. Die 5'-Primer trugen eine zusätzliche *Nde* I-Schnittstelle; der 3'-Primer zur Amplifikation von ORF2 trug eine *Bam* HI-Schnittstelle, während in den 3'-Primer von ORF3 eine *Bcl* I-Schnittstelle eingefügt war. In beiden Fällen sollten die entstandenen PCR-Produkte mit einer Größe von 1467 bp (ORF2) bzw. 6361 bp (ORF3) nach entsprechendem Restriktionsverdau in den mit *Nde* I und *Bam* HI vorbereiteten bakteriellen Expressionsvektor pJC45 ligiert werden; die Karte des Plasmidvektors ist in Abbildung 13 dargestellt. Die in pJC45 rekombinant exprimierten Proteine erhalten am aminoterminalen Ende zusätzlich 20 Aminosäuren inklusive einer oligo-Histidin-Sequenz, die eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie erlaubt.

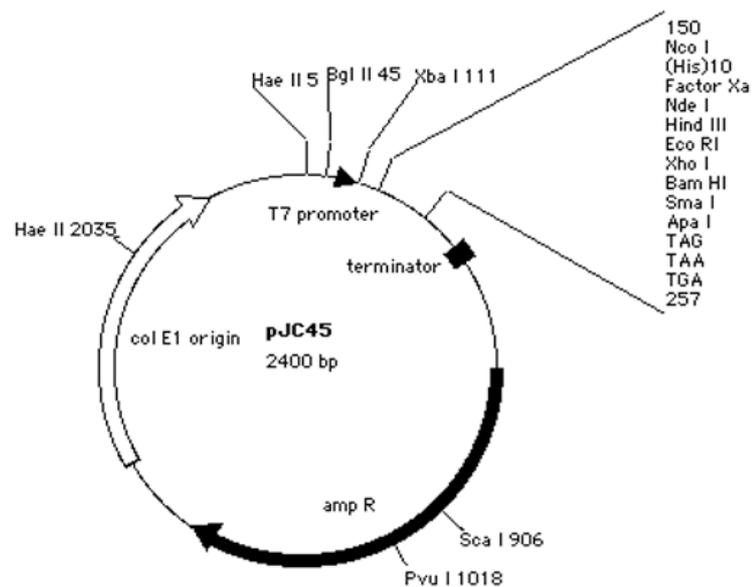


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pJC45

Dargestellt sind der Replikationsursprung (weißer Pfeil) sowie das für die Ampicillinresistenz verantwortliche β -Lactamase-Gen (schwarzer Pfeil); die schwarze Pfeilspitze symbolisiert den T7-Promotor, während das schwarze Rechteck den Terminator der Transkription darstellt. Die Ligation von ORF2 bzw. ORF3 erfolgte über die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstellen. Die rekombinant exprimierten Proteine erhalten am N-Terminus zusätzlich 20 Aminosäuren inklusive 10 Histidin-Resten (His-tag), die eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie erlauben.

Nach Transformation der Plasmide in kompetente *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q] wurde die Expression von ORF2 bzw. ORF3 durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Kapitel 2.2.21.2) induziert. Das Ergebnis einer Testexpression ist in Abbildung 14 zu sehen. Dargestellt sind mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgele, in denen jeweils eine Proteinprobe vor IPTG-Zugabe (Bahn 1) und nach Induktion mit IPTG (Bahn 2) aufgetragen ist. Die Genprodukte der klonierten Sequenzen wurden erfolgreich exprimiert, da in den Proben nach Induktion deutliche Banden in der erwarteten Größe von 53,8 kDa (ORF2, Abb. 14A) bzw. 226 kDa (ORF3, Abb. 14B) auftraten. Dies beweist, dass es sich bei beiden DNA-Abschnitten tatsächlich um offene Leserahmen handelt. Bei der rekombinanten Expression des ORF3-Genproduktes traten zusätzliche, geringeren Molekulargewichten entsprechende Banden auf. Diese stellen möglicherweise Teile des ORF3-Genproduktes dar.

3.7.1 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine zur Antigen-Gewinnung

Für die Antigen-Gewinnung war es notwendig, die rekombinant exprimierten Proteine aufzureinigen. Die Überexpression rekombinanter Proteine führt in den Bakterienzellen meist zur Bildung unlöslicher Aggregate, der sogenannten *inclusion bodies*, in denen die Proteine in einem nicht-nativen Zustand vorliegen. Dies war auch bei den Genprodukten von ORF2 und ORF3 der Fall; nach Aufschluss der *E. coli*-Zellen durch Ultraschall und darauf folgender Zentrifugation ließ sich kein rekombinantes Protein im Überstand nachweisen (siehe Abbildung 15, Bahn 3 sowie Abbildung 16, Bahn 3). Dies deutete auf die Bildung von *inclusion bodies* hin. Die Bildung solcher Einschlusskörper kann durchaus von Vorteil sein, da dabei häufig sehr hohe Konzentrationen rekombinanten Proteins erzielt werden können.

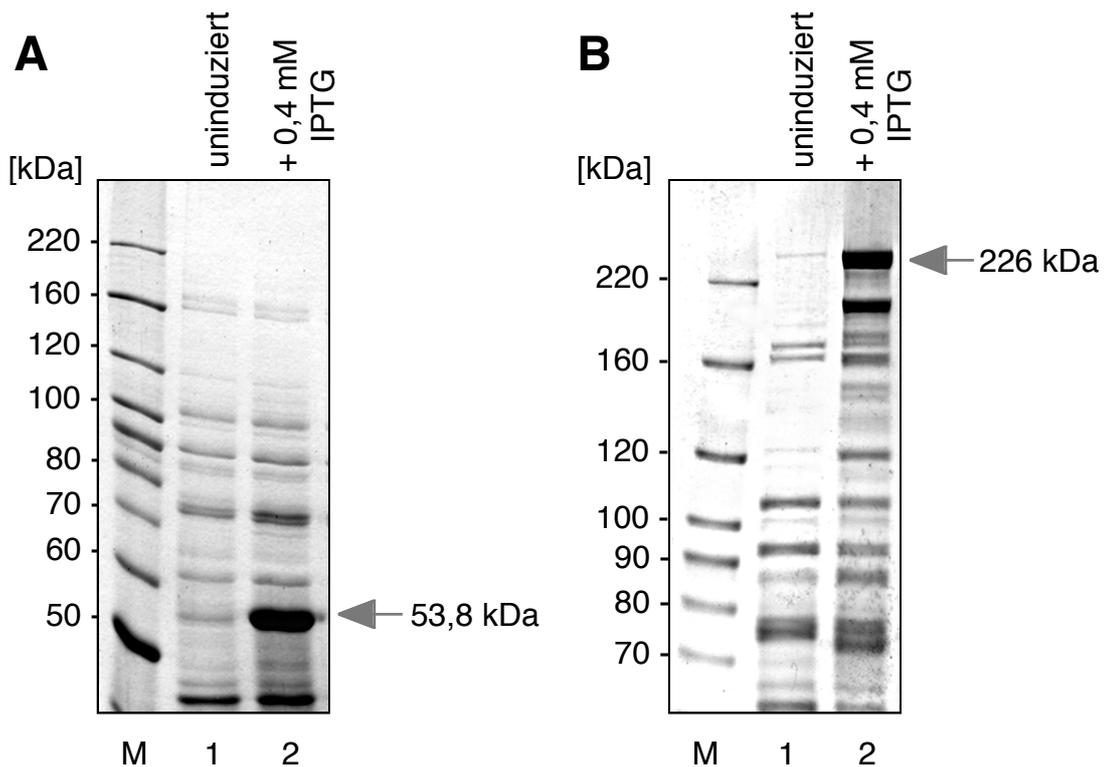


Abbildung 14: Test-Expression von ORF2 bzw. ORF3 in *E. coli*

Dargestellt sind ein 7,5%iges, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der rekombinanten Expression von ORF2 (A) bzw. ein in gleicher Weise behandeltes, 6%iges SDS-Polyacrylamidgel mit dem entsprechenden Ergebnis für ORF3 (B). Rekombinante *E. coli* BL21(DE3)[pAP/lacI^q] wurden bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von ca. 0,1-0,2 kultiviert. Nach Entnahme einer 1 ml-Probe wurde die Expression des entsprechenden Proteins durch IPTG-Zugabe induziert; nach 1,5 h erfolgte die nochmalige Entnahme von 1 ml Zellsuspension. Die Zellen wurden sedimentiert, ihrer OD_{600nm} entsprechend in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C lysiert. Es wurden jeweils gleiche Volumina vor Induktion (Bahn 1) und nach Induktion (Bahn 2) aufgetragen. Die Größe der erwarteten Proteine ist an der rechten Seite angegeben; die Positionen des Längenstandards (Bench Mark™ Protein Ladder) sind links markiert.

Nach Aufschluss der *E. coli*-Zellen durch Ultraschall und dem Abtrennen der *inclusion bodies* durch Zentrifugation können diese unter denaturierenden Bedingungen extrahiert werden; üblicherweise geschieht dies durch Behandlung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid bzw. 8 M Harnstoff.

Im Fall von ORF2 wurden die Einschlusskörper durch einstündige Inkubation mit 8 M Harnstoff gelöst (siehe Abbildung 15, Bahn 4). Die Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins erfolgte durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.2.21.3). Die einzelnen Fraktionen wurden durch Elektrophorese auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgende Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau analysiert (Abbildung 15). Als Antigen für die spätere Immunisierung von Hühnern wurde das Eluat 5.2 verwendet.

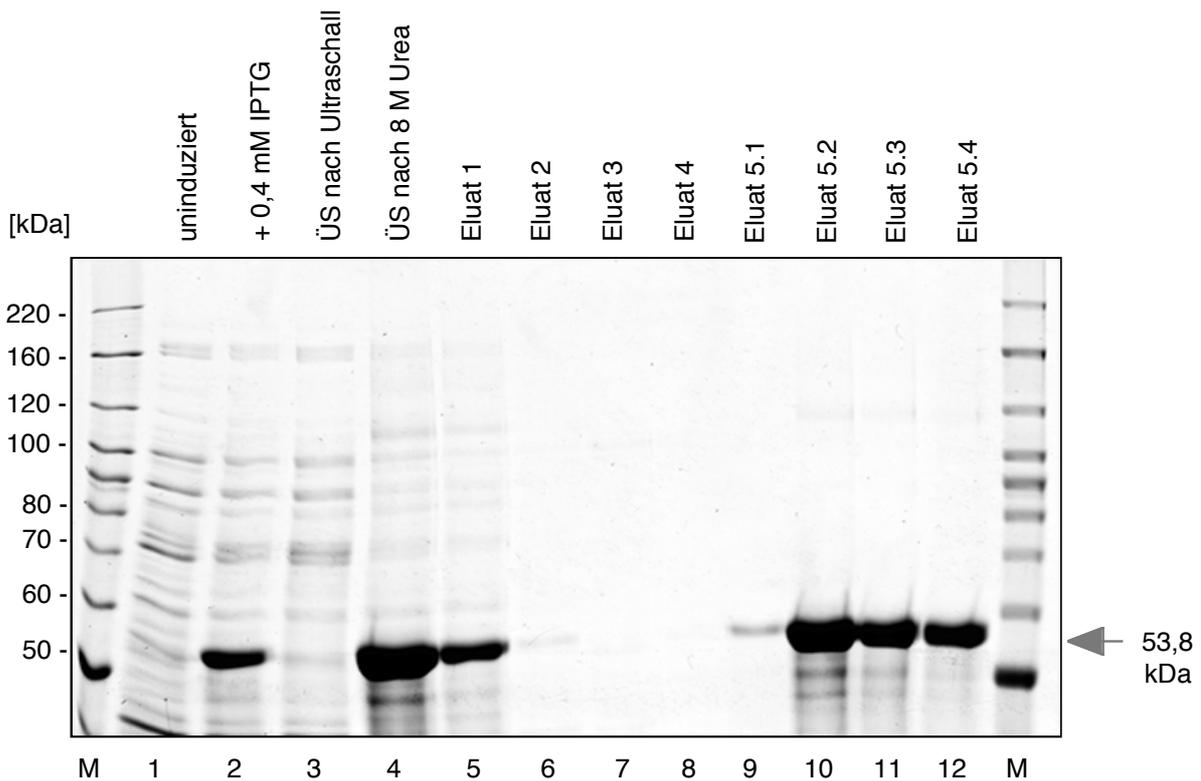


Abbildung 15: Aufreinigung des rekombinant exprimierten ORF2-Genprodukts durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Abgebildet ist ein 7,5%iges, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Aufreinigung des rekombinant exprimierten ORF2-Genprodukts. Während des unter 2.2.21.3 beschriebenen Aufreinigungsprozesses wurden nach jedem Schritt entsprechende Zellsuspensionen bzw. Überstände entnommen und in SDS-Probenpuffer lysiert. Aufgetragen sind Proteinproben rekombinanter *E. coli* BL21(DE3)[pAP/act^Q] vor und nach Induktion mit IPTG (Bahn 1 und 2), der Überstand nach Aufschluss der Zellen mit Ultraschall (Bahn 3) sowie der Überstand nach Extraktion der *inclusion bodies* mit 8 M Harnstoff (Bahn 4). Bei den Eluaten 1-4 handelt es sich um Fraktionen der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie nach Behandlung mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (5 mM Imidazol: Bahn 5 und 6; 20 mM Imidazol: Bahn 7; 60 mM Imidazol: Bahn 8). Die Eluate 5.1-5.4 stammen aus der Behandlung mit 250 mM Imidazol; die Hauptfraktion des rekombinanten Proteins ist in Eluat 5.2 zu finden. Auf der linken Seite sind die Längen und Positionen der Markerproteine angegeben.

Bei dem ORF3-Genprodukt konnte die Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie nicht erfolgreich angewendet werden, da keine Bindung des rekombinant exprimierten Proteins an die Matrix erfolgte. Möglicherweise war in den 226 kDa großen Protein der oligo-Histidintag aufgrund ungünstiger Faltung maskiert, so dass keine Bindung an die Affinitäts-Matrix stattfinden konnte. Aus diesem Grund wurde bei ORF3 eine fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid (Kapitel 2.2.21.4) zur Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins angewendet. Die Proben wurden im Anschluss einer Dialyse gegen PBS unterzogen, um das bei einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese störende Guanidiniumhydrochlorid zu entfernen. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Abbildung 16). Zur Immunisierung von Hühnern wurde die 6 M GuaHCl-Fraktion eingesetzt.

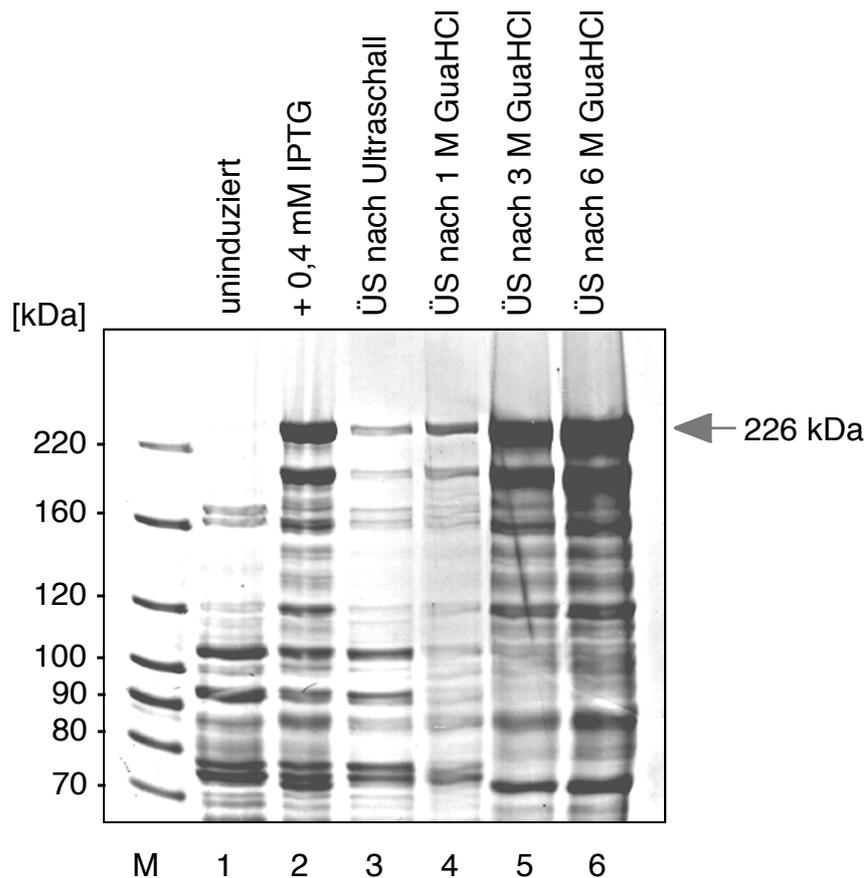


Abbildung 16: Aufreinigung des rekombinant exprimierten ORF3-Genprodukts durch fraktionierende Extraktion mit Guanidiniumhydrochlorid

In einem 6%igen, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel wurden die Fraktionen aus der Aufreinigung des rekombinant exprimierten ORF3-Genprodukts nach Lysis in SDS-Probenpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. In Bahn 1 bzw. 2 sind rekombinante *E. coli* BL21(DE3)[pAP/aci^Q] vor bzw. nach Induktion mit IPTG aufgetragen; in Bahn 3 ist der Überstand nach Ultraschallbehandlung zu sehen. Durch Behandlung mit steigenden GuaHCl-Konzentrationen (1 M GuaHCl: Bahn 4; 3 M GuaHCl: Bahn 5 sowie 6 M GuaHCl: Bahn 6) erfolgte der Aufschluss der *inclusion bodies* und die Freisetzung des rekombinant exprimierten ORF3-Genprodukts; es sind jeweils die Überstände nach Zentrifugation aufgetragen. Auf der linken Seite sind die Positionen des Längenstandards (Bench MarkTM Protein Ladder) angezeigt.

3.7.2 Gewinnung von Antikörpern

Die rekombinant exprimierten Genprodukte von ORF2 bzw. ORF3 wurden als Antigen zur Immunisierung von Hühnern verwendet (siehe Kapitel 2.2.22); dabei wurden jeweils 200 – 400 µg des aufgereinigten Proteins in einem 1:1-Verhältnis mit Freundschem Adjuvanz eingesetzt. Die Gewinnung der Antikörper aus dem Eigelb ist in Kapitel 2.2.22 beschrieben. Nach einer zweiten bzw. dritten Immunisierung konnten erfolgreich Antikörper isoliert werden, die mit dem jeweiligen rekombinanten Protein reagierten.

In Abbildung 17 ist dies für ORF2 dargestellt. In dem mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A) ist eine Bande zu sehen, deren Position im Bereich der für ORF2 erwarteten Größe von 53,8 kDa lag; diese Bande ist in der Immun-Blot-Analyse mit Präimmenserum des entsprechenden Huhns (B) nicht nachzuweisen. Wird dagegen das auf einer Membran immobilisierte rekombinante Protein einem Immun-Blot mit dem hergestellten ORF2-Antikörper unterworfen, ist eine deutlich Bande in dem entsprechenden Größenbereich zu erkennen (C). Dies zeigt, dass der hergestellte Antikörper spezifisch mit

dem rekombinanten Protein reagiert; die Tatsache, dass keine Reaktion beim Präimmunserum stattfand, bestätigt, dass das Huhn keine kreuzreaktiven Antikörper besaß.

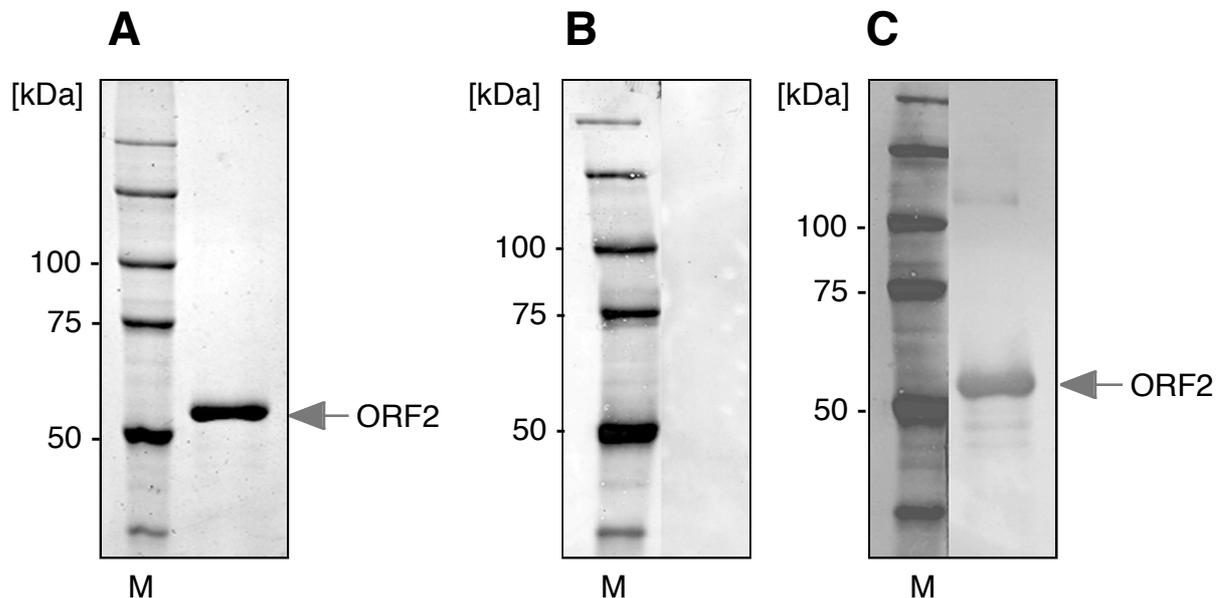


Abbildung 17: Nachweis der Spezifität des ORF2-Antikörpers gegen das rekombinant exprimierte Protein

50 μ l rekombinant exprimiertes ORF2-Protein aus dem Eluat 5.2 (Abbildung 15) wurden in derselben Menge 2 x SDS-Probenpuffer lysiert. Jeweils 10 μ l der Proteinprobe wurden in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ein Gelabschnitt wurde einer Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau unterzogen (A); die Proteine des restlichen Gels wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Präimmunserum (B) bzw. mit dem gegen ORF2 gerichteten Antikörper (C). Die Positionen der Markerproteine sind auf der linken Seite angegeben.

