

**Isolierung und Charakterisierung von genetischen
Determinanten der Thermotoleranz aus
Leishmania donovani (Ross, 1903)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Cornelia Hoyer
aus Zeven

Hamburg 2003

Inhaltsverzeichnis

		i
1.	Einleitung	1
1.1	Protozoen der Gattung <i>Leishmania</i>	1
1.1.1	Lebenszyklus	1
1.1.1.1	Die Entwicklung von Promastigoten in der Schmetterlingsmücke	2
1.1.1.2	Die Entwicklung von Amastigoten im Säugetierwirt	3
1.1.1.2.1	Wirtszellen	5
1.1.2	Leishmaniasen	7
1.1.3	Temperatur-Toleranz verschiedener <i>Leishmania</i> -Spezies	9
1.2	Thermotoleranz	9
1.2.1	HSP100	11
1.2.2	HSP70	11
1.2.3	Kleine HSP	13
1.2.4	Ubiquitin	14
1.2.5	Trehalose	15
1.2.6	Hitzeschock-Proteine und Trehalose als Thermotoleranz-vermittelnde Faktoren in <i>Leishmania</i> ?	16
1.3	Funktionelle Komplementation	18
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	25
2.1.2	Sonstige Materialien und spezielle Geräte	26
2.1.3	Kits	27
2.1.4	Marker	27
2.1.5	Enzyme	28
2.1.6	Antikörper	28
2.1.7	Oligonukleotide	28
2.1.8	Vektoren und Plasmide	31
2.1.9	Medien und Zusatzstoffe	36
2.1.9.1	Antibiotika	37
2.1.10	Bakterienstämme	37
2.1.11	<i>Leishmania</i> -Stämme	37
2.1.12	Medien und häufig verwendete Puffer und Lösungen	38
2.2	Methoden	40
2.2.1	<i>Leishmania</i> -Zellkultur	40

2.2.1.1	<i>In vitro</i> -Kultivierung von promastigoten Stadien	40
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Kultivierung von axenischen amastigoten Stadien	40
2.2.1.3	Einfrieren von Stammkulturen	40
2.2.1.4	Klonale Selektion rekombinanter Leishmanien	40
2.2.2	Transfektion von <i>Leishmania</i> durch Elektroporation	41
2.2.2.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz	42
2.2.3	<i>Limiting dilution</i> -Analyse	42
2.2.4	<i>In vitro</i> -Selektion rekombinanter <i>L. major</i> -Promastigoter	42
2.2.4.1	Selektion bei 37°C	42
2.2.4.2	Selektion bei 25°C	43
2.2.5.	Passage von <i>L. major</i> -Stämmen in der BALB/c-Maus	43
2.2.6	Thermotoleranzstudien	44
2.2.7	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	44
2.2.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.9	DNA-Isolierung	45
2.2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)	46
2.2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation)	46
2.2.9.3	Präparation von Cosmid-Genbank-DNA	47
2.2.9.4	Isolierung episomaler DNA aus Leishmanien	48
2.2.9.5	Isolierung genomischer DNA aus <i>Leishmania</i> -Einzelklonen und Organ Homogenisaten	48
2.2.10	Enzymatische Modifizierung von DNA	49
2.2.10.1	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	49
2.2.10.2	Dephosphorylierung von DNA	49
2.2.10.3	<i>Fill in</i> -Reaktion zur Herstellung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden	50
2.2.10.4	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.2.12	Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2.13	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	55
2.2.14	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	55
2.2.15	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	56
2.2.15.1	Qualitätskontrolle von Digoxigenin-markierter DNA	57
2.2.16	Kolonie-Hybridisierung	57
2.2.16.1	Kolonie-Transfer	57
2.2.16.2	Hybridisierung von Membranen	58
2.2.17	Transfer von DNA auf eine Membran (Southern Blot)	59
2.2.18	Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierter DNA	59
2.2.19	Transposon-Mutagenese	60
2.2.20	Nested Deletion	61
2.2.21	DNA-Sequenzierung	62

2.2.22	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.2.23	Anfärbung der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen	64
2.2.23.1	Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau	64
2.2.23.2	Silberfärbung	65
2.2.24	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	65
2.2.24.1	Isolierung der rekombinanten Proteine nach Überexpression	66
2.2.25	Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Metall-Chelat-Chromatographie	66
2.2.26	Immunisierung und Antikörpergewinnung	67
2.2.27	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)	68
2.2.27.1	Immunologischer Nachweis von auf einer Membran immobilisierten Proteinen (Immun-Blot)	68
2.2.28	Transmissionselektronenmikroskopie	69
2.2.29	Elektronische Bildbearbeitung	70
3.	Ergebnisse	71
3.1	Isolierung von Cosmiden mit Temperatur-Toleranz-vermittelnden <i>L. donovani</i> -Genen aus rekombinanten <i>L. major</i> -Promastigoten	71
3.1.1	Die verwendete <i>L. donovani</i> -Cosmid-Genbank	72
3.1.2	Transfektion und primäre Temperatur-Selektion	73
3.1.2.1	Transfektionseffizienz und Heterogenität der rekombinanten Leishmanien	73
3.1.2.2	Verlauf der primären Temperatur-Selektionen	75
3.1.2.3	Isolierung und Identifizierung von Cosmiden aus überlebenden Leishmanien	75
3.2	Charakterisierung der identifizierten Cosmide hinsichtlich überlappender Sequenzen mittels Kreuzhybridisierung	78
3.3	Konkurrierende Temperatur-Selektion rekombinanter <i>L. major</i> [pcos]-Stämme <i>in vitro</i>	80
3.4	Konkurrierende Selektion rekombinanter <i>L. major</i> [pcos]-Stämme im Säugetierwirt	85
3.5	Chromosomale Lokalisation der <i>L. donovani</i> -Sequenzen ausgewählter Cosmide	87
3.6	Eingrenzung der Sequenzen, die <i>L. major</i> [pcos]-Stämmen einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen verleihen mit Hilfe von Plasmid-Genbanken aus ausgewählten Cosmiden	90
3.6.1	Temperatur-Selektion der mit Plasmid-Genbank-DNA transfizierten <i>L. major</i> -Promastigoten	91
3.6.2	Sequenzanalyse der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA	95
3.6.3	Der Einfluß des Cosmids pcos11.2 auf das Wachstum von Leishmanien	97
3.6.3.1	Proliferation der <i>Leishmania</i> -Stämme <i>L. m.</i> [pcos11.2] und <i>L. d.</i> [pcos11.2]	97
3.6.3.2	Stabilität der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 in <i>L. major</i> bei fehlender Antibiotika-Selektion	99
3.6.3.3	Selektion von <i>L. major</i> [PbMix] und <i>L. major</i> [Pb11.2] bei 25°C	100
3.6.3.3.1	Sequenzanalyse des 1442 bp großen Sal I-Fragments	101

3.6.4	Die Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5: Temperatur-Toleranz und/oder Wachstumseffekt?	101
3.8	Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8	103
3.9	Sequenzanalyse der Cosmide pcos8, pcos11.3, pcos13.12, pcos14.4 und pcos11.2	105
3.10	Bestimmung der Gene die <i>L. major</i> [pcos13.12] und <i>L. major</i> [pcos8] einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen und/oder im Säugetierwirt verleihen	108
3.10.1	Subklonierung der offenen Leserahmen in den Vektor pIR(mcs2-) und Transfektion der pIR/P- und pIR/A-Konstrukte in <i>L. major</i>	108
3.10.2	Thermotoleranz der <i>L. major</i> (pIR/P)-Stämme	110
3.10.3	Konkurrierende Selektion der <i>L. major</i> (pIR/A)-Stämme in der BALB/c-Maus	111
3.11	Untersuchung der Zahl der Genkopien von <i>DSP</i> und <i>PDE</i>	114
3.12	Rekombinante Expression der offenen Leserahmen aus pcos8 und pcos13.12 zur Antigen-Gewinnung für die Herstellung von Antikörpern	117
3.12.1	Subklonierung der offenen Leserahmen in den Expressionsvektor pJC45	117
3.12.2	Rekombinante Expression der subklonierten Gene und Aufreinigung der überexprimierten Proteine	118
3.12.3	Nachweis von rekombinant exprimierten Proteinen und <i>Leishmania</i> -Proteinen mit den hergestellten Antikörpern	123
3.13	Infektiosität der <i>L. major</i> -Stämme <i>L. m.</i> (pIR/A-DSP) und <i>L. m.</i> (pIR/A-PDE)	128
4.	Diskussion	131
4.1	Genetische Komplementation erlaubt die Identifizierung und Isolierung von Genen nach ihrer Funktion	131
4.1.1	Cosmide aus einer genomischen <i>L. donovani</i> -DNA-Bibliothek verleihen <i>L. major</i> einen Selektionsvorteil bei höheren Temperaturen	135
4.1.1.1	Temperatur-Resistenz als Selektionskriterium	138
4.1.1.2	Das Cosmid pcos11.2: Der Einfluß eines Wachstumseffekts auf die Temperatur-Selektion	141
4.1.2	Bestimmte aus der Temperatur-Selektion hervorgegangene Cosmide vermitteln <i>L. major</i> auch einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt	143
4.1.3	Eingrenzung der für einen Selektionsvorteil verantwortlichen Gene	147
4.2	Erhöhte Thermotoleranz ist keine hinreichende Voraussetzung für die Viszeralisierung von <i>L. donovani</i>	150
4.2.1	Eine mutmaßliche <i>L. donovani</i> -DSP und <i>L. donovani</i> -PDE vermitteln <i>L. major</i> einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt	153
5.	Zusammenfassung	156
6.	Literaturverzeichnis	159