Für ORF3 ist der analoge Nachweis in Abbildung 18 dargestellt; hier zeigte sich ebenfalls nur in der Immun-Blot-Analyse mit dem ORF3-Antikörper eine positive Reaktion (C), die neben der Hauptbande bei 226 kDa aus zahlreichen Banden geringeren Molekulargewichts bestand. Diese Banden waren schon zuvor in Coomassie-Brilliant-Blau-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen nach Induktion der Proteinexpression in *E. coli*-Zellen zu sehen (vgl. Abbildung 14B). Die positive Reaktion mit dem ORF3-Antikörper bestätigt, dass es sich hierbei um Teile des ORF3-Genproduktes handelt.

3.8 Vergleichende Untersuchungen zur Überexpression von ORF2 und ORF3 in *L. major*

Im folgenden sollte die Wirkung einer Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 in *L. major* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden beide Gene in einen Plasmidvektor eingefügt, der eine stadienspezifische Überexpression in rekombinanten Leishmanien ermöglichen sollte.

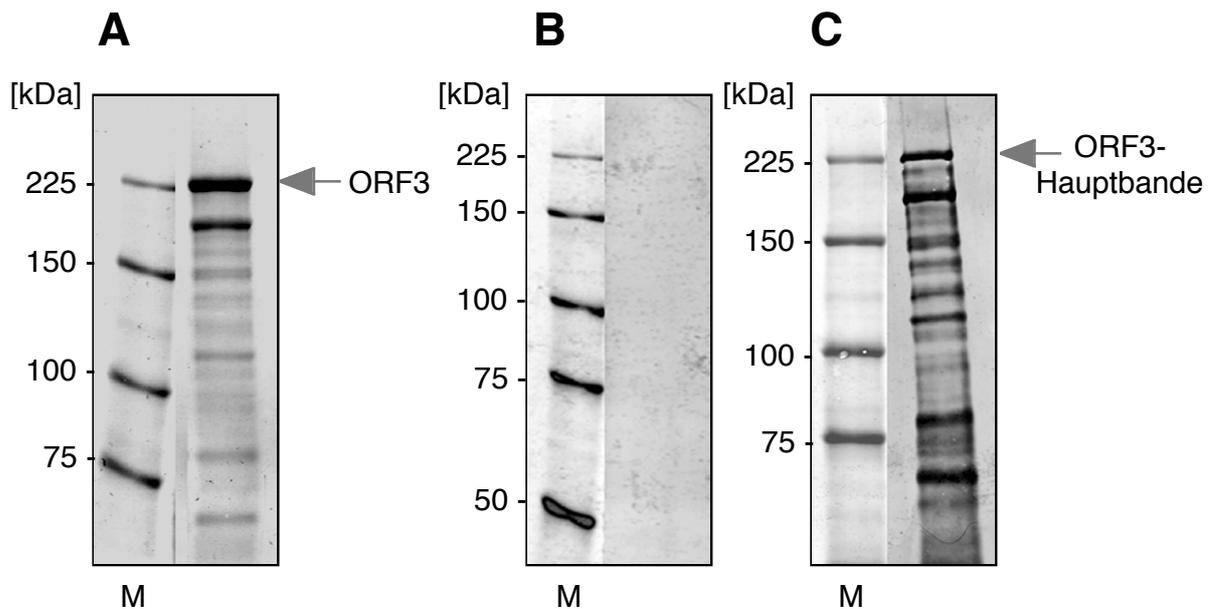


Abbildung 18: Nachweis der Spezifität des ORF3-Antikörpers gegen das rekombinant exprimierte Protein

50 µl rekombinant exprimiertes ORF3-Protein, das aus der 6 M GuaHCl-Fraktion nach Dialyse stammte (siehe Abb. 16), wurde in 50 µl SDS-Probenpuffer lysiert. Nach Auftrennung von 10 µl (A) bzw. 2 µl (B und C) der Proteinprobe in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (A) bzw. der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der anschließende immunologische Nachweis mit Prämumserum (B) bzw. dem ORF3-spezifischen Antikörper (C). Die Hauptbande des rekombinant exprimierten Proteins liegt bei 226 kDa; bei den restlichen Banden handelt es sich um Teile des ORF3-Genprodukts. Auf der linken Seite sind die Positionen des Längenstandards (Perfect Protein™ Marker) angegeben.

3.8.1 Klonierung von ORF2 und ORF3 in das Expressionsplasmid pIRSAT-3 und Herstellung rekombinanter *L. major* durch stabile Integration

Für die folgende Klonierung wurde ORF2 zunächst aus dem Plasmid pJC45 (Kapitel 3.7) durch Restriktionsverdau mit *Nde* I und *Bam* HI wieder herausgeschnitten. Nach einer Klenow-Auffüllreaktion (Kapitel 2.2.14.3) zur Herstellung glatter Enden konnte eine Ligation in den mit *Sma* I vorbereiteten pIRSAT-3-Vektor stattfinden. Im Fall von ORF3 erfolgte eine Amplifikation mittels PCR aus dem Cosmid pcosVL-1 unter Verwendung der in Kapitel 2.1.9 aufgeführten spezifischen Oligonukleotide. Nach Verdau des PCR-Produkts mit *Eco* RV und *Xba* I an den durch die Primer eingefügten Schnittstellen konnte die Klonierung in den mit *Sma* I und *Xba* I geschnittenen Vektor erfolgen.

Das Expressionsplasmid pIRSAT-3 ist in Abbildung 19 dargestellt. Es handelt sich um ein Derivat des Plasmids pIR1-SAT, das uns von S. Beverley (Washington University Medical School, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde. Zur Herstellung von pIRSAT-3 wurde eine *Hind* III-Schnittstelle aus dem Originalplasmid entfernt; dies erfolgte durch Verdau mit *Hind* III, eine Klenow-Auffüllreaktion zur Herstellung glatter Enden und eine abschließende Religation (J. Clos, unveröffentlicht). Beide *open reading frames* wurden separat mit Hilfe der oben erläuterten Klonierungsstrategien in die amastigoten-spezifische Expressions-*site* des Plasmids eingefügt. Die Expression in amastigoten Stadien wird über 3'-untranslatierte Regionen der Cysteinproteinase 2 aus *L. mexicana mexicana* reguliert, einer Cysteinproteinase, die ausschließlich in Amastigoten der genannten *Leishmania*-Spezies gebildet wird. Nach der Transfektion erfolgt eine Integration des mit *Swa* I linearisierten

Plasmids in das Genom der Leishmanien. Dies geschieht durch homologe Rekombination mit anschließendem Genaustausch in die für die 18S rRNA kodierende Region, deren homologe Sequenzen als flankierende Bereiche im linearisierten Plasmid vorhanden sind (in der Abbildung mit L.m.SSU bezeichnet). Da die Effizienz des Genaustausches beim Einsatz einer geringen DNA-Menge höher ist (Cruz & Beverley, 1990), wurden für die Transfektionsexperimente nur 2 µg linearisierte DNA verwendet.

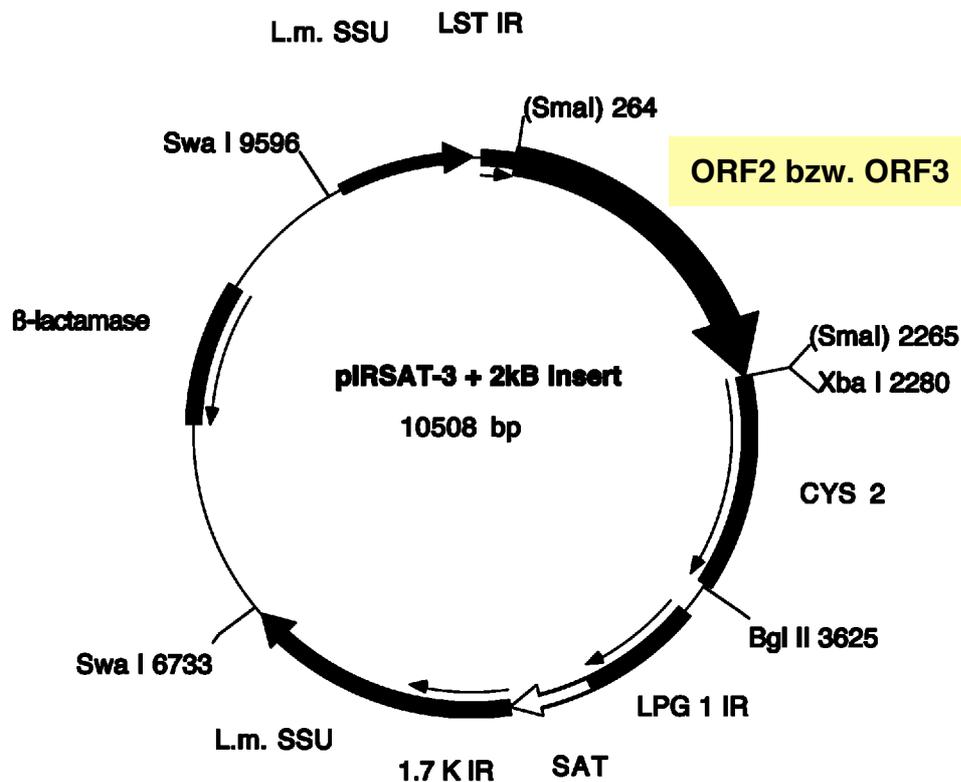


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pIRSAT-3

Die Klonierung von ORF2 bzw. ORF3 erfolgte über die *Sma* I- bzw. *Sma* I/*Xba* I-Schnittstellen in die amastigotenspezifische Expressions-site von pIRSAT-3. Amastigotenspezifische Expression wird durch 3'-UTR-Sequenzen der Cysteinproteinase 2 (CYS 2) aus *L. mexicana mexicana* gewährleistet, einem Enzym, das nur in amastigoten Stadien dieser Leishmanienspezies gebildet wird. Die Integration in das *L. major*-Genom geschieht über homologe Rekombination des mit *Swa* I linearisierten Plasmids in die für die 18S rRNA kodierende Region. Die entsprechenden homologen Bereiche auf dem Plasmid sind mit L.m.SSU bezeichnet. Die rekombinanten Leishmanien erhalten das auf dem Plasmid lokalisierte SAT-Gen (SAT = Streptothricin-Acetyl-Transferase), das Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin verleiht. Für die Selektion in Bakterien dient das für die Ampicillinresistenz verantwortliche β -Lactamase-Gen.

Den rekombinanten Leishmanien wird durch das auf dem Plasmid lokalisierte SAT-Gen (SAT = Streptothricin-Acetyl-Transferase) Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin verliehen. Nach Selektion der rekombinanten *L. major* sollte die Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 im Western-Blot überprüft werden.

3.8.2 Analyse rekombinanter *L. major* auf Überexpression von ORF2 bzw. ORF3

Eine Erhöhung der Umgebungstemperatur sowie das saure Milieu im Phagolysosom der Makrophagen wirken *in vivo* als Signale für die Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten (Zilberstein & Shapira, 1994). Im Gegensatz zu *L. donovani* lässt sich dieser Umwandlungsprozess für *L. major* nicht *in vitro* durchführen

Die Klonierung von ORF2 bzw. ORF3 erfolgte in die amastigotenspezifische Expressions-*site* von pIRSAT-3. Zur Überprüfung der Überexpression in den rekombinanten Leishmanien wurden *L. major* WT, *L. donovani* WT und *L. major* [pIR/ORF2] bzw. *L. major* [pIR] und *L. major* [pIR/ORF3] einerseits bei 25°C kultiviert; eine zweite Kultur wurde für 24 h einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt. Diese kurzfristige Temperaturerhöhung bewirkt jedoch keine Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten. Aus diesem Grund geben die in den folgenden Immun-Blot-Analysen nachgewiesenen Expressionsmuster nicht die von Amastigoten, wie sie z.B. während einer Mauspassage auftreten, wieder. Die oben angeführten Leishmanien wurden in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ μ l in SDS-Probenpuffer lysiert; jeweils 1×10^7 Zellen wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer anschließenden Immun-Blot-Analyse (Kapitel 2.2.26) unterzogen.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis für ORF2 dargestellt. Bei *L. major* [pIR/ORF2] ist im Immun-Blot (Abb. 20B, Bahn 5 und 6) ein Signal bei 53,8 kDa zu erkennen, das weder bei *L. major* WT (Bahn 1 und 2) noch bei *L. donovani* WT (Bahn 3 und 4) auftritt. Im Fall von ORF3 (Abbildung 21) zeigt sich im Immun-Blot ausschließlich bei *L. major* [pIR/ORF3] (Abbildung 21B, Bahn 3 und 4) das charakteristische Signal bei 226 kDa, während bei *L. major* [pIR] (Bahn 1 und 2) nichts nachzuweisen ist (*L. donovani* WT wurde in diesem Experiment nicht getestet).

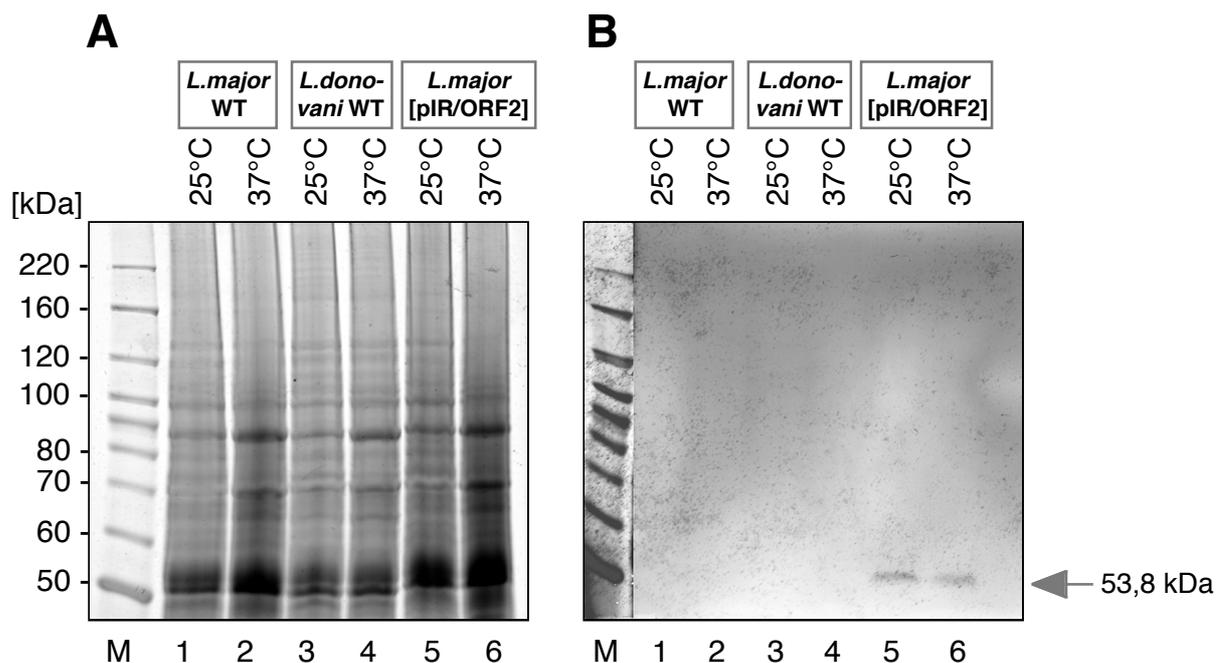


Abbildung 20: Nachweis der ORF2-Überexpression in rekombinanten *L. major*

In einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel (A) wurden jeweils 1×10^7 Promastigote folgender rekombinanter Leishmanien nach Lysis in SDS-Probenpuffer aufgetrennt: *L. major* WT (Bahn 1 und 2), *L. donovani* WT (Bahn 3 und 4) sowie *L. major* [pIR/ORF2] (Bahn 5 und 6). Dabei handelte es sich einerseits um Zellen, die bei 25°C kultiviert wurden (Bahn 1, 3 und 5) während in den restlichen Bahnen Proteinproben von Zellen nach 24-stündiger Hitzebehandlung bei 37°C aufgetragen wurden. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit dem ORF2-spezifischen Antikörper (B). Das in (A) dargestellte, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel dient als Kontrolle für die Auftragung identischer Proteinmengen; auf der linken Seite sind die durch Markerproteine definierten Molekulmassen angegeben.

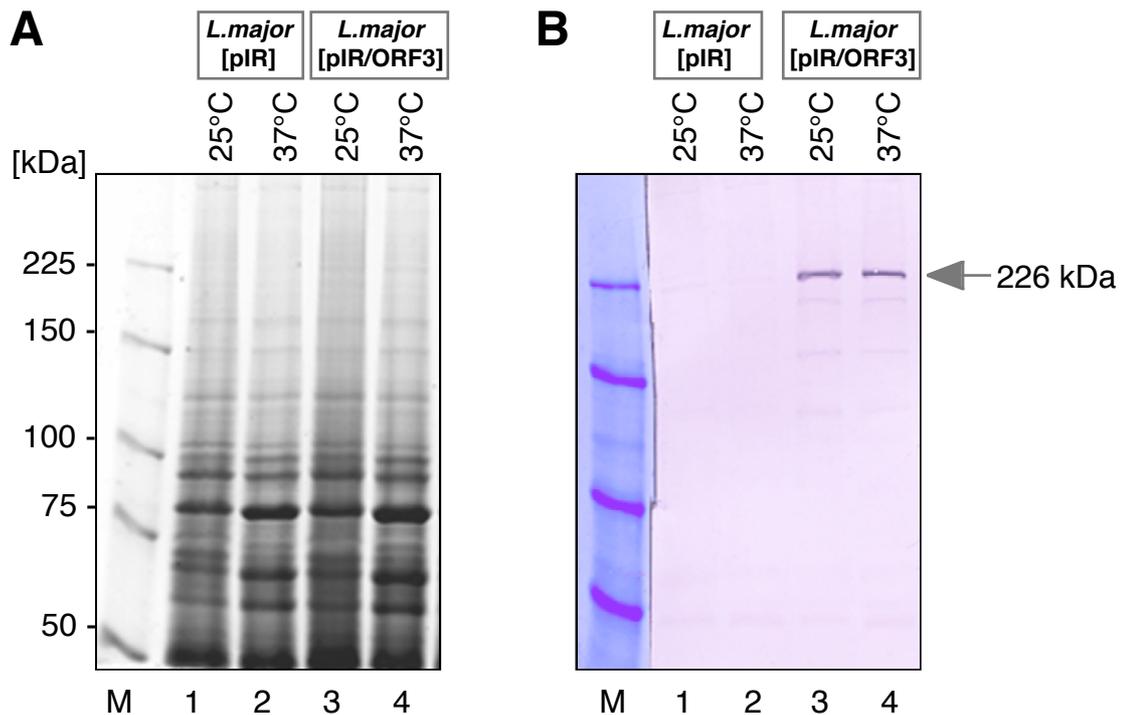


Abbildung 21: Nachweis der ORF3-Überexpression in rekombinanten *L. major*

Promastigote *L. major* [pIR] (Bahn 1 und 2) bzw. *L. major* [pIR/ORF3] (Bahn 3 und 4) wurden bei 25°C kultiviert (Bahn 1 und 3) bzw. für 24 h bei 37°C inkubiert (Bahn 2 und 4). Pro Ansatz wurden 1×10^7 Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert und in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (A). Im Anschluss wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran fixiert; der immunologische Nachweis erfolgte unter Verwendung des ORF3-spezifischen Antikörpers (B). Die Positionen der Markerproteine sind auf der linken Seite angegeben; das in (A) dargestellte, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Polyacrylamidgel soll die Auftragung annähernd gleicher Proteinmengen verdeutlichen.

Die Ergebnisse dieser Analysen weisen eine Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 in den rekombinanten *L. major* nach; als Kontrolle für die Auftragung identischer Proteinmengen dienen die in Abb. 20A und Abb. 21A dargestellten, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgele.

3.8.3 *In vivo*-Selektion von *L. major* [pIR/ORF2] und *L. major* [pIR/ORF3]

Die ORF2- bzw. ORF3-überexprimierenden *L. major* sollten im folgenden Experiment zur Klärung der Frage verwendet werden, welches dieser beiden Kandidatengene für den Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde eine weitere *in vivo*-Selektion durchgeführt, die in Abbildung 22 schematisch dargestellt ist. Eine Mischung rekombinanter *L. major*, bestehend zu gleichen Teilen aus *L. major*, die nur mit dem Vektor pIRSAT-3 transfiziert wurden (*L. major* [pIR]) sowie *L. major* [pIR/ORF2] und *L. major* [pIR/ORF3] wurde zur Infektion von insgesamt 4 BALB/c-Mäusen verwendet; dabei wurden je 5×10^7 Leishmanien in einen Hinterfuß der Mäuse inokuliert. Nach 10-wöchiger Inkubationszeit wurden die Milzen entnommen und in modifiziertem M199-Medium homogenisiert. Die Suspension wurde bei 25°C kultiviert. Nach dem Anwachsen von Promastigoten wurden diese zur Isolierung von Einzelklonen bei limitierender Verdünnung in Mikrotiterplatten eingesät (Kapitel 2.2.7). Aus je 50 Einzelklonen pro Milz-Homogenat wurde genomische DNA hergestellt (Kapitel 2.2.9.2).

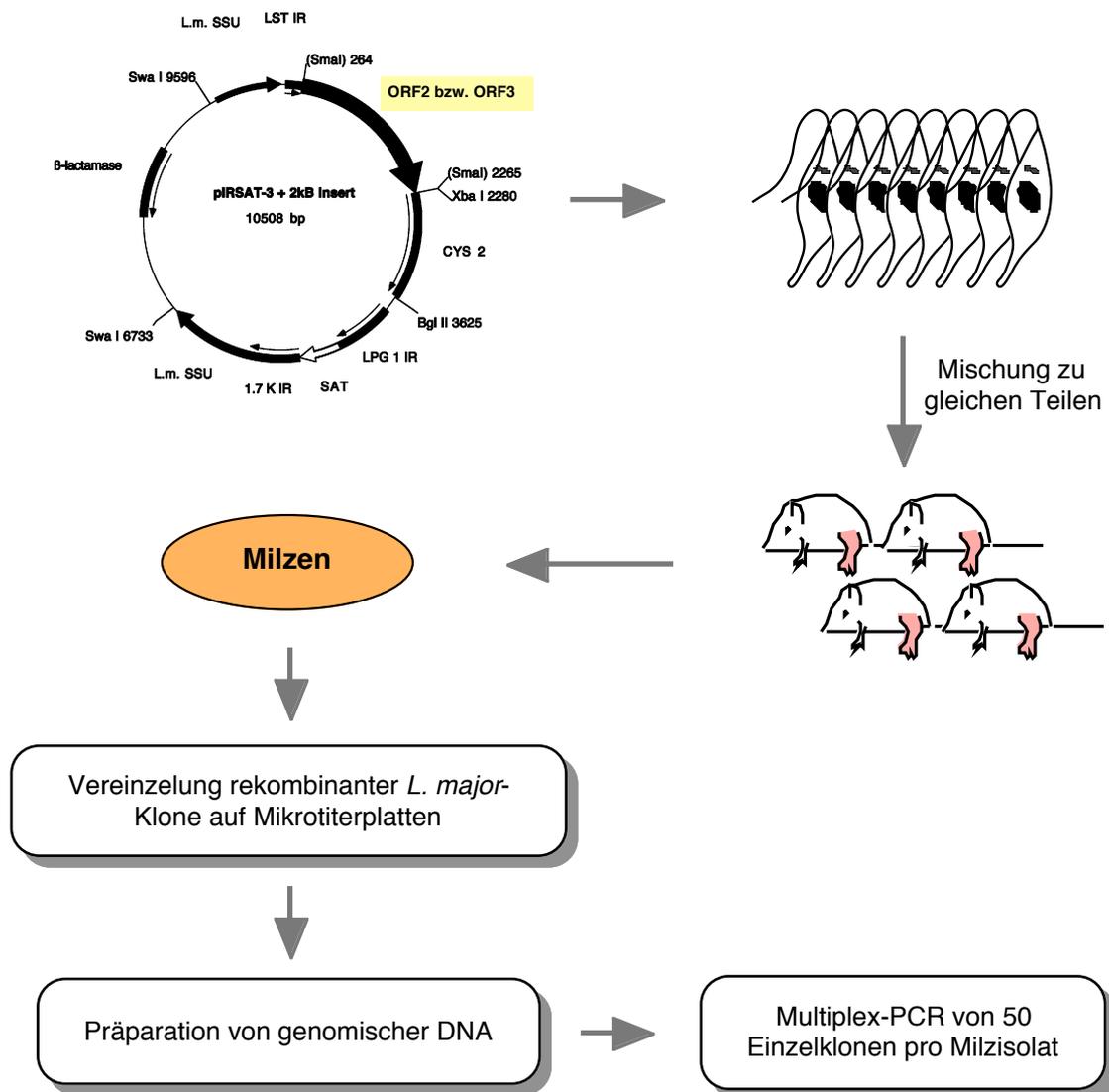


Abbildung 22: Schematische Darstellung der vergleichenden *in vivo*-Selektion von *L. major* [pIR], *L. major* [pIR/ORF2] sowie *L. major* [pIR/ORF3]

Nach individueller Transfektion von *L. major* mit pIRSAT-3 (Kontrollansatz), pIR/ORF2 bzw. pIR/ORF3 wurden die rekombinanten Parasiten zu gleichen Teilen gemischt. 5×10^7 Promastigote dieser Mischung wurden in je einen Fußballen von 4 BALB/c-Mäusen inokuliert. Die Reisolierung der Parasiten aus dem Milzgewebe erfolgte nach 10-wöchiger Inkubationsdauer. Die Leishmanien wurden zur Isolierung einzelner Klone in Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Präparation von genomischer DNA erfolgte die Identifizierung der rekombinanten *L. major* durch eine Multiplex-PCR-Analyse.

Die Identifizierung der rekombinanten Leishmanien erfolgte mit Hilfe einer Multiplex-PCR (Kapitel 2.2.15.1), bei der ein Oligonukleotidmix, bestehend aus einem 3'-Primer sowie 3 verschiedenen 5'-Primern, verwendet wurde. Es entstanden spezifische Fragmente für pIR (722 bp), ORF2 (1011 bp) sowie ORF3 (1480 bp), wie in Abbildung 23A gezeigt.

Das Ergebnis der Multiplex-PCR ist in Abbildung 23B exemplarisch dargestellt. In 200 untersuchten Klonen ließ sich ausschließlich das für ORF3 charakteristische Fragment von 1480 bp nachweisen. Aus diesem sehr eindeutigen Ergebnis geht hervor, dass ORF3 für den Effekt auf den Milztropismus rekombinanter *L. major* verantwortlich ist. Aus diesem Grunde

wird im folgenden für ORF3 die Bezeichnung LdSTF1 verwendet (*Leishmania donovani* spleen tropism factor 1).

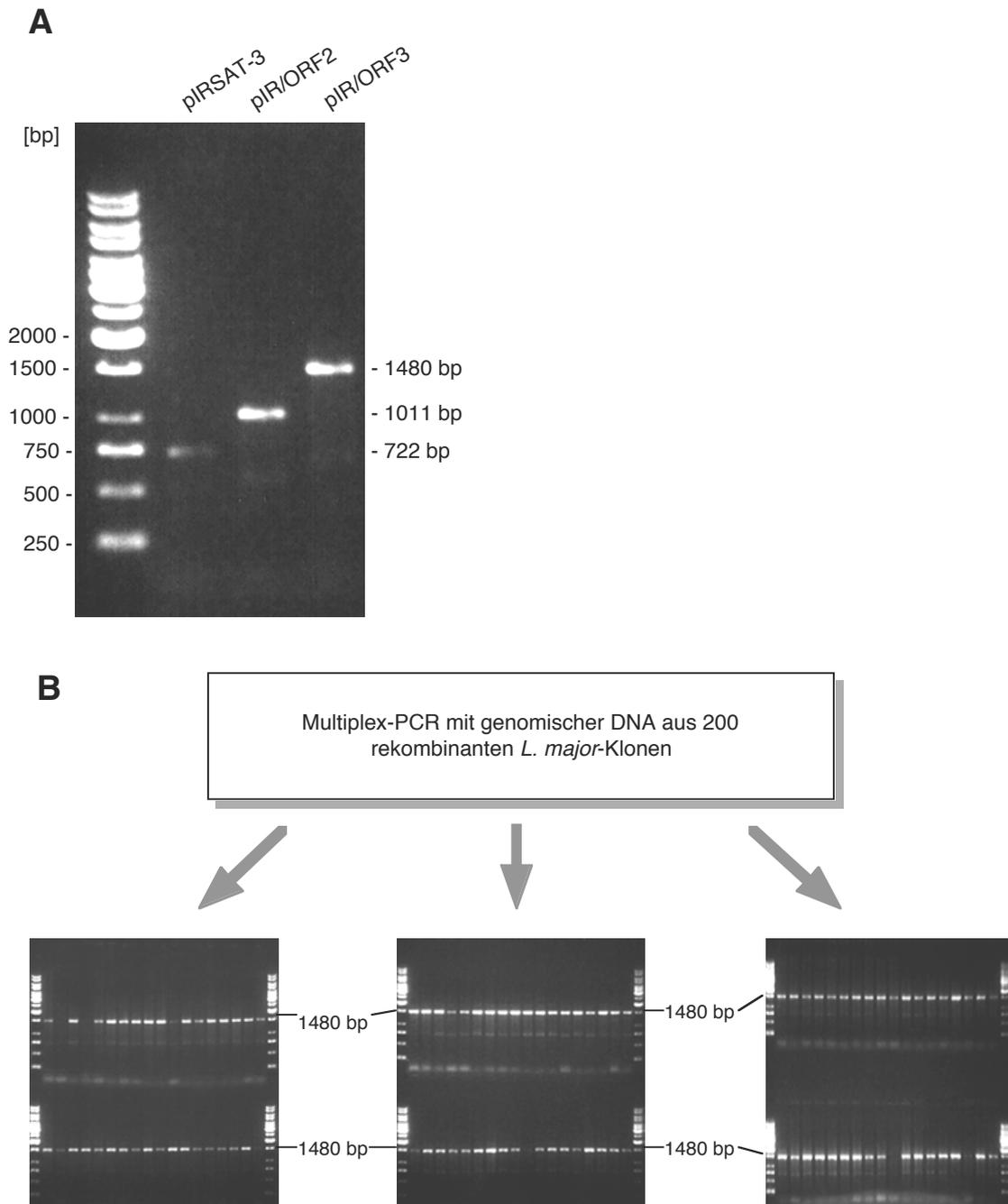


Abbildung 23: Multiplex-PCR zur Identifizierung von *L. major* [pIR], *L. major* [pIR/ORF2] und *L. major* [pIR/ORF3] nach der *in vivo*-Selektion

Die Multiplex-PCR wurde mit einem Oligonukleotidmix, bestehend aus einem 3'-Primer und 3 verschiedenen 5'-Primern durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein 1%iges, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (A) mit den spezifischen Banden für pIRSAT-3 (722 bp), pIR/ORF2 (1011 bp) und pIR/ORF3 (1480 bp); als Längenstandard diente der 1 kb-Marker. Das Ergebnis der Multiplex-PCR-Analyse von 200 rekombinanten *L. major*-Klonen ist exemplarisch anhand von drei 1%igen Agarosegelen dargestellt (B). Die ORF3-spezifische Bande ist jeweils markiert.

3.9 Charakteristika von LdSTF1

Die wenigen bisher bekannten Eigenschaften von LdSTF1 sind in Tabelle 3 zusammengefasst; dabei handelt es sich um Ergebnisse einer Datenbankrecherche unter Verwendung der folgenden Programme:

- PROSITE Database of protein families and domains (<http://www.expasy.org/prosite>)
- Motif Scan in a Protein Sequence (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>)
- EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>)

Bis auf einige allgemeine Daten zum Molekulargewicht, zum isoelektrischen Punkt sowie zu Alanin- bzw. Cystein-reichen Regionen waren keine weiteren Informationen, beispielsweise über spezielle Motive, zu erhalten. Wie schon in Abschnitt 3.5 (Tabelle 2) aufgeführt, ergab eine BLAST-P-Recherche lediglich eine nicht-signifikante Übereinstimmung zu einem hypothetischen Protein in der intergenischen Region ume3-hda 1 aus *L. major*. Aufgrund dieser nur spärlichen Informationen wurden im folgenden Untersuchungen durchgeführt, die LdSTF1 und dessen Genprodukt weiter charakterisieren sollten.

Tabelle 3: Charakteristika des LdSTF1-Genprodukts

Molekulargewicht	225851 g/mol
Isoelektrischer Punkt	pH 5,9
Alanin-reiche Regionen	2
Cystein-reiche Regionen	1
Homologien zu bereits bekannten Proteinen	keine
Funktion	unbekannt

Die Aminosäuresequenz des LdSTF1-Genprodukts wurde unter Verwendung der im Text beschriebenen Datenbanken auf allgemeine Eigenschaften, Motive sowie Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion untersucht.

3.9.1 Bestimmung der Genkopienzahl

Ein charakteristisches Merkmal der Genome der Trypanosomatidae besteht in dem häufigen Vorkommen von Genen in mehrfacher Kopienzahl, sogenannten *multicopy genes*, die entweder tandemartig hintereinander angeordnet oder auf verschiedene Chromosomenabschnitte verteilt sein können (Swindle & Tait, 1996). Im Gegensatz dazu gibt es *single copy genes*, die nur in einfacher Kopie vorliegen. Die Anzahl der Genkopien ist beispielsweise für die Herstellung von Gen-*knockouts* von Bedeutung, da die Ausschaltung eines in nur einer Kopie vorliegenden Gens eine mögliche Strategie zur Funktionsanalyse des betreffenden Genprodukts darstellen kann, während dies bei Genen, die in hoher Kopienzahl vorliegen und auf verschiedene Chromosomenabschnitte verteilt sind, kaum durchführbar ist.

Durch Southern-Blot-Analyse (Kapitel 2.2.19.1) sollte die Anzahl der Genkopien von LdSTF1 ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden 20 µg genomische DNA von *L. donovani* mit 9 verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt, die entweder keine, eine

oder zwei Schnittstellen im Bereich der LdSTF1-Gensonde aufwiesen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abbildung 24A) wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P -markierten LdSTF1-Sonde hybridisiert.

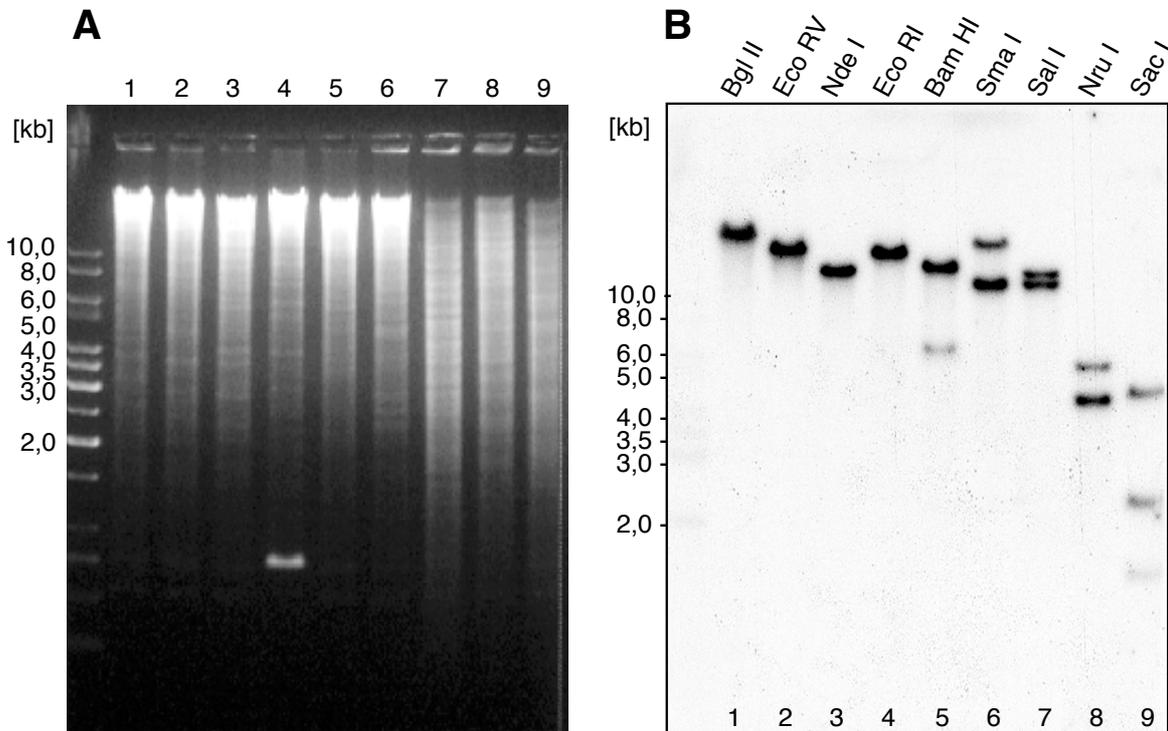


Abbildung 24: Bestimmung der Genkopienzahl von LdSTF1 durch Southern-Blot-Analyse

20 μg chromosomale DNA von *L. donovani* wurden einem Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen, die keine Schnittstelle im LdSTF1-Gen besitzen (*Bgl* II, *Eco* RV, *Nde* I; Bahn 1-3), unterzogen. Des weiteren erfolgte ein Verdau mit Restriktionsenzymen, die einmal im LdSTF1-Gen schneiden (*Eco* RI, *Bam* HI, *Sma* I, *Sal* I; Bahn 4-7) bzw. mit *Nru* I und *Sac* I (Bahn 8 und 9), die 2 Schnittstellen im LdSTF1-Gen aufweisen. Die Restriktionsansätze wurden in einem 0,7%igen Agarosegel (A) über Nacht bei 2 V/cm aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer ^{32}P -markierten LdSTF1-Sonde über Nacht hybridisiert; der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie (B). Als DNA-Längenstandard wurde der 1 kb-Marker verwendet.

Das Ergebnis der Autoradiographie ist in Abbildung 24B dargestellt. Bei *Bgl* II, *Eco* RV und *Nde* I (Bahn 1-3) handelt es sich um Restriktionsendonukleasen, die keine Schnittstelle im LdSTF1-Gen besitzen. Bei einem *single copy*-Gen wäre demnach nur eine Bande zu erwarten, die mit der LdSTF1-Sonde reagiert; dies ist auch der Fall.

Eco RI, *Bam* HI, *Sma* I und *Sal* I (Bahn 4-7) schneiden jeweils einmal in LdSTF1; aus diesem Grund sind beim Vorliegen von nur einer Genkopie 2 markierte Banden zu erwarten. Da aus der Sequenzanalyse von pcosVL-1 (Kapitel 3.5) zusätzlich Informationen über die LdSTF1-benachbarten DNA-Abschnitte vorliegen, können neben der Anzahl auch Voraussagen über die Länge der erwarteten Banden gemacht werden. Bei *Eco* RI (Bahn 4), das neben der Schnittstelle im LdSTF1-Gen noch eine zusätzliche auf dem Cosmid besitzt, wird eine Bande von 20212 bp sowie eine weitere unbekannter Größe erwartet. Die Tatsache, dass auf dem Autoradiogramm nur eine Bande zu sehen ist, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass es sich hierbei um einen Doppelbande zweier ähnlich großer Fragmente handelt. Weitere Banden mit vorhersagbarer Länge treten bei *Bam* HI (Bahn 5, 6022 bp) sowie bei *Sal* I (Bahn 7, 11903 bp) auf.

Nru I und *Sac II* weisen 2 Schnittstellen im LdSTF1-Gen auf; die Zahl der erwarteten markierten Banden erhöht sich somit für den Fall eines *single copy*-Gens auf drei. Bei *Nru I* (Bahn 8) betragen die aufgrund der Sequenzinformation vorhergesagten Größen der Banden 5140 bp, 4267 bp sowie 516 bp; die letztere ist vermutlich wegen ihrer zu geringen Größe auf dem Autoradiogramm nicht mehr sichtbar. *Sac I* (Bahn 9) lässt Banden von 4445 bp, 2238 bp und 1441 bp erwarten, die auch alle auf dem Röntgenfilm erscheinen.

Aus dem Ergebnis dieser Southern-Blot-Analyse geht demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit hervor, dass es sich bei LdSTF1 um ein *single copy*-Gen handelt.

Zur chromosomalen Lokalisation ergab eine Recherche in der Datenbank des *Leishmania*-Genomprojekts (<http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp>), dass das LdSTF1-Gen möglicherweise auf einem der während einer Pulsfeld-Gelelektrophorese co-migrierenden Chromosomen 32 und 33 gelegen ist. Das ca. 36 Mb umfassende *Leishmania*-Genom besteht aus insgesamt 36 Chromosomen, von denen die Chromosomen 32 und 33 eine Größe von jeweils 1,75 Mb aufweisen (Wincker *et al.*, 1996). Aufgrund der vorliegenden Daten wurde auf eigene Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisation von LdSTF1 im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

3.9.2 Untersuchung der Expressionskinetik

Wie bereits in Abschnitt 3.8.2 erwähnt, lässt sich *L. major* im Gegensatz zu *L. donovani* nicht *in vitro* zu Amastigoten differenzieren. Da jedoch das LdSTF1-Gen ursprünglich aus einer *in vivo*-Selektion amastigoter Stadien hervorging, war für die Untersuchung der Expressionskinetik des LdSTF1-Genprodukts eine Analyse in rekombinanten *L. donovani* erforderlich. Zu diesem Zweck wurden *L. donovani*-Kulturen mit pIRSAT-3, mit pIR/LdSTF1 bzw. mit pcosVL-1 transfiziert und nach abgeschlossener Selektion einer *in vitro*-Differenzierung zu axenischen Amastigoten (Kapitel 2.2.3) unterworfen.

Rekombinante *L. donovani* wurden bei 25°C (pH 7,0) kultiviert und nachfolgend einer 24-stündigen Hitzebehandlung bei 37°C (pH 7,0) ausgesetzt. Durch eine anschließende 3-tägige Kultivierung bei 37°C (pH 5,5) konnte die Differenzierung zu axenischen Amastigoten erzielt werden; aus jeder der drei Kulturen wurden Leishmanien in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/□l in SDS-Probenpuffer lysiert. Jeweils 1×10^7 Zellen wurden in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer anschließenden Immun-Blot-Analyse unterzogen.

Abbildung 25 zeigt ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A) sowie den dazugehörigen Immun-Blot (B); der Nachweis erfolgte mit dem LdSTF1-spezifischen Antikörper (Kapitel 3.7.2). Bei *L. donovani* [pIR] ist in keiner der drei Proben eine LdSTF1-Expression nachweisbar (Bahn 1-3); die Expression dieses *single copy*-Gens ist in Wildtypzellen bzw. in nur mit dem Plasmidvektor transfizierten Zellen vermutlich zu schwach, um im Immun-Blot nachgewiesen werden zu können. Bei den überexprimierenden *L. donovani* [pIR/LdSTF1] ist bei 25°C und neutralem pH-Wert eine nachweisbare Expression festzustellen (Bahn 4); diese nimmt jedoch nach 24-stündigem Hitzeschock bei 37°C stark ab (Bahn 5), bis schließlich im weiteren Verlauf der *in vitro*-Differenzierung nach 3 Tagen bei 37°C und pH 5,5 keine LdSTF1-Expression mehr nachweisbar ist (Bahn 6). Anders dagegen verhält es sich bei den mit dem ursprünglichen Cosmid pcosVL-1 transfizierten *L. donovani*. Hier ist das LdSTF1-Genprodukt in allen Stadien, d.h. sowohl in Promastigoten als auch in axenischen Amastigoten in annähernd gleicher Menge zu finden (Bahn 7-9). Möglicherweise spielen die natürlichen flankierenden Sequenzen des LdSTF1-

Gens, die auf dem Cosmid noch vorhanden sind, eine entscheidende Rolle für die Expression, insbesondere im Amastigotenstadium. Obwohl das Expressionsplasmid pIRSAT-3 eine stadienspezifische Überexpression ermöglichen soll, reicht diese in den Amastigoten möglicherweise nicht aus, um die natürlichen Überexpressionsraten, wie sie beim Vorhandensein von pcosVL-1 vorliegen, zu erzielen. Bei einem Vergleich der Ergebnisse von Experimenten mit rekombinanten Leishmanien, die mit pcosVL-1 bzw. mit pIR/LdSTF1 transfiziert wurden, muss daher dieser Unterschied beachtet werden.