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>activating signal cointegrator</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cfu	<i>colony forming units</i>
CG	<i>circle grow</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase)
cm	Zentimeter
CR	Komplement-Rezeptor
CSPD	Dinatrium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioethan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4yl)phenylphosphat
CYS	Cysteinproteinase
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2', 3'-Didesoxynucleosid-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DSP	<i>dual specificity phosphatase</i>
DTH	<i>delayed-type hypersensitivity</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminomethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FCS	Fötale Kälberserum
FC	<i>fragment crystallisable</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GIPL	Glycoinositolphospholipide
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulphonsäure

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSP	Hitzeschock-Protein
<i>HSP</i>	Für ein HSP kodierendes Gen
IgY	Immunglobulin aus dem Eigelb
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L.d.	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LK	Lymphknoten
L.m.	<i>Leishmania major</i>
ln	natürlicher Logarithmus
log	Briggsscher Logarithmus
LPG	Lipophosphglycan
M	molar, Mol/Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MES	2-(<i>N</i> -Morpholin)ethansulfonsäure
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickoxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese

PM	<i>peritrophic membrane</i>
pmol	Picomol
<i>P. papatasi</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	ribosomal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (<i>standard saline-citrate</i>)
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TAE	Trisacetatessigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratessigsäure
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tn	Transposon
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzymatische Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat

1. Einleitung

1.1 Protozoen der Gattung *Leishmania*

Leishmanien sind obligat parasitische Protozoa und gehören zur Familie der Trypanosomatidae, Ordnung Kinetoplastida (Lainson und Shaw, 1987). Charakteristisch für Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida ist der in der Nähe der Geißelbasis gelegene Kinetoplast. Diese besondere Struktur ist Teil des einzigen Mitochondriums und enthält die mitochondriale DNA, die sogenannte kDNA, die aus kleinen und großen zirkulären, miteinander verketteten DNA-Molekülen (*minicircles*, *maxicircles*) besteht und deren Anteil an der GesamtdNA nahezu 15 % beträgt (Vannier-Santos *et al.* 2002, Shapiro und Englund, 1995).

Zu den Besonderheiten der Kinetoplastida auf DNA-Ebene zählt, dass die Gene nach bisherigen Erkenntnissen anscheinend keine Introns enthalten. Entsprechend wurde ein *cis*-Spleißen von Primär-Transkripten zumindestens in *Leishmania* bisher nicht beobachtet. Untersuchungen der Poly(A)-Polymerase-Gene von *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* weisen jedoch darauf hin, dass dies nicht gänzlich auszuschließen ist (Mair *et al.*, 2000). Die Transkription der meisten Gene und Gencluster der Kinetoplastida erfolgt in polycistronischen Einheiten (Graham, 1995), die möglicherweise sogar gesamte Chromosomenarme umfassen können, wie die Organisation der Gene auf den bereits sequenzierten *Leishmania*-Chromosomen vermuten lässt (Myler *et al.*, 1999; 2000). Die Prozessierung dieser Vorläufermoleküle in reife monocistronische mRNA schließt neben der Polyadenylierung das sogenannte *trans*-Spleißen ein, welches bezüglich des Mechanismus und der molekularen Maschinerie dem *cis*-Spleißen von Intron-Sequenzen ähnlich ist. Im Verlauf des *trans*-Spleißens wird das 5'-Ende jeder kodierenden mRNA mit identischen, aus 35-39 Nukleotiden bestehenden, sogenannten Mini-Exons verknüpft, die auch als *spliced leader* bezeichnet werden und eine *cap*-Struktur aufweisen (Walder *et al.*, 1986; Nilsen, 1995, Graham, 1995).

Die bisher zur Verfügung stehenden, jedoch noch nicht vollständigen Daten des *Leishmania*-Genomprojekts, lassen nicht auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren schließen, und es konnten auch keine Promotoren für die Transkription Protein-kodierender Gene durch die RNA-Polymerase II identifiziert werden. Eine Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene erscheint daher als eher unwahrscheinlich. Vielmehr sprechen alle bisherigen Ergebnisse dafür, dass die Gen-Regulation überwiegend post-transkriptionell erfolgt (Bhaumik *et al.*, 1991; Argaman *et al.*, 1994; Brandau *et al.*, 1995; Charest *et al.*, 1996; Shapira *et al.*, 2001). Zudem wird das Expressions-Niveau durch die Genkopienzahl beeinflusst. So liegen die für abundante Proteine kodierenden Gene oft in zahlreichen Kopien im Genom vor (Stiles *et al.*, 1999).

1.1.1 Lebenszyklus

Leishmanien sind dimorphe Organismen, die sich im Verlauf ihres biphasischen Lebenszyklus durch Längsteilung vermehren. Die Parasiten werden durch den Biss von weiblichen Schmetterlingsmücken (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) der Gattungen *Phlebotomus* bzw. *Lutzomyia* auf verschiedene Säugetierspezies und den Menschen übertragen. Im Verdauungstrakt der Insekten liegen die Parasiten extrazellulär als bewegliche, schlanke und

längliche Promastigote vor, die in Abhängigkeit von der Spezies und dem Entwicklungsstadium eine Größe von 10-20 µm x 1,5-3 µm aufweisen und eine Flagelle besitzen, die oftmals wesentlich länger ist als der Zellkörper. Im Säugetierwirt existieren sie vorwiegend intrazellulär in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems. Hier erfolgt eine Differenzierung zu rundlich-ovalen weniger beweglichen Amastigoten, die wesentlich kleiner sind und keine freie Geißel besitzen. Auch die Größe der Amastigoten ist abhängig von der Spezies und liegt zwischen 2,5 x 1,5 und 6,8 x 4,5 µm (Lainson und Shaw, 1987).

1.1.1.1 Die Entwicklung von Promastigoten in der Schmetterlingsmücke

Erfolgt die Blutmahlzeit einer Schmetterlingsmücke an einem mit Leishmanien infizierten Wirt, gelangen die in den Makrophagen vorliegenden amastigoten Stadien in den Verdauungstrakt des Insekts. Hier wird die Blutmahlzeit von einer vom Mitteldarm-Epithelium sezernierten Membran (*peritrophic membrane*, PM) umschlossen. Die Amastigoten werden aus den Makrophagen freigesetzt und wandeln sich innerhalb von 12-18 Stunden in prozyklische Promastigote um, die im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung verschiedene morphologische Formen annehmen. In diesem frühen Stadium der Infektion sind die Parasiten den Proteasen des Verdauungstrakts ausgesetzt (Sacks und Kamhawi, 2001). Die von den Parasiten exprimierten Phosphoglycane spielen dabei für das Überleben der Parasiten eine wichtige Rolle. (Sacks *et al.* 2000).

Nach ca. 18-24 Stunden setzt eine starke Vermehrung der prozyklischen Promastigoten ein. Noch bevor die Blutmahlzeit vollständig verdaut ist, überwinden die sich am vorderen Teil der PM konzentrierenden Parasiten diese physikalische Barriere, wofür anscheinend die Aktivität einer Chitinase erforderlich ist (Sacks und Kamhawi, 2001; Schlein, 1993; Jacobson *et al.*, 2001; Shakarian *et al.*, 2000).

Die der PM entkommenen Promastigoten inserieren ihre Flagelle zwischen die Mikrovilli des Darm-Epithels im vorderen Mitteldarm und verhindern somit, dass sie mit den Resten der verdauten Blutmahlzeit ausgeschieden werden. Die Interaktion wird durch Lipophosphoglycan (LPG), dem überwiegendem Oberflächenmolekül der *Leishmania*-Promastigoten, vermittelt (Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 2000).

Strukturelle Unterschiede der LPG-Moleküle verschiedener *Leishmania*-Spezies haben zudem einen Einfluss auf die Vektor-Kompetenz. Die Übertragung von *L. major* erfolgt beispielsweise ausschließlich durch *P. papatasi*, wobei die Bindung an das Mitteldarm-Epithelium über Kohlenhydrat-Seitenketten mit terminalen Galactose-Resten erfolgt, die in anderen *Leishmania*-Spezies nicht vorhanden sind (Pimenta *et al.*, 1992; Pimenta *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 1994; Butcher *et al.*, 1996).

Prozyklische Promastigote und die sich fortgesetzt teilenden morphologischen Formen, die mit dem Mitteldarm-Epithelium interagieren, sind nicht infektiös und differenzieren in infektiöse metazyklische Promastigote, die sich nicht mehr teilen. (Sacks und Perkins, 1984; Sacks, 1989). Diese als Metazyklogenese bezeichnete Entwicklung ist von Änderungen der Glykosylierung des LPGs begleitet, und die Parasiten verlieren die Fähigkeit an das Mitteldarm-Epithelium zu binden (Sacks *et al.*, 1990; Pimenta *et al.*, 1992). Die Parasiten bewegen sich in Richtung des vorderen Verdauungstraktes, wo sie sich im Bereich der Valvula cardiaca konzentrieren und während einer erneuten Blutmahlzeit auf einen Säugetierwirt übertragen werden können. Die Degeneration der Valvula cardiaca und der

darunter liegenden Gewebsschichten, die möglicherweise durch Chitin-lyisierende Enzyme hervorgerufen wird, ist dabei von Bedeutung. Es wird vermutet, dass die Nahrungsaufnahme der Insekten durch die permanent geöffnete Valvula cardiaca, die einen Durchfluss in beide Richtungen erlaubt, beeinträchtigt wird und zur Regurgitation führt, wobei die Parasiten auch in den Pharynx und Proboscis gelangen und nachfolgend in die Haut des Wirts inokuliert werden (Schlein *et al.*, 1992).

1.1.1.2 Die Entwicklung von Amastigoten im Säugetierwirt

Im Verlauf einer Blutmahlzeit zerschneidet die infizierte Schmetterlingsmücke mit ihren Mundwerkzeugen das Hautgewebe und oberflächlich gelegene Blutgefäße. Durch wiederholte Versuche das sich akkumulierende Blut aufzunehmen, gelangen die infektiösen metazyklischen Promastigoten in die Wunde und die Blutbahn des Säugetierwirts.