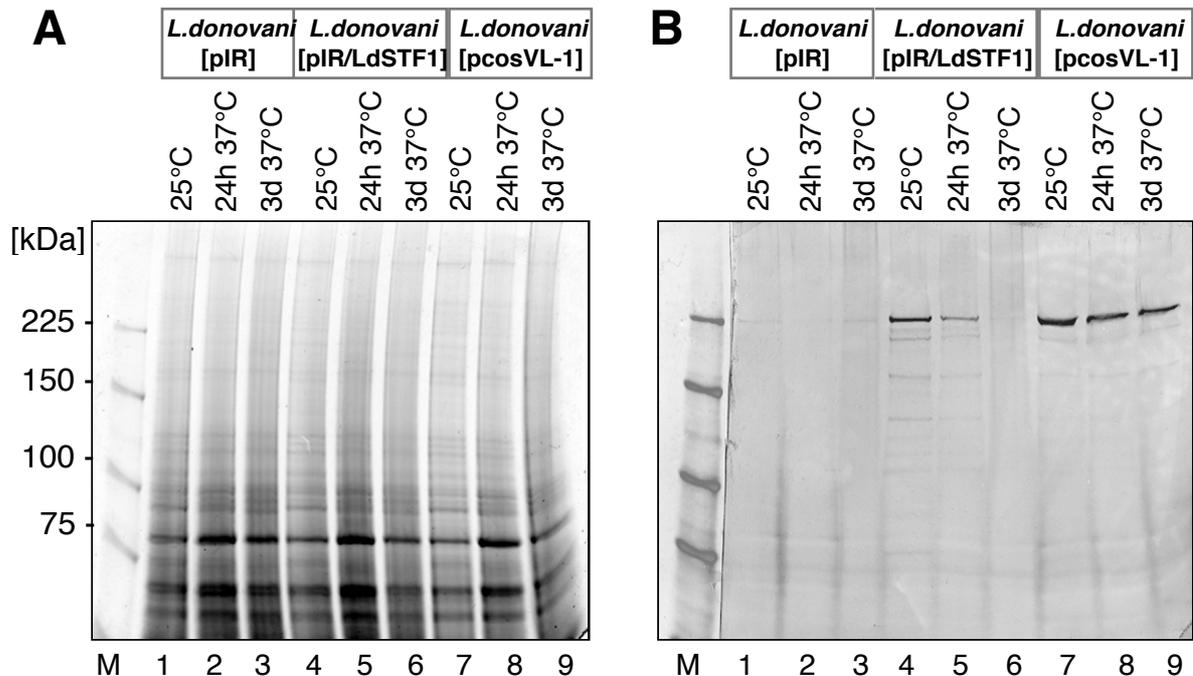


Abbildung 25: Expressionskinetik des LdSTF1-Genprodukts

Dargestellt ist ein 6%iges, mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A), in dem jeweils 1×10^7 in SDS-Probenpuffer lysierte Zellen der folgenden rekombinanten *L. donovani* aufgetrennt wurden: *L. donovani* [pIR] (Bahn 1-3), *L. donovani* [pIR/LdSTF1] (Bahn 4-6) sowie *L. donovani* [pcosVL-1] (Bahn 7-9). Die Ansätze entstammten einer 25°C-Kultur bei pH 7,0 (Bahn 1, 4 und 7), bzw. sie wurden für 24 h bei neutralem pH-Wert einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt (Bahn 2, 5 und 8). Zur *in vitro*-Differenzierung amastigoter Stadien wurden die Zellen nachfolgend über 3 Tage bei 37°C und pH 5,5 kultiviert (Bahn 3, 6 und 9). Im Anschluss wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und durch Immun-Blot unter Verwendung des LdSTF1-Antikörpers nachgewiesen (B). Die durch Markerproteine definierten Molekulmassen sind auf der linken Seite angegeben.

3.9.3 Nachweis der intrazellulären Lokalisation

Um erste Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion von LdSTF1 zu erhalten, sollte die subzelluläre Lokalisation dieses Genprodukts durch Immun-Gold-Markierung und Elektronenmikroskopie analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurden promastigote rekombinante *L. donovani* [pIR/LdSTF1] untersucht, da sich diese, im Gegensatz zu *L. donovani* WT-Zellen, durch eine im Immun-Blot nachweisbare Überexpression des LdSTF1-Genprodukts auszeichneten (siehe Abbildung 25B). Außerdem wurde uns von Herrn Dr. C. Manegold Gewebematerial aus dem Milzpunktat eines VL-Patienten, der im Bernhard-Nocht-Institut behandelt wurde, zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in 2% Paraformaldehyd fixiert; die weitere Bearbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.2.28 beschrieben. Die Vorbereitung der Proben für die

Elektronenmikroskopie, die Anfertigung der Schnitte sowie die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Manfred Krömer durchgeführt

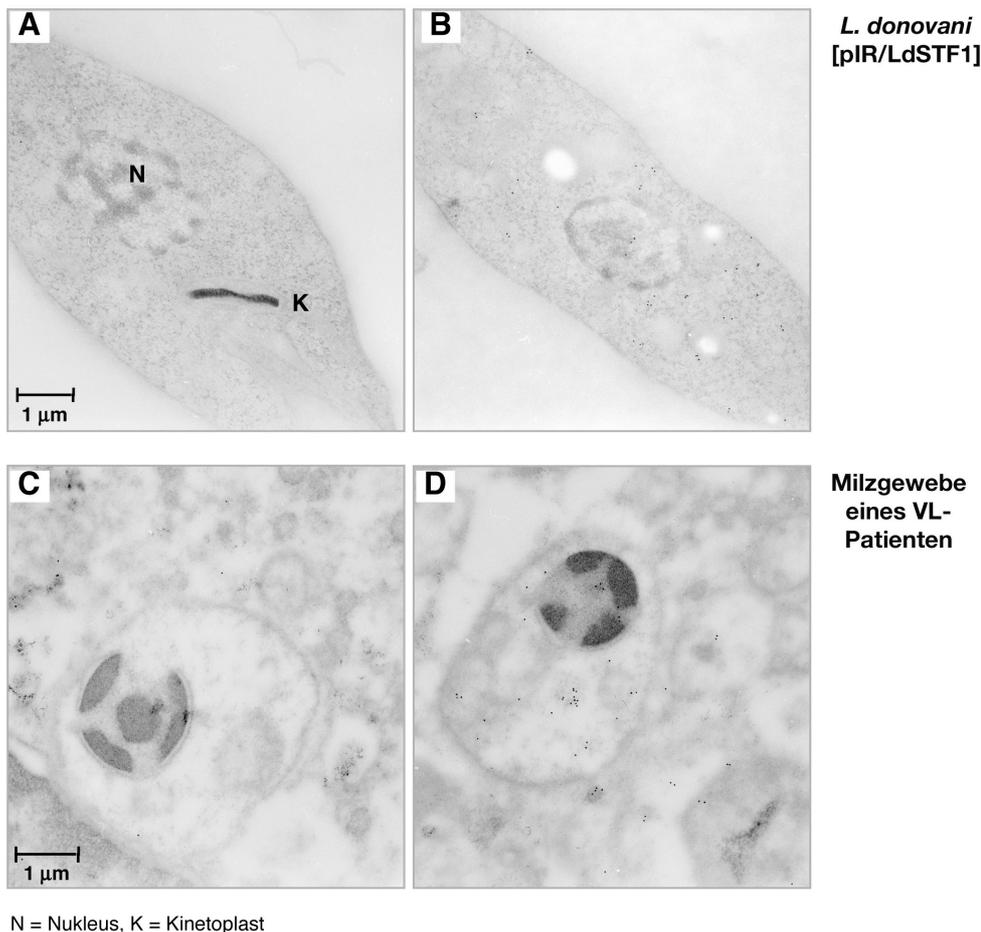


Abbildung 26: Immunelektronenmikroskopische Analysen zur intrazellulären Lokalisation von LdSTF1

Promastigote *L. donovani* [pIR/LdSTF1] (A und B) bzw. Gewebe aus dem Milzpunktat eines VL-Patienten (C und D) wurden in 2% Paraformaldehyd fixiert. Ultradünnschnitte wurden zunächst mit Präimmunsereum (A und C) bzw. mit dem spezifischen LdSTF1-Antikörper (B und D) behandelt und nachfolgend mit anti-Huhn-IgY (Dianova) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit Protein A-Goldpartikeln (10 nm). Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit einem Philips TEM 301-Gerät durchgeführt.

Abbildung 26 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten der mit Präimmun-Serum (A und C) bzw. mit dem spezifischen LdSTF1-Antikörper (B und D) behandelten Proben. Dabei fällt auf, dass in dem Milzgewebe-Präparat des VL-Patienten auch außerhalb der Leishmanien eine Markierung mit dem LdSTF1-Antikörper erfolgte (D); dies könnte auf eine Abgabe des LdSTF1-Genprodukts durch die Parasiten in das umgebende Wirtsgewebe hindeuten. Eine Bestätigung dieser Vermutung konnte jedoch nicht erfolgen, da sich bislang keine Vergleichsmöglichkeit mit dem Präparat einer uninfizierten humanen Milz ergab. In den Leishmanien selbst würde die Lokalisation eines Sekretionsproteins an dessen Syntheseort, dem rauen endoplasmatischen Retikulum, bzw. im Golgi-Apparat, wo die Modifizierung und Sortierung der Proteine sowie deren Weiterleitung zum entsprechenden Bestimmungsort erfolgt, zu erwarten sein. In dem elektronenmikroskopischen Präparat von *L.*

donovani [pIR/LdSTF1] sind jedoch, abgesehen von Zellkern und Kinetoplast, keine weiteren Organellen zu erkennen, so dass kein eindeutiger Nachweis der LdSTF1-Markierung an speziellen subzellulären Strukturen möglich ist.

3.10 Vergleichende Untersuchungen zur Infektiosität von *L. major* [pIR/LdSTF1] und *L. major* [pIR] während der Infektion von BALB/c-Mäusen

In Kapitel 3.4.2 wurden bereits die Unterschiede in der Infektiosität von *L. major* [pcosVL-1] und *L. major* [pcosTL] während einer Infektion von BALB/c-Mäusen untersucht. Im folgenden handelt es sich um ein analoges Experiment, allerdings jetzt nicht mehr auf Cosmid- sondern auf Gen-Ebene mit dem Ziel, die in Abschnitt 3.4.2 gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5×10^7 promastigote Kulturformen von *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] separat in den re/hi Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (5 Mäuse pro Gruppe).

3.10.1 Infektionsverlauf

Die Dokumentation des Infektionsverlaufs erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben; Abbildung 27A zeigt die Mittelwerte von jeweils 5 experimentellen Infektionen mit der dazugehörigen Standardabweichung. In Übereinstimmung mit den früher durchgeführten Experimenten ließ sich auch im Fall von *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] kein Unterschied im Verlauf der Läsionsentwicklung feststellen.

3.10.2 Milzgewichte

Nach 12-wöchiger Infektionsdauer wurden die Mäuse getötet und die Milzgewichte bestimmt (Abbildung 27B). Die Milzen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäuse zeigten ein höheres Gewicht als die der mit *L. major* [pIR] infizierten Kontrollmäuse; die Medianwerte waren mit 245 mg (*L. major* [pIR/LdSTF1]) und 216 mg (*L. major* [pIR]) jedoch deutlich geringer als die der in Kapitel 3.4.2.2 infizierten Mäuse. Dennoch ließ sich mit Hilfe des U-Tests von Wilcoxon, Mann und Whitney ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen ($\square \leq 0,01$), d.h. auch hier ließ sich das bereits auf Cosmidebene gewonnene Ergebnis bestätigen.

Der Unterschied in den absoluten Milzmassen zwischen den mit *L. major* [pcosVL-1] und den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäusen kann eventuell durch die in Abschnitt 3.9.2 beschriebenen unterschiedlichen Expressionsraten von LdSTF1 erklärt werden. Diese waren in mit pcosVL-1 transfizierten *L. donovani* deutlich höher als in solchen, die mit dem pIR/LdSTF1-Konstrukt transfiziert wurden, wobei sich diese Unterschiede besonders im Amastigotenstadium bemerkbar machten.

3.10.3 Parasitenlast in Milz und Lymphknoten

Im folgenden sollte die Parasitenlast in den Milzen sowie in den Lymphknoten der infizierten Mäuse bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden die Milzen zunächst in je 6 ml PBS homogenisiert; ein 3 ml-Aliquot wurde einer *limiting dilution*-Analyse unterzogen, während aus der zweiten Hälfte des Milz-Homogenats genomische DNA präpariert wurde (Kapitel 2.2.9.2). Aus der genomischen DNA sollte die relative Parasitenlast mit Hilfe einer *real time*-PCR (Kapitel 2.2.15.2) ermittelt werden. Dabei wird in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen einerseits die Menge der *L. major*-DNA, andererseits die DNA-Gesamtmenge anhand des Maus- β -Actin-DNA-Gehaltes bestimmt. Über das Verhältnis beider Werte ergibt sich die

relative Parasitenlast pro Organ; für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse müssen allerdings noch die jeweiligen Organgewichte berücksichtigt werden.

Im Fall der Lymphknoten erfolgte die Präparation von genomischer DNA und die darauf folgende Bestimmung der relativen Parasitenlast durch *real time*-PCR jeweils aus dem gesamten Organ-Homogenat. Die *real time*-PCR wurde freundlicherweise von Frau U. Klauenberg und Herrn Dr. S. Graefe aus der Abteilung Medizinische Zentraldiagnostik am BNI durchgeführt und ausgewertet.

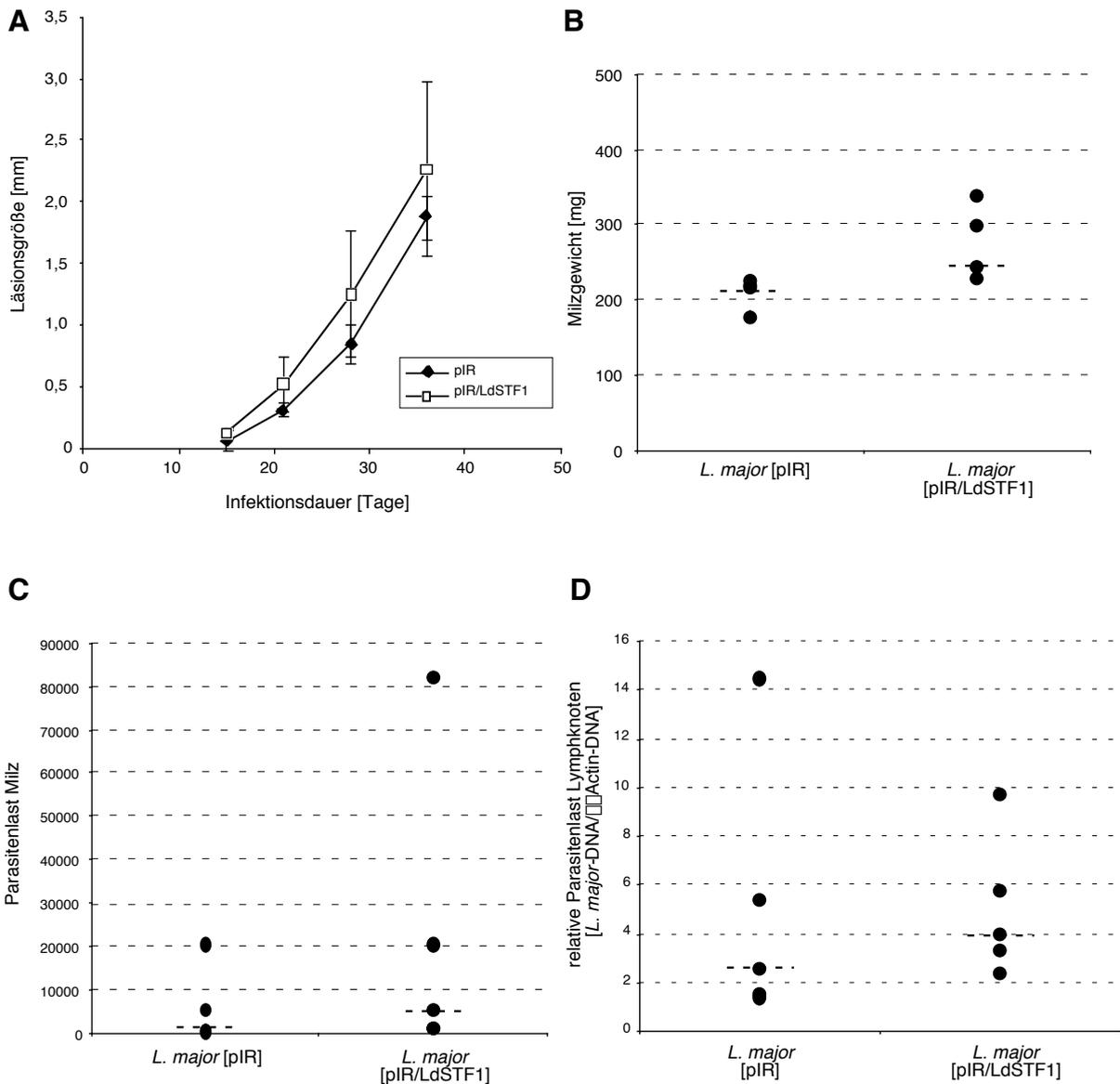


Abbildung 27: Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR]

5×10^7 promastigote Kulturformen von *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] wurden in den rechten hinteren Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (5 Mäuse pro Gruppe). Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliche Messung der Fußballendicke verfolgt; die Mittelwerte mit Standardabweichung sind in (A) dargestellt. Nach 12-wöchiger Infektionsdauer wurden die Mäuse getötet, und es wurden die Milzgewichte ermittelt (B). Die Bestimmung der Parasitenlast im Milzgewebe erfolgte durch *limiting dilution*-Analyse (C), während die relative Parasitenlast in den Lymphknoten (D) mit Hilfe einer *real time*-PCR ermittelt wurde. Die Medianwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linie dargestellt.

Abbildung 27C zeigt das Ergebnis der Parasitenlastbestimmung in der Milz durch *limiting dilution*-Analyse; die Zahl der Leishmanien wurde dabei auf das gesamte Organ hochgerechnet. Der U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney ergab keinen signifikanten Unterschied in der Parasitenlast der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] und *L. major* [pIR] infizierten Mäuse. Die parallel durchgeführte Bestimmung der relativen Parasitenlast durch *real time*-PCR einer 1:10- sowie einer 1:100-Verdünnung lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, da sich die Werte der Leishmanien-PCR offensichtlich an der Nachweisgrenze befanden. Legt man die Medianwerte aus der *limiting dilution*-Analyse von 640 Parasiten (*L. major* [pIR]) bzw. 5120 (*L. major* [pIR/LdSTF1]) pro Organ zu Grunde, so würden sich für die bei der *real time*-PCR eingesetzten halben Milz-Homogenate unter Berücksichtigung einer 1:100-Verdünnung Zahlen von 3,2 bzw. 25,6 Leishmanien erwarten lassen. Da diese Werte deutlich unter der mit dieser Methode nachweisbaren Parasitenzahlen von ca. 100 liegen (Schulz *et al.*, 2003), ist das negative Ergebnis der PCR nicht überraschend. Im Gegensatz dazu hätten sich bei der Analyse einer 1:10-Verdünnung in einigen Fällen Leishmanien im Milzgewebe nachweisen lassen müssen; möglicherweise wirkte sich aber in diesem Fall der aufgrund der zu geringen Verdünnung wesentlich stärkere Hintergrund aus genomischer DNA der Maus störend auf die Sensitivität der PCR aus (pers. Mitteilung C. Drost).

Für die in Abbildung 27D dargestellten relativen Parasitenlasten in den Lymphknoten ergab sich aufgrund des U-Tests von Wilcoxon, Mann und Whitney ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] und *L. major* [pIR] infizierten Mäusen; die Organgewichte konnten in diesem Fall vernachlässigt werden, da die Lymphknoten keine signifikanten Gewichtsunterschiede aufwiesen. Die bereits aus Resultaten vorangegangener Experimente gewonnene Erkenntnis, dass es sich bei LdSTF1 nicht um ein allgemeine Virulenz vermittelndes Gen handelt, wird durch dieses Ergebnis bestätigt.

3.10.4 Zytokinproduktion im Milzgewebe

In einem weiteren Experiment sollte die Zytokinproduktion im Milzgewebe der mit rekombinanten *L. major* infizierten Mäuse analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5×10^6 promastigote Kulturformen von *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] separat in einen Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (3 Mäuse pro Gruppe). Nach 10-wöchiger Inkubationsdauer wurden die Mäuse getötet, die Milzen isoliert und jeweils 5×10^5 Milzzellen mit verschiedenen anti-CD3-Konzentrationen (1000 ng/ml, 333 ng/ml, 111 ng/ml bzw. 0 ng/ml) stimuliert. Die Bestimmung der IFN- γ bzw. IL-2-Konzentrationen im Zellüberstand nach 24 h erfolgte durch ELISA (Kapitel 2.2.27); die Experimente wurden von Frau S. Ehrlich im Labor von Herrn PD Dr. A. von Bonin durchgeführt. Abbildung 28 zeigt die jeweiligen Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung; außerdem sind die entsprechenden Werte einer uninfizierten BALB/c-Maus von ähnlichem Alter aufgetragen.

In Abbildung 28A ist die IFN- γ -Produktion in Abhängigkeit von der anti-CD3-Konzentration dargestellt. Während von unstimulierten Zellen kein IFN- γ gebildet wurde, war mit steigender anti-CD3-Konzentration auch eine erhöhte IFN- γ -Produktion zu verzeichnen; dabei waren die Werte der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäuse bei allen anti-CD3-Konzentrationen signifikant erhöht ($p \leq 0,05$; U-Test), verglichen mit den Mäusen einer mit *L. major* [pIR] infizierten Kontrollgruppe. Bei der uninfizierten Maus war nur bei Stimulation mit 1000 ng/ml anti-CD3 eine geringe Freisetzung von IFN- γ nachweisbar.

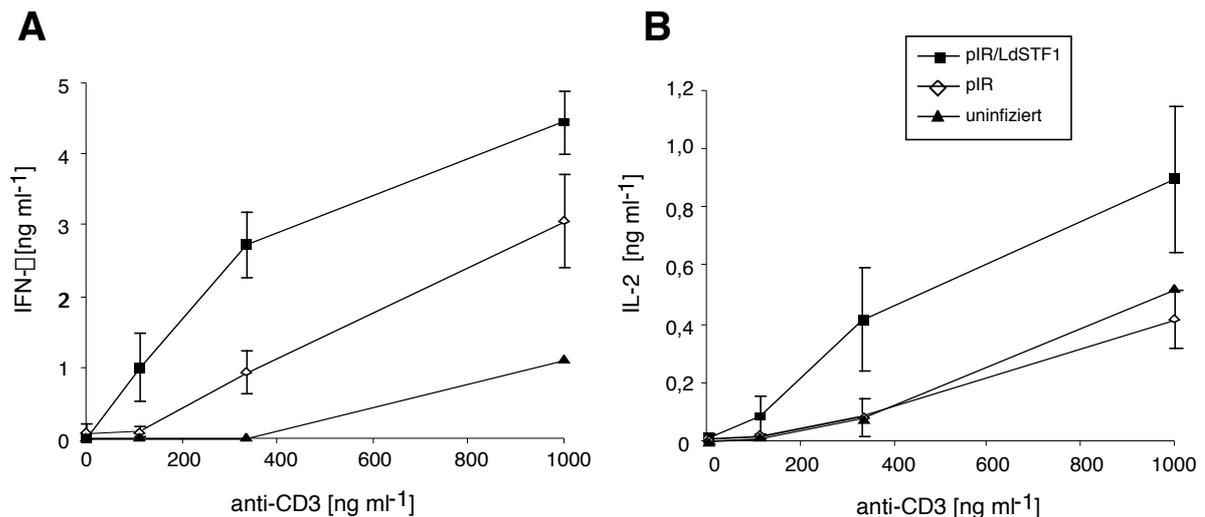


Abbildung 28: Zytokinproduktion von Milzzellen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten BALB/c-Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3

5×10^6 promastigote Stadien von *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] wurden separat in einen Fußballen von BALB/c-Mäusen inokuliert (3 Mäuse pro Gruppe). Nach 10-wöchiger Inkubationsdauer wurden die Mäuse getötet. Die Milzen wurden entnommen, und es wurden jeweils 5×10^5 Milzzellen mit unterschiedlichen anti-CD3-Konzentrationen inkubiert. Die Bestimmung der IFN- γ bzw. IL-2-Konzentration im Zellüberstand nach 24 h erfolgte durch ELISA unter Verwendung spezifischer Zytokin-Antikörper (PharMingen). Die Werte einer uninfizierten BALB/c-Maus sind als Kontrolle aufgetragen.

Für IL-2 (Abbildung 28B) zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten Tieren. Die IL-2-Produktion der mit verschiedenen anti-CD3-Konzentrationen stimulierten Milzzellen war nach Infektion mit *L. major* [pIR/LdSTF1] stark erhöht. Im Gegensatz dazu lagen die Werte der mit *L. major* [pIR] infizierten Kontrolltiere in einem ähnlichen Bereich wie die der uninfizierten BALB/c-Maus.

Zusammenfassend ließ sich eine deutlich erhöhte induzierbare IFN- γ bzw. IL-2-Produktion in reisolierten Milzzellen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten BALB/c-Mäuse nachweisen.

4. Diskussion

Parasiten der Gattung *Leishmania* verursachen beim Menschen ein breites Spektrum unterschiedlicher Krankheitsformen, die von einer spontan abheilenden CL bis zur systemischen VL reichen können. Die genetischen Grundlagen des Organtropismus verschiedener *Leishmania*-Spezies sind bislang nicht bekannt. Durch Anwendung einer genetischen Komplementations-Analyse sollten Tropismus-relevante Gene aus *L. donovani* identifiziert werden.

4.1 Genetische Komplementation als Strategie zur Identifizierung bzw. Funktionsanalyse von Genen

Genetische Komplementation ist ein Verfahren zur Identifizierung von Genen, das zunehmend an Bedeutung gewinnt. Im Gegensatz zur so genannten reversen Genetik, die sich vorwiegend zur Untersuchung bereits identifizierter Gene eignet, bietet die genetische Komplementation den Vorteil, dass nichts über die Eigenschaften des putativen Gens bekannt sein muss. Durch funktionelle Komplementation von Mutanten, die einen charakteristischen Phänotyp aufweisen, können unbekannte Gene identifiziert und charakterisiert werden. Auf diese Weise gelang beispielsweise die Identifizierung verschiedener, an der Glykokonjugat-Synthese beteiligter Gene von *Leishmania* (Ryan *et al.*, 1993a; Turco *et al.*, 1994; Descoteaux *et al.*, 1995; Beverley & Turco, 1995). Mit dem Fortschreiten des *Leishmania*-Genomprojektes und der damit einhergehenden Annotierung von Genen unbekannter Funktion könnten genetische Komplementations-Analysen einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung dieser Gene leisten.

In der vorliegenden Arbeit bestand die funktionelle Komplementations-Strategie in der Transfektion dermatroper *L. major* mit DNA einer Cosmid-Genbank viszerotroper *L. donovani*. Für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode war es wichtig, das *L. donovani*-Genom möglichst vollständig in *L. major* einzubringen. Dabei ist sowohl die Repräsentativität der *L. donovani*-Cosmid-Genbank als auch die Transfektionseffizienz von entscheidender Bedeutung.

Im Fall der *L. donovani*-Cosmid-Genbank sind nach der Poisson-Verteilung, unter Berücksichtigung der Größe des *Leishmania*-Genoms von $3,6 \times 10^7$ bp sowie einer durchschnittlichen DNA-Insertgröße von 34,5 kb, 4800 unabhängige Klone erforderlich, um das *L. donovani*-Genom vollständig abzudecken (Kapitel 3.1.1). Bei einer Verpackungseffizienz von durchschnittlich 1×10^5 cfu/ μ g DNA repräsentiert die Genbank das 21-fache *L. donovani*-Genom. Demnach scheint die Vollständigkeit der Cosmid-Genbank gegeben zu sein; Koloniehybridisierungsexperimente mit DNA-Sonden diverser *Leishmania*-Hitzechock-Gene (Kapitel 3.1.2) konnten dieses Ergebnis bestätigen. Eine Restriktionsanalyse der *L. donovani*-Cosmid-Genbank-DNA (Kapitel 3.1.2) ergab außerdem, dass innerhalb der Cosmide keine DNA-Insert-Sequenzen bevorzugt vertreten waren. Diese Ergebnisse deuten auf eine gute Qualität und Repräsentativität der *L. donovani*-Cosmidbank-DNA hin.

Bei der Herstellung von Cosmid-Genbanken durch Partialverdau genomischer DNA kann es zu einer verminderten Repräsentation von Telomer-Sequenzen kommen (Ryan *et al.*, 1993b). Dies ist für *Leishmania* insofern von Bedeutung, als bei verwandten Trypanosomatiden viele Oberflächenantigene in der Nähe von Telomeren liegen (Borst, 1986; Peterson *et al.*, 1989).

Aus diesem Grunde wird von Ryan *et al.* (1993b) die Herstellung genomischer DNA-Fragmente durch mechanische Scherung als Alternative vorgeschlagen. Im Falle von *Leishmania* deuten allerdings die bisher vorliegenden, jedoch noch sehr unvollständigen Ergebnisse des Genomprojekts nicht auf eine Lokalisation bestimmter Gen-Gruppen an den Telomeren hin.

Bei der Herstellung rekombinanter *L. major* durch Transfektion mit *L. donovani*-Genbank-DNA ergab sich eine mittlere Transfektionseffizienz von 500 Rekombinanten pro Transfektionsansatz. Unter Berücksichtigung der in die Elektroporation eingesetzten Zellzahl (4×10^7 Zellen) bzw. der Cosmid-DNA-Menge (50 μ g) resultiert eine so genannte zelluläre Transfektionseffizienz von $1,25 \times 10^{-5}$ bzw. ein Wert von 10 Rekombinanten/ μ g DNA. Um eine Bewertung dieser Ergebnisse vornehmen zu können, erfolgte ein Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten. Kapler *et al.* (1990) konnten bei der Elektroporation von *L. major* mit einem 32 kb pR-NEO-Konstrukt zelluläre Transfektionseffizienzen von $2,8 \times 10^{-5}$ erzielen; bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge ergab sich ein Wert von 62 Rekombinanten/ μ g DNA. Bei der Transfektion verschiedener *L. donovani*-Stämme mit *L. donovani*-Cosmid-Genbank-DNA, die unter Verwendung des Cosmidvektors cLHYG hergestellt wurde, waren maximale Transfektionseffizienzen von $8,2 \times 10^{-5}$ bzw. 300 Zellen/ μ g DNA zu verzeichnen (Ryan *et al.*, 1993b); dabei lag jedoch eine breite Streuung der in insgesamt 29 Experimenten erzielten Ergebnisse vor. Unter Berücksichtigung ausschließlich der Transfektionsexperimente, in denen eine DNA-Menge von 40 μ g eingesetzt wurde, resultierten durchschnittliche Transfektionseffizienzen von $4,1 \times 10^{-5}$ bzw. 41 Zellen/ μ g DNA. Im Gegensatz dazu konnten Kelly *et al.* (1994) bei der Transfektion von *L. donovani* mit einer *L. donovani*-Cosmidbank in dem Cosmid-Shuttle-Vektor pcosTL lediglich Transfektionseffizienzen von 4×10^{-6} Rekombinanten/ μ g DNA feststellen. Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich z.T. durch den Einsatz verschiedener Methoden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz erklären. Mit Ausnahme der Resultate von Kelly *et al.* (1994) liegen die Ergebnisse der übrigen Autoren sowie die der vorliegenden Arbeit durchaus in einem vergleichbaren Größenbereich.

Für eine *in vivo*-Selektion wurden rekombinante *L. major* aus 6 Transfektionsansätzen eingesetzt; bei einer mittleren Transfektionseffizienz von 500 Zellen pro Elektroporationsansatz resultieren theoretisch 3000 rekombinante *L. major*. Da zur vollständigen Abdeckung des *L. donovani*-Genoms 4800 unabhängige Klone benötigt werden (s.o.), ist die Zahl der durchgeführten Elektroporationen zu gering. Dadurch lässt sich zumindest teilweise das Ergebnis erklären, dass in zwei unabhängigen *in vivo*-Selektionsexperimenten zwei verschiedene Cosmide, pcosVL-1 bzw. pcosA, identifiziert werden konnten, die in den rekombinanten *L. major* nach zweimaliger Milzpassage dominierten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die zur genetischen Komplementation von *L. major* verwendete *L. donovani*-Cosmid-Genbank weitgehend vollständig und von ausreichender Qualität war. Allerdings kann die unzureichende Repräsentation von Telomer-Sequenzen aufgrund der Herstellung genomischer DNA-Fragmente durch Partialverdau nicht ausgeschlossen werden. Zur vollständigen Abdeckung des *L. donovani*-Genoms wäre bei einer *in vivo*-Selektion der Einsatz rekombinanter *L. major* aus mindestens 10 Elektroporationsansätzen erforderlich gewesen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Durchführung zweier unabhängiger *in vivo*-Selektionsexperimente unter Verwendung von jeweils 6 Transfektionsansätzen erreicht.

4.2 *In vivo*-Selektion rekombinanter *L. major*

Für die *in vivo*-Selektion rekombinanter *L. major* auf Tropismus-relevante Gene musste ein geeignetes Infektionsmodell ausgewählt werden. Im Zusammenhang mit experimenteller Leishmaniasis existiert eine Vielzahl etablierter Tiermodelle (Hommel *et al.*, 1995). Der jeweilige Krankheitsverlauf variiert in Abhängigkeit von den verwendeten Versuchstieren, den infizierenden *Leishmania*-Spezies bzw. -Stämmen, der Art der Infektion (subkutan, intraperitoneal bzw. intravenös), sowie der Infektionsdosis, so dass nahezu alle beim Menschen auftretenden Krankheitsformen experimentell nachgestellt werden können.

Zur Untersuchung des Organotropismus von *L. donovani* durch genetische Komplementation von *L. major* wäre ein Modellorganismus geeignet, der das Krankheitsbild dieser beiden Erreger im Menschen exakt widerspiegelt. Aus diesem Grunde müsste ein Tiermodell im Idealfall folgende Kriterien erfüllen:

- Eine *L. donovani*-Infektion führt durch die Viszeralisierung der Erreger zu einer klassischen VL.
- Eine Infektion mit *L. major* ruft Hautläsionen hervor, die nach einer gewissen Zeit spontan abheilen; es kommt nicht zu einer Aussaat der Parasiten in die inneren Organe.
- Bei einer Infektion mit rekombinanten *L. major*, die Teile des *L. donovani*-Genoms enthalten, kommt es im wesentlichen zur Ausprägung einer CL. Nur solche rekombinante *L. major*, die episomal Tropismus-relevante *L. donovani*-Gene enthalten, lassen sich nach der Inkubationszeit in den inneren Organen wiederfinden.
- Der Krankheitsverlauf lässt sich äußerlich verfolgen, z.B. durch die Entwicklung kutaner Läsionen.
- Die Inkubationszeit beträgt nicht länger als 2-3 Monate.

Leider handelt es sich hierbei um ein rein hypothetisches Modell, da es kein Infektionsmodell gibt, das alle diese Voraussetzungen erfüllt. Die zur Verfügung stehenden Alternativen sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.2.1 Problematik des *L. major*/BALB/c-Maus-Infektionsmodells

Der Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) und die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) sind ausgezeichnete Modellorganismen für eine *L. donovani*-Infektion (Farrell, 1976; Gifawesen & Farrell, 1989; Fulton & Joyner, 1948; Fulton *et al.*, 1950). In beiden Wirtsorganismen kommt es nach intracardialer bzw. intraperitonealer Inokulation der Parasiten zur Ausprägung einer VL, die unbehandelt zum Tod der Tiere führt; bei subkutaner Infektion von Hamstern mit *L. donovani* war allerdings eine Kontrolle der Infektion zu verzeichnen (Farrell, 1976; Gifawesen & Farrell, 1989). Ein Problem dieser Tiermodelle liegt in den relativ langen Inkubationszeiten. Bei den von Lira *et al.* (1998) durchgeführten Hamster-Infektionsexperimenten mit verschiedenen *L. tropica*-Isolaten, die aus Patienten mit CL, VTL bzw. VL stammten, waren nach s.c. Inokulation der Parasiten Inkubationszeiten von bis zu einem Jahr erforderlich; außerdem ließ sich der Infektionsverlauf nicht äußerlich verfolgen, da es zu keiner Läsionsbildung kam. Dies steht teilweise im Widerspruch zu Ergebnissen von Bastien & Killick-Kendrick (1992), bei denen sich nach subkutaner Inokulation dermatroper *L. tropica* Fußläsionen in den infizierten Hamstern ausbildeten. Auch diese Autoren weisen auf die sehr langen Inkubationszeiten hin; nach s.c. Inokulation von *L. tropica*-Promastigoten ließen sich erste Änderungen in der Fußdicke nach 8-15 Wochen erkennen, während zur

Ausbildung gut entwickelter Läsionen ca. 14-24 Wochen benötigt wurden. Um die langen Infektionszeiträume zu verkürzen, werden häufig intracardiale Infektionen durchgeführt; die Progression der Krankheit kann hierbei jedoch nicht anhand äußerlicher Merkmale verfolgt werden. Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit mehrere aufeinander folgende *in vivo*-Selektionen durchgeführt werden sollten, kam der Hamster aus Zeitgründen nicht für eine Verwendung als Modellorganismus in Frage.

Im allgemeinen können die für Laborzwecke verwendeten Maus-Inzuchtstämme eine *L. donovani*-Infektion kontrollieren; diese Resistenz gegenüber *L. donovani* ist genetisch bedingt und wird durch das NRAMP1-Gen verursacht (Vidal *et al.*, 1993). Dabei kommt es in den infizierten Mäusen zunächst zu einem Anstieg der Parasitenlast, die jedoch im weiteren Verlauf durch eine zellvermittelte Immunantwort kontrolliert wird (siehe auch Kapitel 1.3.2.1). Die überwiegende Zahl der Mausstämmen ist ebenfalls resistent gegenüber einer Infektion mit *L. major*; eine Ausnahme bilden BALB/c-Mäuse. Bei einer Infektion dieses Mausstammes mit *L. major* kommt es zu einer Disseminierung der Parasiten in die inneren Organe, die schließlich zum Tod der Mäuse führt (Howard *et al.*, 1980; Howard *et al.*, 1982). Obwohl sich BALB/c-Mäuse gut für eine *L. major*-Infektion eignen, liegt das Problem dieses Infektionsmodells darin, dass das von *L. major* hervorgerufenen Krankheitsbild, abgesehen von der Hautläsion, dem der humanen viszeralen Leishmaniase entspricht. Das heißt, die BALB/c-Maus zeigt eine dem Menschen entgegengesetzte Reaktion auf eine Infektion mit *L. donovani* bzw. *L. major*.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung des BALB/c-Maus-Infektionsmodells bilden die von Sulahian *et al.* (1997) durchgeführten Infektionsexperimente mit *L. infantum*. Dabei wurden BALB/c-Mäuse mit *L. infantum*-Stämmen, die aus immunkompetenten Patienten mit VL bzw. CL sowie aus aufgrund einer HIV-Infektion immunsupprimierten Patienten mit VL stammten, infiziert. Es ließen sich 3 unterschiedliche Infektionsprofile identifizieren. Das V (*visceralization*)-Profil zeichnet sich in der frühen Infektionsphase durch hohe Parasitenlasten in der Leber aus; diese stagnieren bzw. sinken nach ca. 20 Tagen, und es erfolgt eine kontinuierlich Zunahme der Parasiten im Milzgewebe mit Werten von 10^5 - 10^7 /g nach 90-100 Infektionstagen. Beim R (*regulation*)-Profil sind die Parasiten zunächst ebenfalls in der Leber nachzuweisen; nachfolgend kommt es zu einem schnellen Absinken der Parasitenlast in Leber und Milz, bis nach ca. 90-100 Tagen häufig keine Parasiten mehr in diesen Organen nachweisbar sind. Das U (*undetermined*)-Profil ist durch geringe bzw. kaum nachweisbare Parasitenzahlen charakterisiert. Obwohl sich zwischen diesem Mausmodell und der humanen Leishmaniase keine klinisch-pathologische Beziehung nachweisen lässt, zeigen die Ergebnisse, dass der Infektionsverlauf bei der in Bezug auf *L. infantum* allgemein als anfällig eingestuften BALB/c-Maus stark variieren kann; diese Variationen begründen sich ausschließlich auf parasitenspezifischen Faktoren. Dies konnte zusätzlich dadurch bestätigt werden, dass sich die V- und R-Infektionsprofile sowohl in gegenüber *L. major* gemeinhin als resistent geltenden C57BL/6-Mäusen (Honoré *et al.*, 1998) als auch in immundefizienten C.B.-17-SCID-Mäusen (Gangneux *et al.*, 2000) wiederfinden ließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur *in vivo*-Selektion rekombinanter *L. major* auf Tropismus-relevante Gene von *L. donovani* das BALB/c-Maus-Infektionsmodell angewendet. Die Vorteile dieses Tiermodells liegen in den relativ kurzen Inkubationszeiten von 7-10 Wochen, die auch wiederholte *in vivo*-Selektionsrunden in einem angemessenen Zeitrahmen

ermöglichen. Die Tatsache, dass *L. major* in BALB/c-Mäusen natürlicherweise zu einem gewissen Grad viszeralisiert, scheint zunächst von Nachteil für die Selektion Tropismus-relevanter Gene zu sein. Wenn man aber annimmt, dass die episomal vorhandenen *L. donovani*-Gene für die rekombinanten *L. major* nicht von Nutzen wären, würden die entsprechenden Cosmide während einer Mauspassage nicht in den Leishmanien erhalten bleiben, da sich Episomen in Abwesenheit von Antibiotikum-Selektionsdruck im allgemeinen durch Instabilität auszeichnen (Clayton, 1999). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Cosmide, die sich nach einer *in vivo*-Selektion aus rekombinanten *L. major* reisolieren lassen, den Parasiten mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Selektionsvorteil in den jeweiligen Organen verschafft haben. Die in diesem experimentellen System gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch zunächst nicht auf andere Systeme, wie etwa die humane Leishmaniase, übertragen.

4.2.2 Unterschiedlicher Selektionsdruck in Lymphknoten und Milz

Die *in vivo*-Selektion rekombinanter *L. major* wurde in Lymphknoten bzw. Milzen von BALB/c-Mäusen durchgeführt. Die Analyse der Cosmidzusammensetzung nach jeweils zwei Selektionsrunden in den entsprechenden Organen (siehe Kapitel 3.3) ergab in den Lymphknoten eine größere Zahl teilweise identischer Cosmide, während in den Milz-Isolaten ein einzelnes Cosmid, pcosVL-1, dominierte. Der offensichtlich unterschiedliche Selektionsdruck in beiden Organen soll unter Berücksichtigung der natürlichen Infektions- und Verbreitungswege von *Leishmania* diskutiert werden.

Alle Leishmaniasen beginnen mit einer dermalen Infektion durch Übertragung der Erreger beim Biss einer infizierten Sandmücke. Dabei kommt es zunächst nur zu einer lokalen Entzündungsreaktion der Haut, ausgelöst durch die Infiltration polymorphkerniger Granulozyten und Makrophagen aus dem Blut in das infizierte Gewebe (Solbach & Laskay, 2000). Nach einem erfolgreichen Invasionsprozess, bei dem die Leishmanien von den in Kapitel 1.1 beschriebenen Wirtszellen aufgenommen werden, erfolgt der Transport von der Infektionsstelle in den drainierenden Lymphknoten. Während Makrophagen aufgrund ihrer hohen phagozytischen Aktivität hauptsächlich für die Eliminierung der Parasiten zuständig sind, geschieht der Transport zum Lymphknoten durch dermale dendritische Zellen, die sich durch die Fähigkeit zur effizienten Stimulation ruhender T-Zellen auszeichnen (Moll *et al.*, 1993). Im Parakortex, dem T-Zell-Areal des Lymphknotens, wird das prozessierte Antigen zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen den T-Zellen präsentiert.

Sowohl die Aufnahme der Leishmanien durch phagozytierende Wirtszellen als auch der Transport von der Infektionsstelle zum drainierenden Lymphknoten, wo die Stimulation naiver T-Zellen stattfindet, ist allen *Leishmania*-Infektionen gemeinsam. Für den Invasionsprozess sind allgemeine Virulenzfaktoren der Parasiten verantwortlich, die essentiell für die Infektion sind, aber noch keine pathologischen Veränderungen im Wirtsorganismus hervorrufen (Chang & McGwire, 2002). Die Selektion rekombinanter *L. major* im Lymphknoten von BALB/c-Mäusen scheint somit zu Gunsten solcher Cosmide zu wirken, die allgemeine Virulenz vermitteln und die nicht für einen speziellen Lymphknoten-Tropismus verantwortlich sind.