Die Parasiten werden im Blut mit dem Komplementsystem des Säugetierwirts konfrontiert bevor sie von Makrophagen phagozytiert werden können.

Im Gegensatz zu prozyklischen Promastigoten sind metazyklische Promastigote in der Lage, der Komplement-vermittelten Lyse besser zu widerstehen. *L. major*-Promastigote binden die Komplement-Komponente C3b hauptsächlich über das Oberflächenmolekül LPG. Jedoch aktivieren metazyklische Promastigote anders als prozyklische Promastigote nicht das Komplementsystem über den alternativen Weg (Puentes *et al.*, 1988). Zwar formiert sich der C5b-9-Komplex auf der Oberfläche der metazyklischen Promastigoten, aber er inseriert nicht in die Membran und wird spontan freigesetzt, so dass es nicht zur Lyse der Zellen kommt. Es wird davon ausgegangen, dass die von den metazyklischen Promastigoten exprimierten erheblich längeren LPG-Moleküle den Zugang des C5b-9-Komplexes zur Membran verhindern (Puentes *et al.*, 1990).

L. donovani-Promastigote scheinen die Komplement-vermittelte Zell-Lyse durch einen anderen Mechanismus zu vermeiden. Auf ihrer Oberfläche wurde überwiegend die Komplement-Komponente C3 in Form von iC3b nachgewiesen. Dieses Molekül kann nicht zur Bildung der C5-Konvertase beitragen und somit ist auch die Entstehung des C5b-9-Komplexes nicht möglich (Puentes *et al.*, 1989).

Versuche mit *L. mexicana amazonensis* zeigten, dass in diesem Fall das Oberflächenprotein gp63 überwiegend mit C3-Komponenten interagiert (Russell, 1987). *Leishmania*-Stämme, die nur geringe Mengen der Protease gp63 oder kein gp63 exprimieren bzw. eine proteolytisch inaktive Form von gp63, erwiesen sich als wesentlich empfindlicher gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse als Stämme, bei denen die gp63-Expression wieder hergestellt wurde (Brittingham *et al.*, 1995; Joshi *et al.*, 2002). Die Inhibierung der Komplement-vermittelten Lyse durch gp63, das in metazyklischen Promastigoten verstärkt exprimiert wird, basiert auf der Spaltung von C3b. Dabei entsteht eine Form, die der inaktiven C3-Komponente iC3b ähnelt (Brittingham *et al.*, 1995; Brittingham und Mosser, 1996).

Die metazyklischen Promastigoten werden von Makrophagen, ihren Zielzellen im Säugetierwirt, durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose aufgenommen. Über die Komplement-Komponenten C3b und iC3b auf der Zelloberfläche der Parasiten erfolgt die Bindung an die Komplementrezeptoren CR1 bzw. CR3 der Makrophagen (Da Silva *et al.*, 1989; Mosser und Edelson, 1985; Rosenthal *et al.*, 1996). Die Aufnahme über die Komplementrezeptoren ist von Vorteil für die Parasiten, da dieser Weg mit einer reduzierten Freisetzung schädigender

Oxidantien durch die Makrophagen einhergeht, und sich dadurch die Überlebensfähigkeit der opsonierten Parasiten innerhalb der Wirtszelle deutlich verbessert (Wright und Silverstein, 1983; Mosser und Edelson, 1987). Neben der direkten Bindung von Parasiten durch ihre Oberflächenmoleküle LPG und gp 63 an die CR1- und CR3-Rezeptoren, die in Anwesenheit von Serum allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint, wurden weitere Rezeptoren beschrieben, u.a. der Fibronectin- und der Mannose-Fucose-Rezeptor, welche die Interaktion von Leishmanien und Makrophagen vermitteln (Mosser und Brittingham, 1997).

Nach der Phagozytose durch den Makrophagen liegen die Parasiten im Phagosom vor, ein Kompartiment, das durch die regulierte Interaktion mit frühen und späten Endosomen und Lysosomen zum Phagolysosom reift (Antoine *et al.*, 1998; Desjardins *et al.*, 1997). Die Ansäuerung des Phagosoms erfolgt schnell. In weniger als 30 Minuten wird ein pH-Wert von ca. 5 erreicht (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Die wesentlich höhere Temperatur im Säugetierwirt, verglichen mit dem Insektenvektor, und der niedrige pH-Wert induzieren die Umwandlung der metazyklischen Promastigoten zu Amastigoten, die fähig sind, im sauren und Hydrolase-reichen Milieu des Phagolysosoms zu überleben und zu proliferieren (Zilberstein und Shapira, 1994).

Die frühe Phase der Phagolysosom-Biogenese scheint teilweise durch die Leishmanien reguliert zu werden. Versuche mit *L. major* und *L. donovani*, sowie mit Mutanten, welche Defekte in der LPG-Synthese aufweisen, zeigten, dass LPG die Phagosom-Endosom-Fusion, insbesondere die Fusion mit späten Endosomen, vorübergehend hemmt. Die Parasiten werden somit anscheinend erst dann mit dem gesamten Repertoire an lysosomalen Proteasen konfrontiert, wenn sie entsprechende Abwehrmechanismen entwickelt haben (Desjardins und Descoteux, 1997; Scianimanico *et al.*, 1999; Dermine *et al.*, 2000).

Das Oberflächenprotein gp63 wurde mit dem Schutz der Parasiten vor Zytolyse und dem Abbau innerhalb des Phagolysosoms assoziiert. Die Hemmung der gp63-Proteinase-Aktivität von *L. mexicana amazonensis*-Amastigoten, nachdem diese in Makrophagen infiziert worden waren, führte zur Abtötung der Parasiten (Etges *et al.*, 1986; Chaudhuri *et al.*, 1989; Seay *et al.*, 1996). Andererseits waren *L. major*-gp63-Deletionsmutanten fähig, eine Infektion in BALB/c-Mäusen zu etablieren (Joshi *et al.*, 2002).

Leishmanien haben vielfältige Strategien entwickelt, um den mikrobiziden Abwehrmechanismen der Makrophagen zu entgehen. Durch die Induktion von hemmenden Cytokinen (IL-10, TGF- β) und die Suppression aktivierender Cytokine (IL-12) beeinträchtigen die Parasiten die Aktivierung ihrer Wirtszellen. Die Expression von co-stimulatorischen Molekülen und MHC-Molekülen der Klasse II auf der Oberfläche infizierter Makrophagen ist reduziert. Zudem ist die Antigen-Prozessierung und die Beladung von MHC-Molekülen mit Peptiden beeinträchtigt. Einer effizienten Antigen-Präsentation und T-Zell-Stimulierung wird somit entgegen gewirkt (Bogdan und Rölinghoff, 1998; 1999; Antoine *et al.*, 1998).

Auch Signaltransduktionsvorgänge werden in infizierten Makrophagen beeinflusst. Mit einer *Leishmania*-Infektion geht eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) einher; dies ist auf die Wirkung von Lipophosphoglycan zurückzuführen. Glycoinositolphospholipide (GIPL), die überwiegenden Glykokonjugate auf der Oberfläche von amastigoten Stadien inhibieren ebenfalls die PKC. Folglich werden auch PKC-abhängige Ereignisse, wie die Expression von c-fos, die Synthese von IL-1, Chemotaxis und die Induktion des respiratorischen *burst* gehemmt (Reiner, 1994; Descoteaux und Turco, 1993; 1999).

Ein weiterer Schutz des Parasiten vor den Auswirkungen des oxidativen *burst* stellt außerdem die Fähigkeit des LPG dar, reaktive Sauerstoff-Spezies, wie Superoxidanionen und Hydroxyl-Radikale, abzufangen (Chan *et al.*, 1989).

Die Produktion des zytotoxischen Stickoxids (NO) durch die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) ist ein wesentlicher mikrobizider Abwehrmechanismus muriner Makrophagen (Wei *et al.*, 1995), der ebenfalls von Leishmanien unterlaufen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Makrophagen mit GIPL bzw. mit dem Phosphoglycan-Anteil des LPG, wenn sie vor der Stimulierung mit Interferon- γ stattfand, die Hemmung der NO-Synthese bewirkt (Proudfoot *et al.*, 1995; 1996).

Leishmania-Amastigote sind an das saure Milieu im Phagolysosom angepasst. Verschiedene wichtige Stoffwechselprozesse weisen ein pH-Optimum von 4,0 bis 5,5 auf (Mukkada *et al.*, 1985). Die Parasiten sind allerdings in der Lage, durch Protonenpumpen einen neutralen intrazellulären pH-Wert aufrechtzuerhalten. Der sich quer zur Membran bildende elektrochemische Protonengradient wird dabei für die Aufnahme von Substraten ausgenutzt (Glaser *et al.*, 1988; Zilberstein und Shapira, 1994).

Die zunehmende Proliferation der Leishmanien führt schließlich zur Zerstörung des Makrophagen und zur Freisetzung der Amastigoten, die nachfolgend von weiteren Makrophagen in der Nähe aufgenommen werden können, wobei für die Bindung und Phagozytose insbesondere der Fc-Rezeptor von Bedeutung zu sein scheint. Versuche mit *L. major* zeigten, dass der Rezeptor CR3 ebenfalls eine Rolle spielt. Auch eine Beteiligung weiterer Rezeptoren ist wahrscheinlich (Peters, *et al.*, 1995; Kima *et al.*, 2000; Guy und Belosevic, 1993).

Die Etablierung der Parasiten im Wirt und die zunehmende Proliferation und Ausbreitung der Amastigoten führt zur Ausprägung der verschiedenen Formenkreise der Leishmaniose, die in Abschnitt 1.1.2 beschrieben werden.

1.1.1.2.1 Wirtszellen

Makrophagen werden als die eigentlichen Wirtszellen der Leishmanien angesehen, in denen sie überleben und sich vermehren. Da die Aufnahme in die Wirtszelle seitens des Parasiten kein aktiver Vorgang ist, können Leishmanien prinzipiell auch von anderen Zelltypen aufgenommen werden, sofern auf deren Oberfläche die zur Phagozytose erforderlichen Rezeptoren exprimiert werden. Entsprechend wurden neben den Neutrophilen, die wie die Makrophagen zu den professionellen Phagozyten gehören, die verschiedensten Zellarten beschrieben, die mit unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies infiziert werden konnten (Rittig und Bogdan, 2000).

Untersuchungen von Dominguez und Torano (1999) zu den frühen Wechselwirkungen zwischen Promastigoten und Wirtszellen unter Verwendung eines *in vitro*-Systems mit humanem Blut zeigten, dass Leishmanien durch schnelle Aufnahme in Blut-Leukozyten der Komplement-vermittelten Lyse entgehen. Sie beobachteten, dass innerhalb von 30 Sekunden nach dem Blutkontakt natürliche IgM-Antikörper an die Parasiten binden, die Aktivierung des Komplement-Systems über den klassischen Weg mit Opsonisation der Parasiten erfolgt und eine Immunadhärenz-Reaktion ausgelöst wird, wobei Erythrocyten über den Komplementrezeptor CR1 an die Parasiten binden und die Phagozytose durch Blut-Leukozyten gefördert wird. Nach 10 Minuten enthielten 25% und nach 60 Minuten nahezu alle

Leukozyten Parasiten. Die Effizienz der Phagozytose war bezüglich der neutrophilen Granulozyten am größten, jedoch wurden nach 60 Minuten nur wenige intakte Leishmanien in diesen Zellen beobachtet.

Neutrophile sind innerhalb der ersten Stunden nach Infektion die vorherrschende Leukozyten-Population in der Haut, während nach 48 Stunden Makrophagen dominieren (Sunderkötter *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2001; Matte und Olivier, 2002).

Die Bedeutung neutrophiler Granulozyten im Verlauf der frühen Immunantwort auf Leishmanien ist jedoch kontrovers. Einerseits wurde, wie bereits erwähnt, die Abtötung der Leishmanien nach der Phagozytose beobachtet (Chang, 1981; Pearson und Steigbigel, 1981), andererseits wurden diese Zellen mit der Entwicklung einer die Krankheit unterstützenden Th2-Antwort in für *L. major* suszeptiblen BALB/c-Mäusen assoziiert (Tacchini-Cottier, 2000). Hinweise darauf, dass Neutrophile für Leishmanien geeignete Zielzellen sein könnten, ergaben Untersuchungen von Laufs *et al.* (2002). Sie zeigten, dass die Opsonin-abhängige Phagozytose sehr schnell erfolgt, aber zur Aktivierung der Neutrophilen und Eliminierung der Parasiten führt, während bei Verwendung von Hitze-inaktiviertem Serum die Parasiten zwar langsamer aufgenommen werden, jedoch überwiegend überleben. Zudem wurden 24 Stunden nach Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major* im Infiltrat der Infektionsstelle Neutrophile mit morphologisch intakten Leishmanien beobachtet.

Langerhans-Zellen, die zur Familie der dendritischen Zellen gehören, sind ebenfalls in der Lage, Leishmanien zu phagozytieren, wenn auch mit wesentlich geringerer Effizienz als Makrophagen. Unter *in vitro*-Bedingungen konnte die Aufnahme von amastigoten, jedoch nicht von promastigoten *L. major*-Zellen in frisch isolierte epidermale Langerhans-Zellen demonstriert werden. Anscheinend ist der Komplement-Rezeptor CR3 an der Aufnahme beteiligt. Eine Vermehrung der Parasiten in den Langerhans-Zellen wurde nicht festgestellt. Immunhistologische Untersuchungen der Hautläsionen infizierter Mäuse deuten darauf hin, dass Langerhans-Zellen auch *in vivo* Parasiten aufnehmen und diese intrazellulär überleben (Blank *et al.*, 1993). Langerhans-Zellen haben die Fähigkeit Antigen von der Haut in den drainierenden Lymphknoten zu transportieren. Dabei wird die Expression der konstitutiv exprimierten MHC-Klasse-II-Moleküle, sowie die Expression der co-stimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 stark hoch reguliert. Somit entwickeln sie sich zu effizienten antigenpräsentierenden Zellen mit der Fähigkeit eine primäre Stimulation von spezifischen T-Zellen zu induzieren (Moll *et al.*, 1996). Experimentelle Infektionen von BALB/c-Mäusen mit *L. major* bzw. mit epidermalen Langerhans-Zellen, die mit *L. major* infiziert und anschließend markiert worden waren, zeigten, dass Langerhans-Zellen lebende Parasiten von der Infektionsstelle in der Haut in den drainierenden Lymphknoten transportieren. Bei entsprechenden Versuchen mit Makrophagen wurde eine solche Translokation nicht beobachtet. Die eingewanderten dendritischen Zellen des Lymphknotens präsentierten das transportierte Antigen *L. major*-spezifischen T-Zellen *in vitro* und aktivierten ruhende T-Zellen, die eine Parasiten-spezifische DTH- (*delayed-type hypersensitivity*) Reaktion *in vivo* vermitteln konnten (Moll *et al.*, 1993).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass nach einer *Leishmania*-Infektion, eine begrenzte Anzahl von Parasiten wahrscheinlich lebenslang im Säugetierwirt persistieren, auch nach dem Heilungsprozess, der von einer lang anhaltenden zellulären Immunität gegenüber dem Parasiten begleitet ist (Aebischer, 1994; Solbach und Laskay, 2000).

Neben Makrophagen wurden als Wirtszellen persistierender Leishmanien in den drainierenden

Lymphknoten von Mäusen, die sich von einer Infektion erholt hatten, auch Dendritische Zellen identifiziert. Die Dendritischen Zellen sind möglicherweise an der Aufrechterhaltung einer protektiven Immunität beteiligt (Moll *et al.*, 1995).

Auch Fibroblasten, die zwar *in vitro* sowohl Promastigote als auch Amastigote aufnehmen, in denen sich die Parasiten jedoch nicht vermehren können, werden als Wirtszellen für persistierende Parasiten diskutiert. Durch konfokale Laser-Mikroskopie wurde gezeigt, dass 40% der persistierenden Parasiten in den drainierenden Lymphknoten mit retikulären Fibroblasten assoziiert waren. Da Cytokin-aktivierte Fibroblasten im Vergleich zu Makrophagen eine reduzierte Fähigkeit zur Expression der induzierbaren Stickoxid-Synthase und zur Tötung der intrazellulärer Parasiten aufweisen, könnten sie als sichere Zielzellen für persistierende Leishmanien dienen (Bogdan *et al.*, 2000).

1.1.2 Leishmaniasen

Eine Infektion mit Leishmanien kann in Abhängigkeit von der Immunkompetenz des Wirts und der verursachenden *Leishmania*-Spezies zu verschiedenen Krankheitsbildern führen, die allgemein als Leishmaniasen bezeichnet werden. Es lassen sich kutane, mukokutane und viszerale Syndrome unterscheiden.

Die kutane oder Hautleishmaniose wird durch *L. major*, *L. tropica* (Mittlerer Osten, Südwest-Asien, Afrika) und *L. aethiopica* (Ostafrika) in der Alten Welt und durch Mitglieder der *L. mexicana*- und *L. braziliensis*-Gruppe (Zentral und Südamerika) in der Neuen Welt hervorgerufen. Nach einer Infektion des Menschen manifestiert sich eine kutane Leishmaniose innerhalb einer variablen Zeitspanne von zwei Wochen bis zu einigen Monaten zunächst durch das Auftreten eines entzündlichen Knötchens im Bereich der Inokulationsstelle, das im weiteren Verlauf an Größe zunimmt und sich in den meisten Fällen zu einer ulzerierenden Läsion entwickelt. Die Erscheinungsformen der Läsionen sind vielfältig und auch von der *Leishmania*-Spezies abhängig. Bei einem klassischen Verlauf heilen die Läsionen gewöhnlich innerhalb eines Jahres ab und hinterlassen eine hypopigmentierte eingezogene Narbe. Varianten der kutanen Leishmaniose sind die chronisch über Jahrzehnte verlaufende rezidivierende Leishmaniose (*L. tropica*), sowie die diffuse kutane Leishmaniose (*L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*), bei der sich die Parasiten ausgehend von der primären Läsion in weite Bereiche der Haut ausbreiten und die Bildung einer Vielzahl nicht-ulzerierender Läsionen verursachen, die nicht spontan heilen.

Als Folge einer Infektion mit *L. braziliensis* kann es zur Ausbildung einer mukokutanen oder Schleimhautleishmaniose (Espundia) kommen, die noch vor der Heilung der primären Läsion oder aber auch Jahre später auftreten kann. Dabei gelangen Amastigote über die Blut- oder Lymphbahn in die Nasen- und Mundschleimhäute. Die mukokutane Leishmaniose geht mit einer massiven Zerstörung des Gewebes einher. Eine Infektion wird zunächst im Bereich der Nasenschleimhaut auffällig, wo es im Verlauf der Zeit zur Zerstörung des Septums kommen kann, und greift nachfolgend auf die Oberlippe, den weichen Gaumen und den gesamten Pharynx über. Eine spontane Heilung wird kaum beobachtet. Bakterielle Sekundärinfektionen sind unvermeidbar. Im Extremfall kann die Infektion infolge einer Aspirationspneumonie tödlich verlaufen.