Der weitere Verlauf der Infektion hängt einerseits von der Fähigkeit des Wirtsorganismus ab, eine geeignete Immunantwort zur Bekämpfung der intrazellulären Erreger einzuleiten, andererseits von Parasiten-spezifischen Faktoren, die diese Immunantwort unterbinden bzw. die unabhängig davon die Ausbreitung der Parasiten in die inneren Organe bewirken. Über diese Verbreitungswege können größtenteils nur Vermutungen angestellt werden (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Die Selektion rekombinanter *L. major* in der Milz von BALB/c-Mäusen scheint jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit zu Gunsten von spezifischen, Milz-Tropismus fördernden *L. donovani*-Genen zu wirken; diese Spezifität wird durch das Vorherrschen nur eines Cosmids nach zwei aufeinander folgenden *in vivo*-Selektionsrunden untermauert. Die Wirkung dieses Cosmids, pcosVL-1, auf pathologische Veränderungen in der Milz infizierter BALB/c-Mäuse soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.3 *L. major*[pcosVL-1] verursacht Splenomegalie in BALB/c-Mäusen

Signifikant höhere Milzgewichte von BALB/c-Mäusen durch Infektion mit *L. major* [pcosVL-1]

Wie in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben, ließ sich bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pcosVL-1] eine signifikante Zunahme im Milzgewicht gegenüber einer mit *L. major* [pcosTL] infizierten Kontrollgruppe verzeichnen. Diese signifikante Milzvergrößerung erinnert stark an die typischen Merkmale einer viszeralen Leishmaniose beim Menschen, die im wesentlichen durch die Krankheitssymptome Splenomegalie und Hepatomegalie charakterisiert ist. Neben der bereits erwähnten, Milz-Tropismus-fördernden Wirkung von pcosVL-1 soll der Effekt dieses Cosmids auf pathologische Veränderungen der Milz in den mit rekombinanten *L. major* infizierten BALB/c-Mäusen ausführlicher erläutert werden.

Die Vergrößerung von Milz und Leber wird bei einer Reihe parasitärer Infektionen, wie z.B. Malaria oder afrikanischer Trypanosomiasis, beobachtet. Neben dem schädigenden Einfluss des Parasiten und seiner Produkte auf das Wirtsgewebe trägt die Immunantwort des Wirts ebenfalls zur Pathogenese bei, da die Größenzunahme von Milz und Leber auch das Resultat der steigenden Anzahl und Aktivität von Makrophagen und Lymphozyten in diesen Organen ist (Taverne, 1995).

Zur experimentellen Untersuchung der bei einer VL auftretenden pathologischen Veränderungen wird vielfach das *L. donovani*/BALB/c-Maus-Modell angewendet. Obwohl diese Mäuse eine *L. donovani*-Infektion kontrollieren, kommt es bei intravenöser Inokulation der Parasiten zu einer chronischen Infektion der Milz, die von Splenomegalie begleitet wird (Saha *et al.*, 1991; Smelt *et al.*, 1997; Cotterell *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001b); bei subkutaner Inokulation ist dagegen nur eine Größenzunahme des drainierenden Lymphknotens, nicht der Milz, zu verzeichnen (Melby *et al.*, 2001b). Untersuchungen von Saha *et al.* (1991) konnten eine Anhäufung von Bindegewebe sowie die Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen als Ursache der Milzvergrößerung identifizieren; außerdem war eine fortschreitende Verringerung des Vorkommens so genannter periarteriöler lymphatischer Scheiden (PALS) zu verzeichnen. Unter PALS versteht man das lymphatische Milzgewebe, auch weiße Pulpa genannt, das aus B- und T-Zell-Arealen besteht und um eine Zentralarteriole angeordnet ist. Strukturelle Veränderungen der weißen Pulpa bei einer chronischen *L. donovani*-Infektion wurden auch von Smelt *et al.* (1997) beschrieben. Dabei wurde eine massive Zerstörung follikulärer dendritischer Zellen (FDCs) beobachtet, die mit einem

Verlust der Keimzentren (*germinal centers* = GCs) einherging. Die Verminderung von FDCs wurde von einer Infiltration parasitenbeladener Makrophagen in die weiße Pulpa begleitet. Da sowohl FDCs als auch GCs an der Regulation einer B-Zell-Antwort beteiligt sind, wird in diesen immunpathologischen Veränderungen die Ursache einer fehlgeleiteten B-Zell-Antwort vermutet, die zur chronischen Infektion der Milz beiträgt (Smelt *et al.*, 1997). Andere Autoren postulieren, dass die Zerstörung des lymphatischen Milzgewebes in einer unzureichenden Antigenpräsentation an T-Zellen resultiert (Engwerda & Kaye, 2000).

Nach 10-wöchiger Infektionsdauer ließen sich in den mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten BALB/c-Mäusen Milzgewichte von 391 mg (Median) feststellen, während die Medianwerte der mit *L. major* [pcosTL] infizierten Kontrollgruppe bei 241 mg lagen. Die signifikant höheren Milzgewichte, verursacht durch pcosVL-1, bestätigen die im vorherigen Kapitel beschriebene Selektion auf Milz-Tropismus-relevante Gene, da durch die verstärkte Viszeralisierung von *L. major* [pcosVL-1] auch die damit verbundenen immunpathologischen Konsequenzen ausgelöst werden. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Literaturdaten wird durch eine starke Variationsbreite der experimentellen Bedingungen erschwert. Bei subkutaner Infektion von BALB/c-Mäusen an der Schwanzbasis mit $1-2 \times 10^6$ promastigoten *L. tropica* (major) ließen sich nach 4-monatiger Inkubationsdauer Milzgewichte von 560 ± 195 mg verzeichnen; gleichzeitig war die Zahl der Makrophagen im Milzgewebe gegenüber uninfizierten Mäusen um das 10-fache erhöht (Djoko-Tamnou *et al.*, 1981). Zhang & Matlashewski (2001) konnten bei der Infektion von BALB/c-Mäusen (i.v. Schwanzvenen-Inokulation, 2×10^8 promastigote Stadien) mit rekombinanten *L. major* Friedlin V9, die das *L. donovani*-A2-Gen episomal exprimierten, nach 4 Wochen durchschnittliche Milzgewichte von 250 ± 30 mg feststellen; eine Infektion mit rekombinanten *L. major*, die nur den Plasmidvektor enthielten, lieferte Kontrollwerte von 150 ± 10 mg. Bei einem Vergleich dieser Kontrolldaten mit den Milzgewichten der mit *L. major* [pcosTL] infizierten Mäuse (241 mg, s.o.) wird deutlich, dass beide *L. major*-Stämme in der BALB/c-Maus vizeralisieren, wenn auch zu einem unterschiedlichen Grad. Dabei spielen jedoch neben Stamm-spezifischen Faktoren die Unterschiede in den Infektionsrouten (s.c. bzw. i.v.), der Parasitenzahl sowie der Inkubationsdauer eine entscheidende Rolle. Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. donovani* (2×10^7 promastigote Stadien, intracardiale Inokulation) lieferte nach 6-wöchiger Inkubationsdauer Milzgewichte von 248 ± 24 mg; nach 15 Wochen betragen die durchschnittlichen Milzgewichte 399 ± 4 mg, während nach 23 Wochen Werte von 890 ± 30 mg zu verzeichnen waren (Saha *et al.*, 1991).

Keine Unterschiede in der Infektiosität zwischen *L. major* [pcosVL-1] und *L. major* [pcosTL] in BALB/c-Mäusen

Die Infektion von Makrophagen wird üblicherweise als System zur *in vitro*-Analyse der Infektiosität von *Leishmania* eingesetzt; *in vivo* dient dagegen die Läsionsgröße an der Infektionsstelle als Index für die Progression einer experimentellen *L. major*-Infektion (Preston & Dumonde, 1976; Handman *et al.*, 1979, Behin *et al.*, 1979). Dabei ist allerdings zu beachten, dass keine Korrelation zwischen Läsionsgröße und Parasitenlast besteht, da die Läsionsentwicklung einerseits von der Vermehrung der Parasiten, andererseits von der Zunahme infiltrierender Wirtszellen bzw. von dem Zusammenspiel beider Faktoren abhängt (Titus *et al.*, 1985).

Sowohl in *in vitro*-Makrophageninfektionen (Kapitel 3.4.1) als auch bei der Infektion von BALB/c-Mäusen (Kapitel 3.4.2.1) ließen sich keine Unterschiede in der Infektiosität zwischen *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] feststellen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen aus der Untersuchung allgemeiner Virulenzfaktoren, wie z.B. HSP100. In *L. major* hsp100⁻-Mutanten waren geringere *in vitro*-Infektionsraten sowie eine deutlich verzögerte Läsionsentwicklung bei der Infektion von BALB/c-Mäusen zu verzeichnen (Hübel *et al.*, 1997). Das Cosmid pcosVL-1 hat demnach keinen Einfluss auf allgemeine Virulenzeigenschaften rekombinanter *L. major*. Die bereits in Abschnitt 4.2.2 diskutierte Selektion zugunsten eines speziellen, Milz-Tropismus fördernden Cosmids in den mit rekombinanten *L. major* infizierten BALB/c-Mäusen wird durch dieses Ergebnis bestätigt.

Keine Unterschiede der Parasitenlast in Milzen der mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten BALB/c-Mäuse

Splenomegalie wird im allgemeinen von einem Anstieg der Parasitenlast im Milzgewebe begleitet. So wurde beispielsweise bei experimenteller Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. donovani* (2 x 10⁷ promastigote Stadien, intracardiale Inokulation) nach 6-wöchiger Inkubationsdauer eine Parasitenlast von 3 x 10⁷ Parasiten/Milz dokumentiert; 15 Wochen nach Infektion waren 8,25 x 10⁷ Parasiten/Milz zu verzeichnen, während nach 23 Wochen Parasitenzahlen von 19,4 x 10⁷ erreicht wurden (Saha *et al.*, 1991). Auch Zhang & Matlashewski (2001) konnten in den bereits angeführten Infektionsexperimenten mit rekombinanten *L. major*, die sich durch Überexpression des *L. donovani*-A2-Gens auszeichneten, neben der bereits erwähnten Splenomegalie eine dreifache Erhöhung der Parasitenzahl im Milzgewebe infizierter BALB/c-Mäuse ausmachen; die absoluten Parasitenzahlen betragen in diesem Experiment ca. 3 x 10⁷ Parasiten/Milz bei Infektion mit *L. major* [+*L. donovani*-A2] bzw. 1 x 10⁷ Parasiten/Milz bei Mäusen einer entsprechenden Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pcosVL-1] trotz offensichtlicher Splenomegalie keine Erhöhung der Parasitenlast im Milzgewebe zu verzeichnen (Kapitel 3.4.2.3). Die durchschnittlichen Werte betragen 7680 Parasiten/Milz für *L. major* [pcosVL-1] bzw. 15360 Parasiten/Milz für *L. major* [pcosTL]; dabei war in der Gruppe der mit *L. major* [pcosTL] infizierten Mäuse ein ungewöhnlich hoher Wert von 163840 Parasiten/Milz zu verzeichnen, der möglicherweise als Ausreißer zu vernachlässigen ist. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Parasitenlasten der mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten Mäuse feststellen.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich auf der einen Seite die Frage nach den Ursachen der Splenomegalie, wenn diese nicht auf einem verstärkten Milztropismus der Parasiten beruht (der sich in den bisher durchgeführten Experimenten nicht durch erhöhte Parasitenlasten nachweisen ließ) bzw. wieso sich andererseits trotz eines möglicherweise verstärkten Milztropismus durch pcosVL-1 und einer eindeutig dokumentierten Splenomegalie keine höheren Parasitenlasten im Milzgewebe der Mäuse nachweisen lassen? Eine mögliche Hypothese, die diese beiden Fragen gleichzeitig beantwortet, ist eine durch pcosVL-1 ausgelöste Steigerung der zellulären Immunantwort. Unter der Annahme, dass pcosVL-1 sowohl einen verstärkten Milztropismus rekombinanter *L. major* als auch eine gesteigerte Immunantwort mit der daraus resultierenden verstärkten Elimination der Parasiten bewirkt, würden sich keine erhöhten Parasitenlasten in den Milzen der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse ergeben. Das heißt, eine Steigerung der Immunantwort durch pcosVL-1

wäre die Ursache dafür, dass sich der verstärkte Milztropismus rekombinanter *L. major* nicht in absoluten Zahlen der Parasitenlast widerspiegelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Messungen der Zytokinkonzentration im Blut der mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten Mäuse durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2.4). Es ergaben sich signifikant höhere IL-12-Konzentrationen im Blut der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse; für IFN- γ ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Mausgruppen feststellen. Die Tatsache, dass IL-12 bei der Induktion einer T_H1-Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt (Scott, 1993; Hsieh *et al.*, 1993; Fowell *et al.*, 1995), spricht möglicherweise für die o.g. Hypothese. Um eindeutiger Aussagen diesbezüglich machen zu können, wären weitere Analysen der Zytokinproduktion, insbesondere an stimulierten Milzzellen der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten BALB/c-Mäuse, erforderlich. Da jedoch zunächst die Identifizierung des Tropismus-fördernden, auf pcosVL-1 kodierten Gens im Vordergrund stand, wird auf den möglicherweise immunmodulatorischen Effekt des putativen Milz-Tropismus-fördernden Gens in Kapitel 4.4 ausführlicher eingegangen.

4.4 LdSTF1 ist für den Milztropismus rekombinanter *L. major* in BALB/c-Mäusen verantwortlich

Nach der Sequenzanalyse von pcosVL-1 stellte die Identifizierung relevanter *open reading frames*, d.h. der Schritt vom Cosmid zum Gen, den Schwerpunkt der Untersuchungen dar. Zu diesem Zweck wurde eine Durchmusterung der *L. donovani*-Cosmid-Genbank nach pcosVL-1-Homologen durchgeführt; durch individuelle Transfektion von *L. major* mit pcosVL-1 und seiner Homologe sowie einer anschließenden *in vivo*-Selektion konnte eine vorläufige Einengung auf 2 ORFs vorgenommen werden (siehe Kapitel 3.6). Die individuelle Überexpression dieser Gene, ORF2 bzw. ORF3, in *L. major* und eine nachfolgende *in vivo*-Selektion ergab eindeutig, dass ORF3 (= LdSTF1) für den Milztropismus rekombinanter *L. major* verantwortlich ist (Kapitel 3.8). Die Eigenschaften des LdSTF1-Genprodukts sollen im folgenden diskutiert werden.

Eine Datenbankrecherche (BLAST-P) der Aminosäuresequenz des LdSTF1-Genprodukts ergab lediglich eine nicht-signifikante Homologie zu einem hypothetischen Protein in der intergenischen Region ume3-hda 1 aus *L. major* (Kapitel 3.5 bzw. 3.9). Dies Resultat ist nicht überraschend, da die im Verlauf des *Leishmania*-Genomprojekts durchgeführte Sequenzanalyse des *L. major* Friedlin-Stammes noch nicht abgeschlossen ist. Von den geschätzten insgesamt 8600 Protein-kodierenden Genen des *L. major*-Genoms konnten bislang über 1000 vollständige und 2000 unvollständige identifiziert werden (Myler *et al.*, 2001); bei 75% der vollständig sequenzierten Gene ließ sich keine Einordnung hinsichtlich ihrer möglichen Funktion vornehmen. Dabei handelt es sich einerseits um Gene, die für Proteine mit Sequenzhomologie zu Proteinen anderer Organismen mit noch unbekannter Funktion kodieren; andererseits handelt es sich um solche Genprodukte, die keine Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Organismen außer den Trypanosomatiden aufweisen. Letztere stellen vermutlich Gene dar, die für Parasiten-spezifische Funktionen kodieren bzw. deren Primärstruktur im Verlauf der Evolution so stark divergierte, dass keine Ähnlichkeit mehr mit ihren funktionellen Homologen in anderen Spezies festzustellen ist (Myler *et al.*, 2001).

LdSTF1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein *single copy*-Gen, das auf einem der während einer Pulsfeld-Gelelektrophorese co-migrierenden Chromosomen 32 und 33 lokalisiert ist.

Analysen zur subzellulären Lokalisation des 226 kDa großen LdSTF1-Genprodukts (siehe Kapitel 3.9.3) deuten auf eine Abgabe des Proteins durch die Leishmanien hin, insbesondere nach Aufnahme der Parasiten durch ihre Wirtszellen, die Makrophagen, und nach der Transformation ins amastigote Stadium. Dies ist möglicherweise von Bedeutung für die Antigen-Präsentation durch Makrophagen, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Bei experimenteller Infektion von Maus-Makrophagen mit *L. mexicana* können drei verschiedene Aktivierungszustände der Makrophagen - ruhend, geprägt (*primed*) und aktiviert - unterschieden werden (Overath & Aebischer, 1999). Ruhende Makrophagen, die keine MHC-Klasse-II-Moleküle synthetisieren und deshalb kein Antigen präsentieren können, werden nach Behandlung mit IFN- γ zu so genannten geprägten Makrophagen. Trotz induzierter Synthese von MHC-Klasse-II-Molekülen sind diese Zellen nicht in der Lage, amastigote Leishmanien abzutöten (Antoine *et al.*, 1991; Fruth *et al.*, 1993; Wolfram *et al.*, 1995). In diesem Stadium können also nur solche *Leishmania*-Proteine prozessiert und präsentiert werden, die an der Parasitenoberfläche lokalisiert sind bzw. in die parasitophore Vakuole abgegeben werden; intrazelluläre Proteine stehen der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie nicht zur Verfügung, solange die Parasiten noch intakt sind. Durch ein weiteres Signal, wie z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF- α), werden die Makrophagen voll aktiviert, es erfolgt die Produktion von Stickoxid (NO) und das damit verbundene Abtöten der Leishmanien (Bogdan *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1990). Nach diesem Vorgang stehen den aktivierten Makrophagen theoretisch alle Proteine der degradierten Parasiten für die Antigen-Präsentation zur Verfügung (Overath & Aebischer, 1999).

Untersuchungen von Wolfram *et al.* (1996) konnten belegen, dass die erfolgreiche Antigen-Präsentation durch Makrophagen nicht nur von der zellulären Lokalisation des Antigens, sondern auch von dessen Abundanz bzw. Stabilität abhängt. Bei diesen Experimenten wurden Makrophagen mit rekombinanten *L. mexicana* infiziert, die sich durch Überexpression einer normalerweise in intrazellulären Vesikeln amastigoter Stadien vorkommenden, membrangebundenen sauren Phosphatase (MAP = *membrane bound acid phosphatase*) auszeichneten. Dabei erfolgte die Überexpression einerseits als Oberflächenprotein, andererseits in einer löslichen Form des modifizierten Proteins, bei der es zur Antigen-Sekretion in die parasitophore Vakuole kam. Bei Infektion von Makrophagen mit intakten *L. mexicana* WT bzw. den beiden überexprimierenden Stämmen konnte nur im Falle der Oberflächen- bzw. sekretierten MAP eine effiziente Antigen-Präsentation an T-Zellen nachgewiesen werden. Demnach besteht eine Kommunikation zwischen der parasitophoren Vakuole und dem Plasmalemma der Wirtszelle. Nach dem Abtöten der Parasiten durch Zugabe von L-Leucin-Methylester (Leu-OMe) ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei dem mit lebenden Parasiten durchgeführten Experiment. Da die intrazelluläre MAP-Konzentration in amastigoten Stadien von *L. mexicana* WT nur 0,066% des zellulären Gesamtproteins ausmacht, konnte auch nach dem Abtöten der Leishmanien keine effiziente Antigen-Präsentation durch die infizierten Makrophagen erfolgen.

Die Analyse infizierter Makrophagen aus dem Gewebe einer durch *L. mexicana* hervorgerufenen Läsion ergab eine geringe Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen; dies deutet darauf hin, dass sich diese Makrophagen in einem Aktivierungszustand zwischen ruhend und geprägt befanden (Russell *et al.*, 1992). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass sich das Vorkommen eines Oberflächen- bzw. sekretierten Proteins in amastigoten

Stadien von *Leishmania*, wie es bei dem LdSTF1-Genprodukt möglicherweise der Fall ist, positiv auf die Antigen-Präsentation durch Makrophagen und die damit verbundene Induktion einer T-Zell-Immunantwort auswirkt. Im Gegensatz zu promastigoten Formen, die sich durch die starke Expression der Oberflächenmetalloproteinase gp63 auszeichnen, sind die Oberflächen amastigoter Stadien jedoch reich an Glykolipiden (McConville & Blackwell, 1991; Winter *et al.*, 1994) und relativ arm an Proteinen. Bisher gelang lediglich in einem Fall der Nachweis eines Sekretionsproduktes amastigoter Stadien im infizierten Gewebe. Es handelt sich dabei um ein von *L. mexicana*-Amastigoten abgegebenes Proteophosphoglykan, aPPG, das innerhalb der parasitophoren Vakuole infizierter Makrophagen akkumulierte (Ilg *et al.*, 1995; Ilg *et al.*, 1998). Weitere Versuche zur Identifizierung von Sekretions-Proteinen bzw. -Glykolipiden amastigoter *Leishmania*-Stadien verliefen bisher negativ (Russell *et al.*, 1992). Vor diesem Hintergrund ist die Abgabe des LdSTF1-Genprodukts durch amastigote Formen im infizierten Wirtsgewebe eine Hypothese, die noch nicht eindeutig belegt werden konnte. Wegen der fehlenden Vergleichsmöglichkeit mit dem immunelektronenmikroskopischen Präparat einer uninfizierten Milz kann außerdem die Möglichkeit einer Kreuzreaktion des LdSTF1-Antikörpers mit bestimmten Epitopen im Milzgewebe nicht ausgeschlossen werden.

Unterschiedliche LdSTF1-Expressionskinetik in *L. donovani* [pcosVL-1] bzw. *L. donovani* [pIR/LdSTF1] während der *in vitro*-Differenzierung zu axenischen Amastigoten

Bei der Untersuchung der Expressionskinetik des LdSTF1-Genprodukts in rekombinanten *L. donovani* (Kapitel 3.9.2), die einer *in vitro*-Differenzierung zu axenischen Amastigoten unterworfen wurden, war ein auffälliger Unterschied der LdSTF1-Expression zwischen *L. donovani* [pcosVL-1] und *L. donovani* [pIR/LdSTF1] zu verzeichnen. Während sich rekombinante *L. donovani*, die das Cosmid pcosVL-1 enthielten, durch annähernd gleiche LdSTF1-Expression sowohl in Promastigoten bei 25°C bzw. 37°C als auch in axenischen Amastigoten auszeichneten, war in den mit dem pIR/LdSTF1-Konstrukt transfizierten *L. donovani* nur bei 25°C eine vergleichbare Expression des LdSTF1-Genprodukts festzustellen; diese war nach 24 h Hitzeschock (37°C) bereits stark reduziert bzw. in axenischen Amastigoten kaum mehr nachweisbar (Abbildung 25).