Die viszerale Leishmaniose oder Kala-Azar (Hindi: Schwarzes Fieber) repräsentiert die schwerwiegendste klinische Manifestation einer *Leishmania*-Infektion, bei der sich die

Amastigoten ausgehend von der Inokulationsstelle in der Haut in den phagozytierenden Zellen des gesamten retikuloendothelialen Systems ausbreiten. Insbesondere sind Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark betroffen. Verursacht wird die Erkrankung in China, Indien, Nepal, Bangladesh und Ostafrika durch *L. donovani*, während die viszerale Leishmaniose in Südeuropa und im östlichen Mittelmeerraum durch *L. infantum* bzw. in Zentral- und Südamerika durch *L. chagasi* ausgelöst wird. Infolge einer Infektion, bei der die Bissstelle im allgemeinen unauffällig bleibt, treten als erstes Symptom innerhalb einiger Wochen bis Monate periodische Fieberschübe auf. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine Hepatomegalie und eine wesentlich ausgeprägtere Splenomegalie. Das Blutbild weist auf eine Anämie, Thrombopenie und Leukopenie hin. Außerdem ist eine Hypergammaglobulinämie aufgrund einer polyklonalen B-Zellaktivierung zu verzeichnen. Die Patienten verlieren an Gewicht und leiden an zunehmendem Kräftezerfall. Im fortgeschrittenem Stadium erfolgt auch eine Streuung der Parasiten in die Haut, was die charakteristischen Hautverfärbungen bewirkt. Häufig kommt es zu Sekundärinfektionen. Unbehandelt verläuft die viszerale Leishmaniose fast immer tödlich. Als Komplikation kann sich nach chemotherapeutischer Behandlung ein Post-Kala-Azar dermales Leishmanoid entwickeln. Insbesondere im Gesicht und am Oberkörper entstehen zahlreiche nicht-ulzerierende Knoten, die viele Parasiten enthalten und somit eine ständige Infektionsquelle für die Insektenvektoren darstellen (Berman, 1997; Herwaldt, 1999; Pearson *et al.*, 2000).

Von den Erkrankungen, die durch eine Infektion mit *Leishmania* hervorgerufen werden, ist ein großer Anteil der Weltbevölkerung betroffen. Nach den Schätzungen der *World Health Organization* (WHO) sind in den endemischen Gebieten ca. 350 Millionen Menschen dem Risiko einer Infektion ausgesetzt. Es wird angenommen, dass einschließlich der asymptomatisch und subklinisch verlaufenden Fälle ungefähr 12 Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert sind. Die Anzahl der jährlich weltweit auftretenden Neuerkrankungen, die offiziell gemeldet werden, beträgt ca. 600.000. Jedoch wird die tatsächliche Zahl der Neuerkrankungen von der WHO mit 1,5 bis 2 Millionen als wesentlich höher eingeschätzt. Ungefähr 500.000 dieser Fälle sind der viszeralen Leishmaniose zuzuschreiben. Auch Epidemien viszeraler Leishmaniose treten immer wieder auf (WHO, <http://www.who.int.>; Desjeux, 2001). Aufgrund der zunehmenden Überlappung der Regionen, in denen sowohl *Leishmania*- als auch HIV-Infektionen endemisch vorkommen, erhöht sich das Risiko von Koinfektionen. So war die Anzahl der in Äthiopien registrierten Koinfektionen zwischen 1996 und 1998 dreimal höher als in dem Zeitraum von 1990 bis 1995 (Wolday *et al.*, 2001). Die viszerale Leishmaniose ist die klinische Form, die am häufigsten mit HIV/AIDS (*human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome*) assoziiert ist. HIV-infizierte und immunsupprimierte Personen entwickeln eher eine klassische viszerale Leishmaniose als eine subklinisch verlaufende. Zudem kann eine latente *Leishmania*-Infektion durch eine HIV-Infektion reaktiviert werden. Umgekehrt führt die Manifestation einer viszeralen Leishmaniose in HIV-positiven Personen zu einem progressiveren Verlauf der HIV-Infektion. Auch in Südwesteuropa, insbesondere in Spanien werden zunehmend *Leishmania*/HIV-Koinfektionen registriert. Eine viszerale Leishmaniose, hervorgerufen durch eine Infektion mit *L. infantum* manifestiert sich in dieser Region hauptsächlich bei Kindern. Der Anstieg koinfizierter Personen hat jedoch dazu geführt, dass nun Erwachsene den größeren Anteil der Bevölkerung darstellen, die von einer viszeralen Leishmaniose betroffen sind. Eine Hauptrisikogruppe stellen Drogenabhängige dar, wobei eine Überbertragung von Leishmanien auch durch den gemeinsamen Gebrauch von Spritzen erfolgen kann (Alvar *et al.*, 1997; Wolday *et al.*, 1999;

Desjeux *et al.*, 2000).

1.1.3 Temperatur-Toleranz verschiedener *Leishmania*-Spezies

Signifikante Änderungen der Umgebungstemperatur sind ein regulärer Bestandteil des Lebenszyklus von *Leishmania*. Durch die Übertragung von einem poikilothermen Insektenvektor auf einen homoiothermen Säugetierwirt erfahren die Parasiten einen plötzlichen Temperaturanstieg von ca. 10°C. Derartige Temperatursteigerungen führen bei den meisten Organismen zu einer erheblichen Beeinträchtigung zellulärer Funktionen (Welch, 1992; Parsell und Lindquist, 1994). Bei einem fortgesetzten Hitze-Stress können Proteine und Membranen irreversibel geschädigt werden, was letztendlich den Zelltod nach sich zieht. Leishmanien scheinen jedoch ein hohes Maß an Temperatur-Toleranz entwickelt zu haben, da sie in der Lage sind, bei den höheren Temperaturen nicht nur zu überleben, sondern auch zu proliferieren (Zilberstein und Shapira, 1994). Dennoch lassen sich auch im Thermotoleranz-Verhalten verschiedener *Leishmania*-Spezies Unterschiede beobachten. Auffällig ist, dass die permissiven Temperaturbereiche dermatroper und viszeralisierender *Leishmania*-Spezies offensichtlich mit den Temperaturen in der Haut bzw. der Schleimhaut (31°C-35°C) und den inneren Organen (37°C) des Säugetierwirts korrelieren. So zeigten *in vitro*-Makrophageninfektionen, dass beispielsweise *L. major*-Amastigote bei Temperaturen von 35°C eine höhere Wachstumsrate aufweisen, als bei 37°C. Temperaturen von 39°C überlebten die Zellen kaum. *L. mexicana amazonensis*-Amastigote proliferierten bei 34°C, während bei 37,5°C kein Wachstum stattfand. Für *L. donovani*-Amastigote wurde dagegen bei 37°C eine ebenso gute Vermehrung wie bei 35°C festgestellt. Darüber hinaus überlebte die Mehrzahl der Parasiten bei einer Temperatur von 39°C (Berman und Neva, 1981; Biegel *et al.*, 1983; Sacks *et al.*, 1983). Auch *in vitro* kultivierte promastigote Stadien der verschiedenen *Leishmania*-Spezies zeigen entsprechende Temperatur-Toleranz-Unterschiede (Callahan, *et al.*, 1996).

Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass die unterschiedliche Thermotoleranz die Lokalisation viszeralisierender und dermatroper *Leishmania*-Spezies im Säugetierwirt mitbestimmt. Eine höhere Thermotoleranz der Parasiten wäre demnach eine Voraussetzung für die Fähigkeit zur Viszeralisierung.

Welche Faktoren für die höhere Thermotoleranz viszeralisierender Spezies wie *L. donovani* im Vergleich zu dermatropen Spezies wie beispielsweise *L. major* verantwortlich sind, und ob diese Faktoren tatsächlich eine Viszeralisierung fördern, ist bislang nicht bekannt.

1.2 Thermotoleranz

Organismen sind entsprechend den Bedingungen in ihren Lebensräumen und den im Laufe der Evolution entwickelten Mechanismen zur Thermoregulation innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs lebensfähig. Die Resistenz gegenüber hohen Temperaturen oder die basale Thermotoleranz, das heißt die Fähigkeit einen plötzlichen über den normalen Wachstumsbereich hinausgehenden Temperaturanstieg zu widerstehen, unterscheidet sich von Spezies zu Spezies. Jedoch kann die basale Thermotoleranz auch bei verschiedenen Individuen einer Spezies variieren. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen, wie beispielsweise die Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert, sowie Unterschiede bezüglich des genetischen Hintergrunds spielen dabei eine Rolle

(Hahn und Li, 1990; Parsell und Lindquist, 1994).

Eine transiente Steigerung der Thermotoleranz kann erzielt werden, wenn Organismen oder Zellen erhöhten, jedoch nicht letalen Temperaturen ausgesetzt werden bevor sie mit einem extremen Temperatur-Stress konfrontiert werden. Dieses Phänomen wird als erworbene oder induzierte Thermotoleranz bezeichnet.

Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen der Thermotoleranz konzentrierten sich insbesondere auf die Hitzeschock-Proteine (HSP). Die Synthese dieser hoch konservierten Proteine wird im Rahmen der sogenannten Hitzeschock-Antwort stark induziert. Temperaturen, die die jeweils spezifischen physiologischen Wachstumstemperaturen eines Organismus übersteigen, aber auch andere Stressoren, wie Ethanol, Schwermetallionen, virale Infektionen oder oxidativer Stress führen zur Auslösung dieser Reaktion.

Eine Vielzahl von Beobachtungen deuten darauf hin, dass HSP an der Induktion der Thermotoleranz beteiligt sind. So kann die konditionierende Vorbehandlung bei mäßig erhöhten Temperaturen durch eine Behandlung mit solchen chemischen Stressoren ersetzt werden, die in einem Organismus eine verstärkte Synthese der HSP bei normalen Temperaturen auslösen. Die Kinetik der HSP-Synthese korreliert mit der Kinetik der Induktion der Thermotoleranz. Der Verlust der Thermotoleranz erfolgt, wenn die Zellen wieder längere Zeit bei ihren normalen Wachstumstemperaturen kultiviert werden und geht einher mit der Degradation der HSP. Zellen, bei denen im Verlauf der Entwicklung das HSP-Niveau erhöht wird, zeichnen sich durch eine ebenfalls erhöhte basale Thermotoleranz aus. Dies ist beispielweise bei Hefe-Sporen und Hefezellen in der stationären Wachstumsphase der Fall. Umgekehrt reagieren Entwicklungsstadien oder Zellarten, die nicht zur Induktion der HSP befähigt sind, z. B. frühe Embryonalstadien verschiedener Organismen und primäre Spermatozyten in *Drosophila*, extrem sensitiv auf Hitze (Lindquist, 1986; Parsell und Lindquist, 1993).

Hohe Temperaturen führen zu einer verstärkten Denaturierung von Proteinen. Dadurch können wichtige zelluläre Prozesse und Strukturen wesentlich beeinträchtigt werden, wenn daran beteiligte essentielle Proteine betroffen sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass das Ausmaß der durch einen Hitze-Stress verursachten Schäden reduziert bzw. deren Reparatur beschleunigt wird, wenn Zellen bei mäßig erhöhten Temperaturen, die mit einer Induktion der HSP-Synthese einhergehen, vorbehandelt wurden (Parsell und Lindquist, 1994).

HSP tragen zur Stress-Toleranz bei, indem sie die Akkumulation bzw. die Aggregation geschädigter Proteine verhindern. In ihrer Funktion als molekulare Chaperone (Ellis, 1987; Ellis und van der Vies, 1991) beugen einige HSP der Aggregation denaturierter Proteine vor und fördern ihre korrekte Rückfaltung, wodurch die nativen Strukturen und Aktivitäten der Substrate wieder hergestellt werden. Andere HSP erleichtern den Abbau irreversibel geschädigter Proteine, indem sie diese bestimmten proteolytischen Degradationswegen zuführen (Parsell und Lindquist, 1994).

Insbesondere Mitglieder der 100 kDa- und 70 kDa-Hitzeschock-Proteinfamilien, sowie Vertreter der Familie der kleinen HSP sind an der Vermittlung von Thermotoleranz beteiligt. Aber auch Ubiquitin, das ebenfalls ein HSP ist, und einige niedermolekulare organische Verbindungen, wie das Disaccharid Trehalose spielen eine Rolle. Die Bedeutung einzelner HSP oder anderer Faktoren hängt jedoch von dem Ausmaß einer Stresssituation ab und variiert zudem von Organismus zu Organismus.

1.2.1 HSP100

In *Saccharomyces cerevisiae* leistet HSP104 einen wesentlichen Beitrag zur Thermotoleranz und ist speziell für das Überleben extremer Stressbedingungen erforderlich. Bei normalen bis mäßig erhöhten Temperaturen sind *HSP104*-Mutanten dagegen nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt. (Sanchez und Lindquist, 1990; Sanchez *et al.*, 1992). Dies trifft auch auf ClpB, das HSP104-Homolog aus *Escherichia coli* zu. ClpB wird wie HSP104 unter normalen Wachstumsbedingungen nur auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Mutationen im *ClpB*-Gen haben bei normalen Temperaturen keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen, während extreme Temperaturen ein erheblich schnelleres Absterben der Mutanten zur Folge haben (Squires *et al.*, 1991). ClpB scheint in Bakterien jedoch eine andere Funktion auszuüben bzw. andere Zielmoleküle zu haben als HSP104 in der Hefe. Untersuchungen zeigten, dass in *HSP104*-defizienten Hefezellen der Verlust von HSP104 nicht durch die Expression des *ClpB*-Gens ausgeglichen werden kann (Parsell *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu führte das ebenfalls Thermotoleranz-vermittelnde homologe HSP101 aus *Arabidopsis thaliana* bzw. aus Sojabohnen zur Wiederherstellung der Thermotoleranz in *HSP104*-Nullmutanten (Lee *et al.*, 1994; Schirmer *et al.*, 1994; Hong und Vierling, 2000; Queitsch *et al.*, 2000). HSP101 ist zudem für die Aufrechterhaltung der hohen basalen Thermotoleranz von *Arabidopsis*-Samen und keimenden Mais-Samenkörnern erforderlich (Hong und Vierling, 2000; 2001; Nieto-Sotelo *et al.*, 2002).

Anders als andere HSP unterdrückt HSP104 nicht die Aggregation thermisch denaturierter Proteine. Stattdessen unterstützt es in Kooperation mit HSP70 und HSP40 die Resolubilisierung und Reaktivierung von Proteinen, die bereits zu aggregieren begonnen haben (Parsell *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1995; Glover und Lindquist, 1998; Glover und Tkach, 2001). Für ClpB aus *Thermus thermophilus* (Motohashi *et al.*, 1999) und *Escherichia coli* wurde eine entsprechende Funktion beschrieben (Goloubinoff *et al.*, 1999; Mogk *et al.*, 1999; Zolkiewski, 1999).

Weitere Ergebnisse weisen darauf hin, dass HSP104 gemeinsam mit HSP70 in *Saccharomyces cerevisiae* am Wiederaufbau des thermolabilen Spleißosoms und der Regeneration des Spleißprozesses beteiligt ist. Für die Aufrechterhaltung des Spleißens in thermotoleranten Zellen scheint jedoch eher HSP70 verantwortlich zu sein (Yost und Lindquist, 1991; Vogel *et al.*, 1995; Bracken und Bond, 1999).

1.2.2 HSP70

Durch Überproduktion von HSP70 kann der Verlust der Thermotoleranz in *HSP104*-Nullmutanten zum Teil ausgeglichen werden (Sanchez *et al.*, 1993), jedoch spielt HSP70 ansonsten sowohl in *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Escherichia coli* für die Bewältigung extremer Stressbedingungen nur eine untergeordnete Rolle (Parsell und Lindquist, 1993).

Dies steht im Gegensatz zur Situation in *Drosophila melanogaster*. In diesem Organismus, in dem kein Mitglied der HSP100-Familie nachgewiesen werden konnte, ist HSP70 für die Vermittlung von Thermotoleranz von großer Bedeutung. HSP70 ist bei normalen Temperaturen kaum nachweisbar und wird unter Hitzestress mehr als 1000-fach induziert (Velazquez *et al.*, 1983).

Die Überexpression von HSP70 in *Drosophila*-Zellen durch Transfektion mit zusätzlichen

HSP70-Genkopien, führte im Vergleich zum Wildtyp zu einem schnelleren Erwerb von Thermotoleranz, während *HSP70-Antisense*-Gene die Induktion der Thermotoleranz blockierten. Wurde *HSP70* ausgehend von einem heterologen Promotor bei 25°C exprimiert, ohne die Induktion anderer HSP, war es den Zellen möglich, eine plötzliche extreme Temperaturerhöhung ohne Vorbehandlung zu tolerieren (Solomon *et al.*, 1991).

In Wirbeltieren wurde beobachtet, dass die Induktion der Thermotoleranz im Vergleich zu anderen HSP am besten mit der Akkumulation von *HSP70* korrelierte (Li und Werb, 1982). Zudem zeichneten sich aus einer Temperatur-Selektion hervorgegangene Hitze-resistente Zelllinien durch eine Überexpression von *HSP70* aus (Laszlo und Li, 1985; Anderson *et al.*, 1989). Dagegen bewirkte die Mikroinjektion von Anti-*HSP70*-Antikörpern, dass Ratten-Fibroblasten einen kurzen Hitze-Stress bei 45°C nicht überlebten (Riabowol *et al.*, 1988). Durch die Transfektion von Ratten-Fibroblasten mit dem humanen *HSP70*-Gen haben Li *et al.* (1991) Zelllinien konstruiert, die *HSP70* in unterschiedlichem Ausmaß konstitutiv exprimierten. Die Zellen überlebten einen unmittelbaren Hitzestress um so besser, je höher die Expression von *HSP70* war. Auch die erhöhte konstitutive Expression des humanen *HSP70* in Affenzellen führte zu einem Temperatur-resistenteren Phänotyp (Angelidis *et al.*, 1991).

Die Mitglieder der *HSP70*-Familie erkennen nicht native Konformationen anderer Proteine. Dadurch sind sie auch unter normalen Bedingungen an den verschiedensten zellulären Funktionen beteiligt. Sie stabilisieren ungefaltete Polypeptidketten, indem sie an exponierte hydrophobe Peptidsegmente binden und erlauben durch die Dissoziation von den gebundenen Peptidsegmenten die Fortsetzung von Faltungs-, Oligomerisierungs- oder Membran-Translokations-Prozessen. Zudem sind sie an der Degradation von irreversibel geschädigten, abnormen und bestimmten kurzlebigen Proteinen beteiligt (Hartl, 1996; Hayes und Dice, 1996; Cuervo und Dice, 1998; Höhfeld *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2002).

HSP70 schützt Proteine vor Denaturierung, verhindert die Bildung von Aggregaten und unterstützt die Resolubilisierung und Rückfaltung bereits aggregierter Proteine. Eine *in vitro*-Studie zeigte, dass DnaK (*HSP70*) aus *E. coli* sowohl die Inaktivierung der RNA-Polymerase bei hohen Temperaturen verhindern konnte, als auch in der Lage war, zuvor Hitze-inaktivierte Enzym-Aggregate wieder aufzulösen und zu reaktivieren (Skowyra, 1990). In einem weiteren Versuch konnte die Reaktivierung des Temperatur-empfindlichen Enzyms Luziferase aus Glühwürmchen durch die kombinierte Aktivität von DnaK und den Co-Chaperonen DnaJ (*HSP40*) und GrpE *in vitro* und *in vivo* demonstriert werden (Schröder *et al.*, 1993).

Der wesentliche biologische Prozess, der durch die Wirkung von *HSP70* vor einer Stress-induzierten Schädigung geschützt wird, wurde bislang nicht identifiziert (Parsell und Lindquist, 1994).