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, bei denen die Genexpression hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, ist für *Trypanosomatidae* das Vorkommen so genannter Multigeneinheiten charakteristisch, die als eine Einheit transkribiert werden (polycistronische Transkription). Aus diesem Grunde erfolgt bei diesen Organismen die Regulation der Expression individueller Gene auf post-transkriptioneller Ebene, d.h. über mRNA-Stabilität bzw. -Abbau (Graham, 1995). In diesem Zusammenhang kommt den flankierenden Sequenzen, insbesondere den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs), eine besondere Bedeutung zu. In Trypanosomen wurde bereits mehrfach die Beteiligung der 3'-UTRs an einer post-transkriptionellen Regulation der Genexpression nachgewiesen (Berberof *et al.*, 1995; Blattner & Clayton, 1995; Nozaki & Cross, 1995; Furger *et al.*, 1997); auch in Leishmanien deuten die Ergebnisse diverser Untersuchungen darauf hin, dass sowohl die 3'-UTRs als auch die stromabwärts liegenden intergenischen Regionen (IR) an der post-transkriptionellen Genregulation beteiligt sind (Shapira & Pedraza, 1990; Ramamoorthy *et al.*, 1995; Charest *et al.*, 1996; Beetham *et al.*, 1997).

Die stärkere Expression des LdSTF1-Genprodukts in axenischen Amastigoten von *L. donovani* [pcosVL-1] lässt sich möglicherweise auf das Vorhandensein der natürlichen flankierenden Sequenzen zurückführen. Bei der Klonierung von LdSTF1 in den Expressionsvektor pIRSAT-3 wurden diese Sequenzen durch 3'-UTRs einer amastigotenspezifischen Cysteinproteinase aus *Leishmania mexicana mexicana* ersetzt, die eine gezielte Expression des klonierten Gens im amastigoten Stadium ermöglichen sollten. Die dadurch erzielte Überexpression des entsprechenden Gens ist jedoch, verglichen mit der natürlichen Überexpression, wie sie auf Cosmidebene erreicht wurde, nicht ausreichend. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es sich nicht um echte Amastigote, wie sie im Falle einer *in vivo*-Infektion vorliegen, sondern um axenische amastigote Formen handelte. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen LdSTF1-Expression erweist es sich im Nachhinein möglicherweise von Vorteil, dass die in Kapitel 3.6 beschriebene Einengung auf relevante ORFs – ORF2 bzw. ORF3 – durch eine vergleichende *in vivo*-Selektion von pcosVL-1-Homologen, also von Cosmiden, durchgeführt wurde. Die bereits in Abschnitt 4.3 diskutierten, auf Cosmidebene gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der *in vivo*-Eigenschaften von *L. major* [pcosVL-1] wurden durch eine Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pIR/LdSTF1] einer Überprüfung unterzogen; diese Ergebnisse sollen im folgenden diskutiert werden.

Signifikant höhere Milzgewichte von BALB/c-Mäusen durch Infektion mit *L. major* [pIR/LdSTF1], aber kein Unterschied im Infektionsverlauf

Die Analyse der Milzgewichte der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäuse ergab nach einer 12-wöchigen Inkubationsdauer einen Medianwert von 245 mg; bei einer mit *L. major* [pIR] infizierten Kontrollgruppe war ein Medianwert von 216 mg zu verzeichnen. Obwohl sich mit Hilfe des U-Tests ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen nachweisen ließ ($\square \leq 0,01$), waren die Milzgewichte deutlich geringer als bei dem mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] durchgeführten Infektionsexperiment, wo die Medianwerte 391 mg bzw. 241 mg betragen. Als Ursache dafür lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene unterschiedliche Kinetik der LdSTF1-Expression anführen. Da trotz dieser Einschränkung ein signifikanter Unterschied zwischen den Milzgewichten der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten BALB/c-Mäuse bestand, ist ein nachweisbarer Effekt von LdSTF1 auf den Milztropismus der rekombinanten *L. major* und die damit verbundene Splenomegalie vorhanden; d.h. die bereits für pcosVL-1 beschriebene Wirkung ließ sich auf Einzel-Gen-Ebene bestätigen.

Der Infektionsverlauf ließ - bezogen auf die Läsionsentwicklung - in den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten BALB/c-Mäusen keinen Unterschied erkennen (Kapitel 3.10.1); die allgemeinen Virulenzeigenschaften der Parasiten werden demnach durch die Überexpression von LdSTF1 nicht beeinflusst. Dieses Resultat bestätigt die bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] gewonnenen Ergebnisse.

Keine Unterschiede der Parasitenlast in Milzen von mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten BALB/c-Mäusen

Die Bestimmung der Parasitenlast im Milzgewebe der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten BALB/c-Mäuse erfolgte sowohl durch *limiting dilution*-Analyse als auch durch *real time*-PCR (Kapitel 3.10.3). Während sich aus der *limiting dilution*-Analyse Medianwerte von 5120 Parasiten (*L. major* [pIR/LdSTF1]) bzw. 640 Parasiten (*L. major* [pIR]) pro Organ ergaben, war bei der *real time*-PCR durch den Einsatz einer 1:100-Verdünnung offensichtlich die Nachweisgrenze erreicht. Die Unterschiede in der Parasitenlast zwischen den beiden Mausgruppen war statistisch nicht signifikant. Analog zu dem mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] durchgeführten Infektionsexperiment spiegelt sich der Effekt von LdSTF1 auf den Milztropismus rekombinanter *L. major* und die daraus resultierende Splenomegalie nicht in erhöhten Parasitenlasten wider. Auf die bereits in Abschnitt 4.3 geäußerte Hypothese einer durch LdSTF1 hervorgerufenen verstärkten zellulären Immunantwort und einer damit verbundenen gesteigerten Eliminierung der Parasiten im Milzgewebe des Wirtsorganismus wird im folgenden Abschnitt - unter Berücksichtigung der Zytokinproduktion in den Organen - erneut eingegangen.

Signifikant höhere IL-2 bzw. IFN- γ -Produktion in Milzzellen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten BALB/c-Mäuse

Zur Analyse der Immunantwort von Milzzellen der mit rekombinanten *L. major* infizierten Mäuse wurden 2 Parameter, IL-2 und IFN- γ ausgewählt. Die Produktion dieser beiden Zytokine kann einerseits durch so genannte T_H0-Zellen erfolgen; diese Zellen entwickeln sich nach kurzer Stimulation aus noch ungeprägten Vorläuferzellen und sind in der Lage, eine Reihe verschiedener Zytokine zu produzieren (Rook, 1995). Nach chronischer Stimulation entstehen aus den T_H0-Zellen die spezialisierten T_H1- bzw. T_H2-Zellen; dabei sind T_H1-Zellen im wesentlichen durch die Freisetzung von IL-2 und IFN- γ charakterisiert. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bewirkt IFN- γ die Aktivierung von Makrophagen und deren mikrobiziden Mechanismen, während IL-2 für die Aktivierung von Monozyten sowie für das Wachstum von T-Zellen und deren Mediatorfreisetzung verantwortlich ist.

Die Messung der Zytokin-Produktion isolierter Milzzellen aus BALB/c-Mäusen, die mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infiziert waren, ergab nach Stimulation mit unterschiedlichen anti-CD3-Konzentrationen (siehe Kapitel 3.10.4) sowohl für IL-2 als auch für IFN- γ eine signifikant höhere Produktion in den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Tieren ($p \leq 0,05$). Dieser Unterschied wurde besonders im Fall von IL-2 deutlich, wo die Werte der Zytokinfreisetzung in Milzzellen der mit *L. major* [pIR] infizierten Kontrollmäuse in einem ähnlichen Größenbereich wie die ebenfalls aufgetragenen Werte einer uninfizierten BALB/c-Maus lagen. Insgesamt lässt sich also eine Steigerung der IL-2- bzw. IFN- γ -Produktion in den Milzen von mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten BALB/c-Mäusen feststellen. Da es sich hierbei um zwei Zytokine handelt, die spezifisch auf die Aktivierung von Makrophagen wirken, ist die verstärkte Elimination der Parasiten im infizierten Milzgewebe mit großer Wahrscheinlichkeit eine Konsequenz der erhöhten Zytokinproduktion. Dieser Sachverhalt liefert außerdem eine Erklärung für die in vorangegangenen Experimenten nicht nachweisbare Korrelation von verstärktem Milztropismus rekombinanter *L. major* [pcosVL-1 bzw. pIR/LdSTF1], Splenomegalie sowie erhöhten Parasitenlasten im Milzgewebe infizierter BALB/c-Mäuse.

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten zur Identifizierung eines Gens aus *L. donovani*, das rekombinanten *L. major* einen Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verschafft. Über die Art dieses Selektionsvorteils können bislang nur Vermutungen angestellt werden, da die Verbreitungswege der Leishmanien im Wirtsorganismus nur unzureichend bekannt sind. Während dermale dendritische Zellen im wesentlichen für den Transport der Leishmanien von der Infektionsstelle zum drainierenden Lymphknoten verantwortlich sind (Moll *et al.*, 1993), liegen keine Informationen über die weitere Verbreitung der Parasiten in die inneren Organe des Säugerwirtes vor. Die Tatsache, dass rekombinante *L. major* [pcosVL-1] ausschließlich in der Milz und nicht im Lymphknoten dominierten, lassen ein bevorzugtes *sorting* dieser Leishmanien in Richtung Milz, hervorgerufen durch LdSTF1, vermuten. Obwohl LdSTF1 gleichzeitig eine Steigerung der Immunantwort in den Milzzellen infizierter BALB/c-Mäuse auslöst, wird dieser nachteilige Effekt möglicherweise durch den Vorteil eines verstärkten Milztropismus rekombinanter *L. major* [LdSTF1] kompensiert. Demnach würde der Selektionsvorteil für die Parasiten auf einem schnelleren Transport in die Milz und weniger auf einer gesteigerten Überlebensfähigkeit in diesem Organ beruhen. Die an dieser Stelle geäußerten Hypothesen bezüglich des Effekts von LdSTF1 bleiben jedoch spekulativ, bis näheres über die Transportmechanismen der Parasiten bzw. der infizierten Phagozyten in die inneren Organe des Wirtsorganismus bekannt ist.

Zur weiteren Überprüfung der im Verlauf dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wären Gen-*knockout*-Studien sinnvoll, um den Effekt von *L. donovani* Δ LdSTF1-Mutanten auf die Viszeralisierung zu untersuchen. Bei diesem Ansatz müsste jedoch das Hamster-Infektionsmodell zur Anwendung kommen; wegen der bereits erwähnten langen Infektionszeiten konnten derartige Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Ein weiterer sinnvoller Ansatz wäre die Funktionsanalyse von LdSTF1 in einem regulierbaren Expressionssystem, wie z.B. dem Tetrazyklin-abhängigen Repressor/Operator-System, das bereits in diversen Organismen, u.a. auch in Trypanosomatiden (Wirtz & Clayton, 1995), zur Untersuchung von Genfunktionen angewendet wird. Das Problem einer unzureichenden Gen-Expression, wie es bei der Verwendung des Expressionsplasmids pIRSAT-3 in amastigoten Stadien von *Leishmania* auftrat, könnte auf diese Weise umgangen werden. Da bei der Durchmusterung einer *L. major*-Cosmid-Genbank ein LdSTF1-Homolog identifiziert werden konnte, ließe sich mit Hilfe eines geeigneten Expressionssystems außerdem die Frage nach einem möglichen Spezies-spezifischen Effekt von LdSTF1 beantworten. Des weiteren bietet ein induzierbares Expressionssystem die Möglichkeit, durch eine gezielte Überexpression von LdSTF1 zu verschiedenen Zeitpunkten einer Mausinfektion Informationen über die Rolle des Gens während der frühen bzw. späteren Phase einer *Leishmania*-Infektion zu erhalten. Ein von Yan *et al.* (2001) für *L. donovani* beschriebenes TET-System wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe am BNI etabliert.

Zum Abschluss soll noch angemerkt werden, dass es sich bei Tropismus-fördernden Faktoren mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Gruppe von Genen handelt; das in dieser Arbeit identifizierte LdSTF1 stellt nur einen Vertreter aus dieser Gruppe dar. Das in einem Wiederholungsexperiment nach zweimaliger Milzpassage rekombinanter *L. major* dominierende Cosmid pcosA, das im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert werden

konnte, ist möglicherweise ebenfalls einer solchen Gruppe zuzuordnen. Der Tropismuseffekt kann entweder auf der Wirkung einzelner Gene oder auf dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren beruhen. Erste Indizien für einen möglichen additiven Effekt liefern Resultate einer kürzlich durchgeführten Mausinfektion mit rekombinanten *L. major*[pIR/LdSTF1], die zusätzlich das Cosmid *pcosA* besaßen. Bei den infizierten BALB/c-Mäusen war eine deutliche Beschleunigung der Läsionsentwicklung gegenüber entsprechenden Kontrolltieren zu verzeichnen. In vorherigen Experimenten konnte allerdings nie eine Korrelation zwischen verstärktem Milztropismus und beschleunigter Fußdicken-Zunahme beobachtet werden, d.h. der additive Tropismuseffekt kann letztendlich in einem schnelleren Infektionsverlauf resultieren, oder die Wirkung von *pcosA* ist der von *LdSTF1* verschieden. Theoretisch wäre durch aufeinander folgende Komplementations- und *in vivo*-Selektionsrunden eine sukzessive Identifizierung von Genen, die in diese Prozesse involviert sind, vorstellbar.

5. Zusammenfassung

Protozoen der Gattung *Leishmania* verursachen beim Menschen ein breites Spektrum von Krankheitsformen, die von einer spontan abheilenden CL bis zur systemischen VL reichen können. Alle Leishmaniasen beginnen als kutane Infektionen, hervorgerufen durch den Biss einer infizierten Sandmücke. Während einige Infektionen lokal auf die Haut beschränkt bleiben, kommt es bei anderen zu einer Aussaat der Parasiten in die inneren Organe des Säugetierwirtes; die Ursachen dieses Organtropismus sind weitgehend unbekannt. Der Verlauf der Erkrankung hängt wesentlich von der infizierenden *Leishmania*-Spezies ab; allerdings spielt auch die Immunkompetenz des Wirtes eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit sollten die genetischen Grundlagen des Organtropismus viszeralisierender *Leishmania*-Spezies mit Hilfe einer genetischen Komplementationstrategie analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden dermatrope *L. major* mit einer Cosmid-DNA-Genbank aus viszerotropen *L. donovani* transfiziert. Durch die nachfolgende Infektion von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten *L. major* sollte *in vivo* eine Selektion auf Cosmide erfolgen, die den Leishmanien einen Selektionsvorteil in den inneren Organen der Mäuse verschaffen.

- Während nach zwei aufeinander folgenden Selektionsrunden und Reisolation aus den Lymphknoten eine größere Zahl z.T. identischer Cosmide aus den rekombinanten *L. major* isoliert werden konnte, dominierte nach zweimaliger Passage und Reisolation rekombinanter *L. major* aus den Milzen ein einzelnes Cosmid, pcosVL-1. Dieses Ergebnis spiegelt einen unterschiedlichen Selektionsdruck in Lymphknoten und Milz wider.
- Eine Analyse der Infektiosität von *L. major* [pcosVL-1] ergab keinen Unterschied zu rekombinanten, nur mit dem Cosmidvektor pcosTL transfizierten *L. major*. Im Gegensatz dazu ließ sich eine signifikante Erhöhung des Milzgewichts bei den mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäusen feststellen; dies war insofern von Bedeutung, als Splenomegalie ein charakteristisches Merkmal der humanen VL darstellt. Obwohl Splenomegalie im allgemeinen mit einem Anstieg der Parasitenlasten im Milzgewebe korreliert, war in den Milzen der mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten BALB/c-Mäuse kein signifikanter Unterschied der Parasitenzahl zu verzeichnen. Signifikant erhöhte IL-12-Konzentrationen im Blut der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse ließen eine verstärkte Immunantwort gegen *L. major* [pcosVL-1] vermuten.
- Die Sequenzanalyse von pcosVL-1 führte zur Identifizierung von 8 putativen ORFs; 75% der auf pcosVL-1 kodierten Proteine wiesen keine signifikanten Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen bzw. nur Homologien zu unbekanntem Proteinen auf.
- Zur Identifizierung des Gens bzw. der Gene, die den rekombinanten *L. major* einen Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verschafft haben, wurde eine Einengung auf relevante Bereiche von pcosVL-1 vorgenommen. Ein *screening* der *L. donovani*-Cosmid-Genbank auf pcosVL-1-Homologe lieferte 8 Cosmide, die ein günstiges Überlappungsmuster mit dem Originalcosmid aufwiesen. Nach individueller Transfektion von *L. major* mit diesen Cosmiden und einer anschließenden *in vivo*-Selektion konnte der für den Milztropismus verantwortliche Bereich auf zwei Kandidatengene, ORF2 bzw. ORF3, eingengt werden.

- Durch rekombinante Expression von ORF2 bzw. ORF3 in *E. coli* konnte Antigen gewonnen werden, das zur Immunisierung von Hühnern verwendet wurde und der nachfolgenden Isolierung von Antikörpern diente.
- Zur Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 in *L. major* wurden beide Gene einzeln in das Expressionsplasmid pIRSAT-3 kloniert. Bei der Transfektion erfolgte die stabile Integration des jeweiligen Konstrukts in den 18S rRNA-Genlocus von *Leishmania*. Die Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 durch rekombinante *L. major* konnte im Immun-Blot unter Verwendung der spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Eine vergleichende *in vivo*-Selektion von *L. major* [pIR], *L. major* [pIR/ORF2] und *L. major* [pIR/ORF3] zeigte eindeutig, dass ORF3 für den Effekt auf den Milztropismus rekombinanter *L. major* in BALB/c-Mäusen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde im folgenden die Bezeichnung LdSTF1 (*Leishmania donovani* spleen tropism factor 1) verwendet.
- Zur Charakterisierung des LdSTF1-Genprodukts konnten Datenbankrecherchen nur einen geringen Beitrag liefern. Bei dem LdSTF1-Genprodukt handelt es sich um ein Protein von 226 kDa, das eine nicht-signifikante Übereinstimmung zu einem hypothetischen Protein aus der intergenischen Region ume3-hda 1 von *L. major* aufweist; das Gen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem der während einer Pulsfeld-Gelelektrophorese co-migrierenden Chromosomen 32 und 33 lokalisiert. Eine Bestimmung der Genkopienzahl durch Southern-Blot-Analyse ergab, dass es sich bei LdSTF1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein *single copy*-Gen handelt. Der immunelektronenmikroskopische Nachweis des LdSTF1-Genprodukts im Milzgewebe eines VL-Patienten lässt auf eine Sezernierung des Proteins durch die Parasiten schließen.
- Bei einer Analyse der Expressionskinetik wurde ein Unterschied zwischen rekombinanten *L. donovani* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. donovani* [pcosVL-1] während der *in vitro*-Differenzierung zu axenischen Amastigoten deutlich: während *L. donovani* [pcosVL-1] das LdSTF1-Genprodukt durchweg exprimierten, war in axenischen Amastigoten von *L. donovani* [pIR/LdSTF1] eine starke Reduktion der LdSTF1-Expression zu verzeichnen - ein Hinweis auf die Bedeutung der im Cosmid noch vorhandenen natürlichen flankierenden Sequenzen bei der Regulation der Genexpression.
- Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen zeigten rekombinante *L. major* [pIR/LdSTF1] im Vergleich mit *L. major* [pIR] keine Änderung in der Infektiosität; die Parasitenlasten in Milz und Lymphknoten wiesen ebenfalls keinen Unterschied zwischen den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten Tieren auf. Dagegen waren die Milzgewichte der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten BALB/c-Mäuse signifikant erhöht; die absoluten Werte erreichten jedoch nicht die des auf Cosmid-Ebene, mit *L. major* [pcosVL-1] durchgeführten Experiments. Die signifikant höhere Produktion von IFN- γ und IL-2 in Milzzellen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3 bestätigte die bereits in vorherigen Untersuchungen geäußerte Hypothese einer durch LdSTF1 hervorgerufenen, gesteigerten Immunantwort und der damit verbundenen verstärkten Elimination der Parasiten im infizierten Milzgewebe. Dieser für die Leishmanien nachteilige Effekt kann möglicherweise durch den Vorteil eines verstärkten Milztropismus rekombinanter *L. major* [pIR/LdSTF1] kompensiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Alexander, J., Coombs, G.H. und Mottram, J.C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* **161**: 6794-6801.
- Antoine, J.C., Jouanne, C., Lang, T., Prina, E., de Chaselier, C. und Frehel, C. (1991). Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* **59**: 764-775.
- Bart, G., Frame, M.J., Carter, R., Coombs, G.H. und Mottram, J.C. (1997). Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **88**: 53-61.
- Bastien P. und Killick-Kendrick, R. (1992). *Leishmania tropica* infection in hamsters and a review of the animal pathogenicity of this species. *Exp Parasitol* **75**: 433-441.
- Beetham, J.K., Myung, K.S., McCoy, J.J., Wilson, M.E. und Donelson, J.E. (1997). Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* **272**: 17360-17366.
- Behin, R., Mael, J. und Sordat, B. (1979). *Leishmania tropica*: Pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. *Exp Parasitol* **48**: 81-91.
- Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S. und Pays, E. (1995). The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* **14**: 2925-2934.
- Berman, J.D. und Neva, F.A. (1981). Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* **30**: 318-321.
- Berman, J.D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* **24**: 684-703.
- Beverley, S.M. und Turco, S.J. (1995). Identification of genes mediating lipophosphoglycan biosynthesis by functional complementation of *Leishmania donovani* mutants. *Ann Trop Med Parasitol* **89** (Suppl 1): 11-17.
- Beverley, S.M. und Turco, S.J. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* **6**:35-40.

- Blackwell, J.M., Roach, T.I.A., Atkinson, S.E., Ajioka, J.W., Barton, C.H. und Shaw, M.A. (1991). Genetic regulation of macrophage priming/activation: the *Lsh* gene story. *Immunol Letters* **30**: 241-248.
- Blattner, J. und Clayton. C.E. (1995). The 3'-untranslated regions from the *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase-encoding genes mediate developmental regulation. *Gene* **162**: 153-156.
- Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W. und Röllinghoff, M. (1990). Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol* **20**: 1131-1135.
- Bogdan, C. und Röllinghoff, M. (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* **28**: 121-134.
- Bogdan, C., Donhauser, N., Döring, N., Röllinghoff, M., Diefenbach, A. und Rittig, M.G. (2000). Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* **191**: 2121-2129.
- Borst, P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem* **55**: 701-732.
- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P. und Mosser, D.M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* **155**: 3102-3111.
- Brittingham, A. und Mosser, D.M. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today* **12**: 444-447.
- Bryceson, A. (2001). Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* **190**: 81-84.
- Callahan, H.L., Portal, I.F., Bensinger, S.J. und Grogil, M. (1996). *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. *Exp Parasitol* **84**: 400-409.
- Caux, C., Liu, Y.-J. und Banchereau, J. (1995). Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunology Today* **16**: 2-4.
- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S.J., Sibille, J., Snapper, M., Aisen, P. und Bloom, B.R. (1989). Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Nat Acad Sci USA* **82**: 5910-5914.
- Chang, K.-P., Akman, L. und Nielsen, J.S. (1999). *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. *Clinics in Dermatology* **17**: 269-273.
- Chang, K.-P. und McGwire, B.S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease* **1**: 1-7.

- Charest, H. und Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* **14**: 2957-2984.
- Charest, H., Zhang, W.-W. und Matlashewski, G. (1996). The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* **271**: 17081-17090.
- Clayton, C. (1999). Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today* **15**: 372-378.
- Clos, J. und Brandau, S. (1994). pJC20 and pJC40 – two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* **5**: 133-137.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2110-2114.
- Cotterell, S.E.J., Engwerda, C. und Kaye, P.M. (2000). Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **68**: 1840-1848.
- Cox, F.E.G. (1993). Immunology. In: Cox, F.E.G. (ed.) *Modern Parasitology*. Blackwell Science, Oxford, 193-218.
- Cruz, A. und Beverley, B. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* **348**: 171-173.
- Da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A. und Sacks, D.L. (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* **143**: 617-622.
- Descoteaux, A., Matlashewski, G. und Turco, S.J. (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* **149**: 3008-3015.
- Descoteaux, A., Garraway, L.A., Ryan, K.A., Garrity, L.K., Turco, S.J. und Beverley, S.M. (1994). Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. *Methods in Molecular Genetics* **3**: 22-48.
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J. und Beverley, S.M. (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* **269**: 1869-1872.
- Desjardins, M. und Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**: 2061-2068.

- Djoko-Tamnou, J., Leclerc, C., Modabber, F. und Chedid, L. (1981). Studies on visceral *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. I. Clinical features and cellular changes. *Clin Exp Immunol* **46**: 493-498.
- Engwerda, C.R. und Kaye, P.M. (2000). Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* **21**: 73-77.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* **10 (Suppl 2)**: S274-S276.
- Farrell, J.P. (1976). *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral infection in the golden hamster. *Experimental Parasitology* **40**: 89-94.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Annal Biochem* **132**: 6-13.
- Ferguson, M.A.J. (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc London Ser B* **352**: 1295-1302.
- Ferretti, L. und Sgaramella, V. (1981). Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* **9**: 3695.
- Fischer, C., Voss, A. und Engel, J. (2001). Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* **190**: 85-87.
- Fowell, D.J., Wakil, A.E. und Locksley, R.M. (1995). Interleukin-12 in murine leishmaniasis – match, flame or fuel? *Res Immunol* **146**: 566-575.
- Fruth, U., Solioz, N. und Louis, J.A. (1993). *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* **150**: 1857-1864.
- Fulton, J.D. und Joyner, L.P. (1948). Infections by *Leishmania donovani* in the cotton rat. *Journal of General Microbiology* **2**: 103-109.
- Fulton, J.D., Joyner, L.P. und Chandler, F.L. (1950). Studies on protozoa. II. The golden hamster (*Cricetus aureus*) and the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) as experimental hosts for *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **44**: 105-112.
- Furger, A., Snürch, N., Kurath, U. und Roditi, I. (1997). Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating mRNA stability and translation. *Mol Cell Biol* **17**: 4372-4380.
- Gangneux, J.P., Sulahian, A., Honoré, S., Meneceur, P., Derouin, F. und Garin, Y.J.F. (2000). Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* **22**: 515-519.

- Ghalib, H., Piuvezam, M., Skeiky, Y., Siddig, M., Hashim, F., Russo, D. und Reed, S. (1993). Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* **92**: 324-329.
- Ghedin, E., Zhang, W.W., Charest, H., Sundar, S., Kenney, R.T. und Matlashewski, G. (1997). Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Lab Diagn Immunol* **4**: 530-535.
- Gifawesen, C. und Farrell, J.P. (1989). Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* **57**: 3091-3096.
- Gradoni, L. und Gramiccia, M. (1994). *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitol Today* **10**: 264-267.
- Graham, S. (1995). Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol Today* **11**: 217-223.
- Grunstein, M. und Hogness, D.S. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3961-3965.
- Guy, R.A. und Belosevic, M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun* **61**: 1553-1558.
- Hall, L.R. und Titus, R.G. (1995). Sand fly saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* **155**: 3501-3506.
- Handman, E., Ceredig, R. und Mitchell, G.F. (1979). Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various phenotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust J Exp Biol Med Sci* **57**: 9-29.
- Harms-Zwingenberger, G. und Bienzle, U. (2000). Leishmaniosen. In: Lang, W. und Löscher, T. (eds.) *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 37-49.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Mutha, S.S. und Locksley, R.M. (1991). Production of interferon- γ , IL-2 and IL-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7011-7015.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S., Hirschberg, K. und Jaffe C.L. (1991). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement cascade. *EMBO J* **10**: 4061-4067.
- Herwaldt, B.L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199.

- Hommel, M., Jaffe, C.L., Travi, B. und Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* **89** Suppl.1: 55-73.
- Honoré, S., Garin, Y.J.F., Sulahian, A., Gangneux, J.P. und Derouin, F. (1998). Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**: 231-239.
- Howard, J.G., Hale, C. und Chan-Liew, W.L. (1980). Immunological regulations of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol.* **2**: 203-214.
- Howard, J.G., Hale, C. und Liew, F.Y. (1982). Genetically determined response mechanisms to cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **76**: 152-154.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripps, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. und Murphy, K.M. (1993). Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.
- Hübel, A., Brandau, S., Dresel, A. und Clos, J. (1995). A member of the clpb family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* **70**: 107-118.
- Hübel, A., Krobitch, S., Hörauf, A. und Clos, J. (1997). *Leishmania major* Hsp 100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* **17**: 5987-5995.
- Ilg, T., Stierhof, Y.-D., McConville, M.J. und Overath, P. (1995). Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Cell Biol* **66**: 205-215.
- Ilg, T., Craik, D., Currie, G., Multhaup, G. und Bacic, A. (1998). Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **273**: 13509-13523.
- Ilg, T. (2000). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J* **19**: 1953-1962.
- Ish-Horowicz, D. und Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl Acids Res* **9**: 2989-2998.
- Kapler, G.M., Coburn, C.M. und 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.
- Karp, C.L., El-Safi, S.H., Wynn, T.A., Satti, M.H.M., Kordofani, A.M., Hashim, F.A., Hag-Ali, M., Neva, F.A., Nutman, T.B. und Sacks, D.L. (1993). In vivo cytokine profiles in

- patients with kala-azar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* **91**: 1644-1648.
- Kelly, J.M., Das, P. und Tomás, 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**: 51-62.
- Kemp, M., Hey, A.S., Kurtzhals, J.A.L., Christensen, C.B.V., Gaafar, A., Mustafa, M.D., Kordofani, A.A.Y., Ismail, A., Kharazmi, A. und Theander, T.G. (1994). Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* **96**: 410-415.
- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hübel, A. und Clos, J. (1998). *Leishmania donovani* heat shock protein 100: characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* **273**: 6488-6494.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-686.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W. und Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* **70**: 826-835.
- Launois, P., Ohteki, T., Swihart, K., MacDonald, H.R. und Louis, J.A. (1995). In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4⁺ T cells which are NK1.1⁻. *Eur J Immunol* **25**: 3298-3307.
- Launois, P., Swihart, K.G., Milon, G. und Louis, J.A. (1997). Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* **158**: 3317-3324.
- Leon, L.L., Soares, M.J. und Temporal, R.M. (1995). Effects of temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. *J Euk Microbiol* **42**: 219-223.
- Li, S., Wilson, M.E. und Donelson, J.E. (1996). *Leishmania chagasi*: a gene encoding a protein kinase with a catalytic domain structurally related to MAP kinase kinase. *Exp Parasitol* **82**: 87-96.
- Liew, F.Y., Li, Y. und Millott, S. (1990). Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* **145**: 4306-4310.
- Lips, S., Geuskens, M., Paturiaux-Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J. und Pays, E. (1996). The *esag 8* gene of *Trypanosoma brucei* encodes a nuclear protein. *Mol Biochem Parasitol* **79**: 113-117.

- Lira, R., Mendez, S., Carrera, L., Jaffe, C., Neva, F. und Sacks, D.L. (1998). *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Exp Parasitol* **89**: 331-342.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E. und Sacks, D. (1999). Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **180**: 564-567.
- Liu, X. und Chang, K.-P. (1992). Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4991-4995.
- Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C. und Röllinghoff, M. (1998). The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* **115**: 191-202.
- Lorenzi, H.A., Vázquez, M.P. und Levin, M.J. (2000). The genes for a DEAH RNA helicase, a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 207-211.
- Magill, A.J., Grögl, M., Gasser, R.A., Sun W. und Oster, C.N. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N Engl J Med* **328**: 1383-1387.
- McConville, M.J. und Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* **266**: 15170-15179.
- McGwire, B. und Chang, K.-P. (1994). Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Mol Biochem Parasitol* **66**: 345-347.
- McNeely, T.B. und Turco, S.J. (1987). Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 653-657.
- McNeely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V. und 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.
- Melby, P.C., Andrade-Narvaez, F., Darnell, B.J. und Valencia-Pacheco, G. (1996). In situ expression of interleukin-10 and interleukin-12 in active human cutaneous leishmaniasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**: 101-107.
- Melby, P.C., Chandrasekar, B., Zhao, W. und Coe, J.E. (2001a). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric

- oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* **166**: 1912-1920.
- Melby, P.C., Tabares, A., Restrepo, B.I., Cardona, A.E., McGuff, H.S. und Teale, J.M. (2001b). *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* **99**: 17-25.
- Mentink Kane, M. und Mosser, D.M. (2000). *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* **7**: 26-31.
- Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D. und Murray, H.W. (1994). Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **62**: 1058-1063.
- Mock, B., Blackwell, J., Hilgers, J., Potter, M. und Nacy, C. (1993). Genetic control of *Leishmania major* infection in congenic, recombinant inbred and F2 populations of mice. *European Journal of Immunogenetics* **20**: 335-348.
- Mock, B.A., Krall, M.M., Byrd, L.G., Chin, H., Barton, C.H., Charles, I., Liew, F.Y. und Blackwell, J. (1994). The inducible form of nitric oxid synthase (*NOS2*) isolated from murine macrophages maps near the nude mutation on mouse chromosome 11. *European Journal of Immunogenetics* **21**: 231-238.
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. und Röllinghoff, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**: 1595-1601.
- Moll, H. (1997). The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Inst Mitt* **99**: 73-78.
- Moll, H. (2000). The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. In: Keisari, Y. und Ofek, I. (eds.) The biology and pathology of innate immune mechanisms. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, 163-173.
- Mottram, J.C., Souza, A.E., Hutchinson, J.E., Carter, R., Frame, M.J. und Coombs, G.H. (1996). Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6008-6013.
- Mottram, J.C., Frame, M.J., Brooks, D.R., Tetley, L., Hutchinson, J.E., Souza, A.E. und Coombs, G.H. (1997). The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* **272**: 14285-14293.
- Mottram, J.C., Brooks, D.R. und Coombs, G.H. (1998). Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* **1**: 455-460.

- Müller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W. und Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* **190**: 73-76.
- Murray, H.W., Masur, H. und Keithly, J.S. (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *J Immunol* **129**: 344-350.
- Murray, H.W. (1997). Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* **175**: 1477-1479.
- Myler, P.J., Beverley, S.M., Cruz, A.K., Dobson, D.E., Ivens, A.C., McDonagh, P.D., Madhubala, R., Martinez-Calvillo, S., Ruiz, J.C., Saxena, A., Sisk, E., Sunkin, S.M., Worthey, E., Yan, S. und Stuart, K.D. (2001). The *Leishmania* genome projekt: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol* **190**: 9-12.
- Nandan, D., Lo, R. und Reiner, N.E. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-fos and nitric oxid synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **67**: 4055-4063.
- Nozaki, T. und Cross, G.A.M. (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **75**: 55-67.
- Overath, P. und Aebischer, T. (1999). Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitology Today* **15**: 325-332.
- Park, A.Y. und Scott, P. (2001). IL-12: Keeping cell-mediated immunity alive. *Scand J Immunol* **53**: 529-532.
- Peters, C., Aebischer, T., Stierhof, Y.D., Fuchs, M. und Overath, P. (1995). The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* **108**: 3715-3724.
- Peterson, D.S., Fouts, D.L. und Manning, J.E. (1989). The 85-kd surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. *EMBO J* **8**: 3911-3916.
- Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V. und Sacks, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* **256**: 1812-1815.
- Pimenta, P.F.P., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M. und Sacks, D.L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* **115**: 359-369.

- Polson, A. und von Wechmar, B. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolk of immunized hens. *Immunol Communications* **9**: 475-493.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. und 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.
- Preston, P.M. und Dumonde, D.C. (1976). Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and selfhealing infection in the mouse. *Clin Exp Immunol* **23**: 126-138.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. und Liew, F.Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* **25**: 745-750.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wie, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S. und Liew, F.Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxid synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10984-10989.
- Puentes, S.M., da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H. und Joiner, K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* **145**: 4311-4316.
- Ramamoorthy, R., Swihart, K.G., McCoy, J.J., Wilson, M.E. und Donelson, J.E. (1995). Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. *J Biol Chem* **270**: 12133-12139.
- Reiner, S.L. und Locksley, R.M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**: 151-177.
- Requena, J.M., Alonso, C. und Soto, M. (2000). Evolutionary conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* **16**: 246-250.
- Revelard, P., Lips S. und Pays, E. (1990). A gene from the VSG expression site of *Trypanosoma brucei* encodes a protein with both leucine-rich repeats and a putative zinc finger. *Nucl Acids Res* **18**: 7299-7303.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R. und Pratlong, F. (1980). *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, the agent of the autochthonous oriental sore. Apropos of the biochemical identification of 2 strains isolated in the eastern Pyrenees. *C R Acad Sci Paris* **291**: 701-703.
- Roberts, M., Mock, B.A. und Blackwell, J.M. (1993). Mapping of genes controlling *Leishmania major* infection in CXS recombinant inbred mice. *European Journal of Immunogenetics* **20**: 349-362.

- Rook, G. (1995). Zellvermittelte Immunantwort. In: Roitt, I.M., Brostoff, J. und Male, D.K. (eds.) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 104-119.
- Rosenthal, L.A., Sutterwala, F.S., Kehrli, M.E. und Mosser, D.M. (1996). *Leishmania major* – human macrophage interactions: Cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun* **64**: 2206-2215.
- Russell, D.G., Xu, S. und Chakraborty, P. (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* **103**: 1193-1210.
- Ryan, K.A., Garraway, L.A., Descoteaux, A., Turco, S.J. und Beverley, S.M. (1993a). Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8609-8613.
- Ryan, K.A., Dasgupta, S. und Beverley, S.M. (1993b). Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene* **131**: 145-150.
- Sachs, L. (1984). Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin (6. Auflage).
- Sacks, D.L., Barral, A. und Neva, F.D. (1983). Thermosensitivity patterns of old vs. new world cutaneous strains of *Leishmania* growing within mouse peritoneal macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg* **32**: 300-304.
- Sacks, D.L., Saraiva, E.M., Rowton, E., Turco, S.J. und Pimenta, P.F. (1994). The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* **108**: S55-S62.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F.P., McConville, M.J., Schneider, P. und Turco, S.J. (1995 a). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* **181**: 685-697.
- Sacks, D.L., Kenney, R.T., Kreutzner, R.D., Jaffe, C.L., Gupta, A.K., Sharma, M.C., Sinha, S.P., Neva, F.A. und Saran, R. (1995 b). Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* **345**: 959-961.
- Saha, B., Nanda-Roy, H., Pakrashi, A., Chakrabarti, R.N. und Roy, S. (1991). Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. I. Changes in lymphoid organs and their possible role in pathogenesis. *Eur J Immunol* **21**: 577-581.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L. und Messer, G. (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9944-9948.
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schönian, G., Fleischer, B., und Drosten, C. (2003). Detection, Differentiation, and Quantitation of pathogenic *Leishmania* by Fluorescence Resonance Energy Transfer Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* (in press).
- Scott, P. (1993). IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* **260**: 496-497.
- Seaman, J., Mercer, A.J., Sondorp, E. (1996). The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* **25**: 862-871.
- Seay, M.B., Heard, P.L. und Chaudhuri, G. (1996). Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun* **64**: 5129-5137.
- Shapira, M. und Pedraza, P. (1990). Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 247-256.
- Smelt, S.C., Engwerda, C.R., McCrossen, M. und Kaye P.M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* **158**: 3813-3821.
- Solbach, W. und Laskay, T. (2000). The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunol* **74**: 275-317.
- Sorensen, A.L., Hey, A.S. und Kharazmi, A. (1994). *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS* **102**: 265-271.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Souza, A.E., Bates, P.A., Coombs, G.H. und Mottram, J.C. (1994). Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **63**: 213-220.
- Squires, K.E., Schreiber, R.D., McElrath, M.J., Rubin, B.Y., Anderson, S.L. und Murray, H.W. (1989). Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN- γ in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol* **143**: 4244-4249.

- Sulahian, A., Garin, Y.J.F., Pratlong, F., Dedet, J.P. und Derouin, F. (1997). Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. *FEMS Immunol Med Microbiol* **17**: 131-138.
- Sundar, S., Reed, S.G., Sharma, S., Mehrotra, A. und Murray, H.W. (1997). Circulating T Helper 1 (T_H1) cell- and T_H2 cell- associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **56**: 522-525.
- Swindle, J. und Tait, A. (1996). Trypanosomatid genes. In: Smith, D.F. und Parsons, M. (eds.) *Molecular Biology of parasitic protozoa*. Oxford University Press, Oxford.
- Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Dighe, A.S., Gubler, U. und Murphy, K.M. (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signalling. *Immunity* **2**: 665-675.
- Taverne, J. (1995). Immunität gegen Einzeller und Würmer. In: Roitt, I.M., Brostoff, J. und Male, D.K. (eds.) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 225-245.
- Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T. und Louis, J.A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology* **7**: 545-555.
- Turco, S.J., Descoteaux, A., Ryan, K., Garraway, L. und Beverley, S. (1994). Isolation of virulence genes directing GPI synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Braz J Med Biol Res* **27**: 133-138.
- Turk, J.L. und Bryceson, A.D.M. (1971). Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Advances in Immunol* **13**: 209-266.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. und Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* **73**: 469-485.
- Vouldoukis, I., Riveros-Moreno, V., Dugas, B., Ouaz, F., Becherel, P., Debre, P., Moncada, S. und Mossalayi M.D. (1995). The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc γ RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7804-7808.
- Vouldoukis, I., Becherel, P.A., Riveros-Moreno, V., Arock, M., da Silva, O., Debre, P., Mazier, D. und Mossalayi, M.D. (1997). Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol* **27**: 860-865.
- Weinheber, N., Wolfram, M., Harbecke, D. und Aebischer, T. (1998). Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol* **28**: 2467-2477.

- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.-P. und Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucl Acids Res* **24**: 1688-1694.
- Winter, G., Fuchs, M., McConville, M.J., Stierhof, Y.-D. und Overath, P. (1994). Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J Cell Sci* **107**: 2471-2482.
- Wirtz, E. und Clayton, C. (1995). Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* **268**: 1179-1183.
- Wolfram, M., Ilg, T., Mottram, J.C. und Overath, P. (1995). Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. *Eur J Immunol* **25**: 1094-1100.
- Wolfram, M., Fuchs, M., Wiese, M., Stierhof, Y.-D. und Overath, P. (1996). Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T-cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur J Immunol* **26**: 3153-3162.
- Wyler, D.J., Weinbaum, F.I. und Herrod, H.R. (1979). Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmanial antigens. *J Infect Dis* **140**: 215-221.
- Yan, S., Myler, P.J. und Stuart, K. (2001). Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **112**: 61-69.
- Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K. und Dean, D.R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 599-604.
- Zhang, W.-W., Charest, H., Ghedin, E. und Matlashewski, G. (1996). Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 79-90.
- Zhang, W.-W. und Matlashewski, G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8807-8811.
- Zhang, W.-W. und Matlashewski, G. (2001). Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement in visceralization during infection. *Mol Microbiol* **39**: 935-948.
- Zilberstein, D. und Shapira, 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 Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am BNI, die Vergabe des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Für seine Tätigkeit als Gutachter meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. H.-P. Mühlbach.

Beim gesamten Labor 11 möchte ich mich für das nette Arbeitsklima bedanken – es war eine schöne Zeit! Besonderer Dank geht dabei an Cornelia Hoyer für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken und für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, durch die sie mich – ganz besonders in der Anfangsphase der Arbeit - sehr unterstützt hat. Bei Anne MacDonald und Dorothea Zander möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei Zellkultur und Massenproduktion von genomischer DNA bedanken; Manfred Krömer danke ich für die Anfertigung der Schnitte und die Durchführung der Elektronenmikroskopie sowie für seine Hilfe bei den Mausinfektionen.

Herrn Dr. Markus Schilhabel vom IMB in Jena bin ich für die Sequenzanalyse von pcosVL-1 zu Dank verpflichtet.

Für die Durchführung der Zytokinbestimmungen möchte ich mich bei Svenja Ehrlich aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Arne von Bonin (BNI) bedanken.

Ulrike Klauenberg und Dr. Sebastian Graefe aus der Abteilung Medizinische Zentraldiagnostik (BNI) danke ich für die Durchführung und Auswertung der *real time*-PCR.