HSP70 wurde weiterhin mit einer beschleunigten Wiederherstellung der Nukleolus-Morphologie, sowie mit einer schnelleren morphologischen und funktionellen Wiederherstellung des Centrosoms in thermotoleranten Zellen assoziiert (Pelham, 1990; Brown *et al.*, 1996).

Die Beteiligung von *HSP70* an der Regeneration des Spleißprozesses ist bereits erwähnt worden. Zudem zeigten Versuche, dass die Aufrechterhaltung des Spleißens in thermotoleranten Zellen mit dem Schutz bestimmter kleiner Kern-Ribonukleoprotein-Partikel (snRNP) korreliert und die Gegenwart von mindestens einem Mitglied der *HSP70*-Familie erfordert (Bracken und Bond, 1999).

HSP70 wird neben *HSP27* eine Rolle bei der Unterdrückung der Stress-induzierten Apoptose

in thermotoleranten Zellen zugesprochen. Untersuchungen weisen darauf hin, dass HSP70 einerseits Signaltransduktionswege blockiert, die zur Aktivierung der SAPK/JNK (*stress-activated kinase/c-Jun N-terminal kinase*) führen, welche mit der Vermittlung apoptotischer Prozesse in Verbindung gebracht wurden, und andererseits auch nach der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wirkt, indem es die Caspasen-Aktivierung verhindert (Mosser *et al.*, 1997; Samali *et al.*, 2001).

1.2.3 Kleine HSP

Mitglieder der Familie der kleinen HSP sind wie HSP70 in Vertebraten für die Vermittlung von Thermotoleranz von Bedeutung. Die konstitutive Expression des humanen HSP27 in *Chinese hamster*- und in Maus-Zelllinien übertrug auf die rekombinanten Zellen eine konstitutive Thermotoleranz, deren Ausmaß mit dem Expressionsniveau des HSP27 korrelierte (Landry *et al.*, 1989).

Diese Eigenschaft ist nicht auf das humane HSP27 beschränkt, sondern konnte auch für andere kleine HSP, wie beispielsweise HSP27 aus *Drosophila melanogaster* (Rollet *et al.*, 1992), α A-Crystallin aus dem Rind (van den Ijssel *et al.*, 1994) und das murine α B-Crystallin (Aoyama *et al.*, 1993) durch die Überexpression der Proteine in Säugetierzellen demonstriert werden.

Während die kleinen HSP IbpA und IbpB aus *Escherichia coli* und HSP26 aus *Saccharomyces cerevisiae* offensichtlich keine Thermotoleranz-vermittelnden Eigenschaften besitzen (Petko und Lindquist, 1986; Thomas und Baneyx, 1998), resultierte die heterologe Expression pflanzlicher kleiner HSP in *Escherichia coli* in einem thermotoleranteren Phänotyp (Yeh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1999a).

Kleine HSP wirken als molekulare Chaperone. Unter Hitzeschock-Bedingungen unterdrücken sie die Aggregation von Proteinen in ATP-unabhängiger Weise, wobei sie im Gegensatz zu anderen Chaperonen als Oligomere in der Lage sind viele Substrat-Proteine zu binden (Merck *et al.* 1993, Jacob *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997).

Anscheinend erkennen kleine HSP speziell die zur Aggregation neigenden Konformationen von Proteinen, die sehr früh im Verlauf des Denaturierung-Prozesses entstehen (Das *et al.*, 1996). Man geht davon aus, dass die Rolle der kleinen HSP während einer Stress-Situation darin besteht, ein Reservoir an partiell denaturierten, rückfaltbaren Proteinen zu bilden. Durch die Interaktion mit den ATP-abhängigen DnaK/HSP70- und GroEL-Chaperonensystemen können die Proteine nachfolgend in ihren nativen Zustand zurückgeführt werden (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Veinger *et al.*, 1998; Lee und Vierling, 2000; Török *et al.*, 2001).

Kleine HSP interagieren auch mit Komponenten des Cytoskeletts (Arrigo und Landry, 1994; Djabali *et al.*, 1997; Der Perng *et al.*, 1999). Der Hitze-induzierte Zusammenbruch des Cytoskeletts kann in thermotoleranten Zellen verhindert bzw. die Reparatur zumindest beschleunigt werden (Welch, 1990). In einer rekombinanten Maus-Zelllinie, in der das *Chinese hamster*-HSP27 von einem Metallothionein-Promotor kontrolliert wurde, ging die selektive Überexpression von HSP27 mit einer zunehmenden Thermotoleranz einher und war von einer gesteigerten Stabilität der Aktin-haltigen Mikrofilamente begleitet (Lavoie *et al.*, 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass in thermotoleranten Jurkat T-Lymphozyten ein signifikanter Anteil des zellulären HSP27 mit der mitochondrialen Fraktion assoziiert. Versuche mit HSP27-

antisense-Konstrukten lieferten Hinweise darauf, dass HSP27 eine stabilisierende Wirkung auf Mitochondrien ausübt und durch die Hemmung der Freisetzung von Cytochrome C aus den Mitochondrien einen Beitrag zur Unterdrückung der Apoptose leistet (Samali *et al.*, 2001).

In Hitze-gestressten Ratten-Zellen wurde ein kleines HSP mit einem gegen das murine HSP25 gerichteten Antikörper in den Mitochondrien nachgewiesen. Die Auswirkungen der funktionellen Inaktivierung dieser Proteine ließ darauf schließen, dass sie den Elektronentransport auf der Ebene des Komplex I während eines Hitzestress und oxidativen Stress schützen (Downs *et al.*, 1999).

Eine ähnliche Funktion scheinen kleine HSP auch in Cyanobakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen auszuüben. Kleine HSP schützen hier das besonders thermolabile Photosystem II und tragen zur Aufrechterhaltung des Elektronentransports über die gesamte Elektronen-Transportkette bei (Heckathorn *et al.*, 1998; Nakamoto *et al.*, 2000).

Die Deletion von *HSP16.6* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 hatte eine erheblich reduzierte Sauerstoffentwicklungsrate nach einem Hitzeschock zur Folge (Lee *et al.*, 1998). Die Mutanten zeigten ultrastrukturelle Veränderungen der Thylakoid-Membranen. Ihre Überlebensfähigkeit war bei hohen Temperaturen beeinträchtigt und sie waren nicht in der Lage durch einen sublethalen Hitzeschock Thermotoleranz zu erwerben (Lee *et al.*, 2000). Die Untersuchung von Deletionsmutanten und Revertanten zeigte, dass HSP16.6 an der Kontrolle des physikalischen Zustands der Thylakoid-Membran beteiligt ist (Török *et al.*, 2001).

1.2.4 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines 76 Aminosäuren umfassendes abundantes Protein, das in Eukaryonten hoch konserviert ist. Proteine, die für den Abbau durch das 26S-Proteasom bestimmt sind, werden mit einer Multiubiquitin-Kette markiert (Parsell und Lindquist, 1993). Die Markierung erfolgt in mehreren Schritten und wird durch Ubiquitin-aktivierende Enzyme, Ubiquitin-konjugierende Enzyme und durch Mitglieder der Ubiquitin-Protein-Ligase-Familie katalysiert (Glickmann und Ciechanover, 2002).

Während eines Hitzeschocks steigt der Anteil an denaturierten Proteinen in der Zelle stark an. Die Beteiligung des Ubiquitin-Systems an der Degradation Hitze-denaturierter Proteine wurde durch Versuche an Säugetierzellen demonstriert. Mutanten mit einem thermolabilen Ubiquitin-aktivierendem Enzym reagierten nicht mit einer Zunahme der proteolytischen Aktivität und waren bei hohen Temperaturen nicht vermehrungsfähig (Parag *et al.*, 1987).

In *S. cerevisiae* wurden verschiedene Ubiquitin-Gene identifiziert. Das *UBI4*-Gen kodiert für ein Polyubiquitin-Vorläuferprotein und ist Hitze-induzierbar. Mutationen im *UBI4*-Gen beeinträchtigen das Überleben der Zellen bei einer längerfristigen Exposition mit Temperaturen, die gerade über den normalen Wachstumsbereich hinausgehen (Finley *et al.*, 1987). In *S. cerevisiae* kann jedoch durch Überexpression von Ubiquitin keine Induktion der Thermotoleranz erzielt werden (Chen und Piper, 1995).

Die Funktion der Hitze-induzierbaren Ubiquitin-konjugierenden Enzyme UBC4 und UBC5 ist ebenfalls für das Überleben von *S. cerevisiae* unter Stress-Bedingungen wichtig. Hefezellen, denen beide Gene fehlen, sind bei hohen Temperaturen nicht lebensfähig, während der Verlust jeweils eines Genes anscheinend durch das funktionsfähige Gen ausgeglichen wird (Seufert und Jentsch, 1990).

1.2.5 Trehalose

Trehalose ist ein aus Glucose bestehendes nicht-reduzierendes Disaccharid, das in verschiedenen Organismen, wie u. a. Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und einigen anderen Invertebraten vorkommt (Nwaka und Holzer, 1997).

Trehalose wird durch die Trehalose-6-phosphat-Synthase und die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase synthetisiert, die in *S. cerevisiae* Teil eines im Cytosol lokalisierten Enzym-Komplexes sind (Bell *et al.*, 1998). Die Expression der für diese Enzyme kodierenden Gene, *TPS1* und *TPS2*, erfolgt konstitutiv und wird bei Hitze zusätzlich induziert (Singer und Lindquist, 1998a).

In *S. cerevisiae*-Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, ist Trehalose kaum nachweisbar, während das Disaccharid in stationären Zellen und in Sporen in großen Mengen vorliegt. Neben erhöhten Temperaturen führen chemische Stressoren und Dehydrierung zu einer Akkumulation von Trehalose (Nwaka und Holzer, 1997).

Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *Schizosaccharomyces pombe* verhinderte die Deletion des *TPS1*- bzw. des *TPS2*-Gens eine Akkumulation von Trehalose und hatte eine erhebliche Verminderung der induzierten Thermotoleranz zur Folge (De Virgilio *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1997; Singer und Lindquist, 1998b). Die Überexpression von *TPS1* unter Bedingungen, bei denen Trehalose normalerweise nicht nachweisbar ist, erhöhte dagegen die Thermotoleranz von *Schizosaccharomyces pombe* während eines nachfolgenden Hitzeschocks um das 100- bis 1000-fache im Vergleich zum Wildtyp (Soto *et al.*, 1999b).

Durch Expression des *TPS1*-Homologs *SITPS1* aus der Pflanze *Selaginella lepidophylla* konnte der Verlust der Thermotoleranz in einer *S. cerevisiae*-*TPS1*-Deletionsmutante ausgeglichen werden und lässt vermuten, dass Trehalose für die Stress-Toleranz dieser Pflanze ebenfalls von Bedeutung ist (Zentella *et al.*, 1999).

Logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen benötigen für die Entwicklung von Thermotoleranz jedoch keine Trehalose (Hengge-Aronis *et al.*, 1991).

Trehalose und HSP104 wirken in synergistischer Weise bei der Vermittlung von Thermotoleranz. *S. cerevisiae*-Mutanten, in denen sowohl *TPS2* bzw. *TPS1*, als auch *HSP104* deletiert worden war, zeichneten sich durch eine wesentlich geringere Thermotoleranz in der stationären Phase, sowie eine stärker beeinträchtigte induzierte Thermotoleranz aus, als die Einzelmutanten (Elliott *et al.*, 1996; Singer und Lindquist, 1998b).

In vitro- und *in vivo*-Versuche zeigten am Beispiel verschiedener Enzyme, dass Trehalose unter Hitzeschock-Bedingungen Proteine stabilisiert. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Trehalose die Aggregation bereits denaturierter Proteine unterdrückt und diese in einem partiell entfaltenen Zustand hält, wodurch eine Reaktivierung durch molekulare Chaperone gefördert wird (Hottiger *et al.*, 1994; Singer und Lindquist, 1998b). *NTH1*-Deletionsmutanten, die das akkumulierte Disaccharid nicht hydrolysieren können, sind jedoch in ihrer Fähigkeit, sich von einem Hitzeschock zu erholen, beeinträchtigt (Nwaka und Holzer, 1997; Wera *et al.*, 1999). Es hat sich gezeigt, dass für eine effiziente Rückfaltung und Reaktivierung denaturierter Proteine der schnelle Abbau der Trehalose erforderlich ist (Singer und Lindquist, 1998b).

Für Trehalose wird zudem eine Funktion als Radikalfänger diskutiert, die zum Schutz der Zellen vor einer Schädigung durch Sauerstoffradikale während eines Hitzeschocks beitragen könnte. Versuche zeigten, dass eine Akkumulation von Trehalose die durch Sauerstoffradikale

hervorgerufene kovalente Modifikation von Proteinen reduziert (Benaroudj *et al.*, 2001).

1.2.6 Hitzeschock-Proteine und Trehalose als Thermotoleranz-vermittelnde Faktoren in *Leishmania*?

Leishmanien reagieren, wie andere Organismen, auf eine Temperaturerhöhung mit der verstärkten Synthese von HSP (Hunter *et al.*, 1984; Lawrence und Robert-Gero, 1985; Van der Ploeg *et al.*, 1985; Toye und Remold, 1988; Shapira *et al.* 1988).

In verschiedenen *Leishmania*-Spezies wurden Mitglieder der HSP100- (Hübel *et al.*, 1995; Krobitch *et al.*, 1998), HSP90- (Shapira und Pinelli, 1989; Hübel und Clos, 1996), HSP70- (Lee *et al.*, 1988; Searle *et al.*, 1989; McFarlane *et al.*, 1990; Bock und Langer, 1993; Searle *et al.*, 1993; Searle und Smith, 1993) und HSP60-Familie (Rey-Ladino *et al.*, 1997; Schlüter *et al.*, 2000), sowie der Familie der kleinen HSP (Pinelli und Shapira, 1990) identifiziert und einige der entsprechenden Gene kloniert.

Bereits bei niedrigen Temperaturen weisen *Leishmania*-Promastigote ein ungewöhnlich hohes Niveau bestimmter HSP auf.

Mit einem Anteil von 2,1 bzw. 2,8 % am Gesamtprotein sind HSP 70 und HSP90 (HSP83) die dominierenden HSP in der ungestressten Zelle. Temperaturen, denen die Parasiten im Säugetierwirt ausgesetzt sind, führen zu einer verstärkten Synthese von HSP70 und HSP90. Aufgrund des ohnehin schon hohen Gehalts der Proteine resultiert dies jedoch nicht in einem wesentlichen Anstieg des intrazellulären Niveaus (Brandau *et al.*, 1995).

Auch das im Mitochondrium lokalisierte HSP60/CPN60 wird in Promastigoten konstitutiv exprimiert. Unter Hitzeschock-Bedingungen und in axenischen *L. donovani*-Amastigoten nimmt das Niveau des Proteins um das 2,5-fache zu (Schlüter *et al.*, 2000).

HSP100 ist dagegen unter normalen Bedingungen in Promastigoten kaum nachzuweisen. Hohe Temperaturen führen jedoch zu einer vielfachen Induktion der HSP100-Synthese. Im Vergleich zur transienten Induktion von HSP70 und HSP90 wird die erhöhte HSP100-Synthese über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten. Auch in axenischen *L. donovani*-Amastigoten und in *L. major*-Amastigoten, die aus infizierten Mäusen isoliert wurden, ist HSP100 ein abundantes Protein (Hübel *et al.*, 1995; Hübel *et al.*, 1997; Krobitch *et al.*, 1998).

Es gibt nur sehr begrenzte Informationen über die kleinen HSP in *Leishmania*. Hunter *et al.* (1984) haben durch metabolische Proteinmarkierung eine erhöhte Synthese von 22 kDa-, 23 kDa-, 26 kDa- und 27 kDa-Proteinen in *L. mexicana panamensis*-Parasiten, die bei 34°C kultiviert wurden, nachgewiesen. Für *L. major* wurden ebenfalls putative HSP mit einem Molekulargewicht von 23 und 22 kDa beschrieben, deren Expression auch bei 26°C nachweisbar war (Toye und Remold, 1989). Ein 22 kDa-Protein aus *L. mexicana amazonensis* zeigte eine überwiegend mitochondriale bzw. eine geringere nukleäre Lokalisation (Pinelli und Shapira, 1990).

Es wird vermutet, dass sich Promastigote aufgrund ihres hohen HSP-Niveaus schneller an eine plötzliche Temperaturerhöhung anpassen und sich besser im Wirtsorganismus etablieren können (Zilberstein und Shapira, 1994).

Nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich jedoch bislang mit der Funktion bestimmter

HSP hinsichtlich der Vermittlung von Thermotoleranz in Leishmanien.

So kann keine Aussage über die Bedeutung von HSP70, HSP60 und der kleinen HSP für die Thermotoleranz von Leishmanien gemacht werden.

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass *L. chagasi*-Promastigote, die HSP70 episomal überexprimieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid aufweisen (Miller *et al.*, 2000).

HSP90 scheint keinen Effekt auf die Thermotoleranz von *L. donovani* zu haben (Wiesgigl, unveröffentlichte Beobachtungen), sondern spielt eine Rolle bei der Regulation der Hitzeschock-Antwort und der morphologischen Differenzierung (Wiesgigl und Clos, 2001). Auch in anderen Eukaryonten ist HSP90 nicht für eine allgemeine Stress-Toleranz verantwortlich (Nathan *et al.*, 1997).

Bisher wurde nur für HSP100 ein, wenn auch geringfügiger, Einfluss auf die Thermotoleranz festgestellt. Der Austausch des für HSP100 kodierenden *ClpB*-Gens, das im Gegensatz zu den für HSP70 (Lee *et al.*, 1988; McFarlane *et al.*, 1990; Bock und Langer, 1993) und HSP90 (Shapira und Pinelli, 1989; Hübel und Clos, 1996) kodierenden Genen nur in einer Kopie im *Leishmania*-Genom vorliegt (Hübel *et al.*, 1995), hatte für die *L. major*-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine reduzierte Proliferationsrate bei Temperaturen von 35°C zur Folge. Wesentlich stärker beeinträchtigte die Deletion des *ClpB*-Gens jedoch die Virulenz der Mutanten (Hübel *et al.*, 1997).

Der Verlust von HSP100 wirkte sich dagegen weder unter Standard-Kultur-Bedingungen, noch bei hohen Temperaturen negativ auf das Überleben und das Wachstum der *L. donovani*-Deletionsmutanten aus. Während auch die morphologische Differenzierung in axenische Amastigote nicht durch das Fehlen von HSP100 beeinflusst wurde, wiesen die Mutanten allerdings eine erheblich eingeschränkte Expression der Amastigoten-spezifischen A2-Proteine auf und waren zudem nicht in der Lage, sich innerhalb von Makrophagen normal zu entwickeln (Krobitsch *et al.*, 1998; Krobitsch und Clos 1999)

Neben den klassischen HSP exprimieren Leishmanien auch Ubiquitin. Ubiquitin-Gene wurden in *L. mexicana* und *L. donovani* durch Southern- und Northern-Blot-Analysen nachgewiesen. Das *L. donovani*-Polyubiquitin-Gen zeichnet sich durch eine hohe Anzahl von Genkopien aus. Es umfasst mindestens 44 Ubiquitin-*repeats* (Kirchhoff *et al.*, 1988). Analysen zur Funktion von Ubiquitin im Hinblick auf die Thermotoleranz in *Leishmania* liegen jedoch nicht vor.

Es ist nicht bekannt, ob Leishmanien Trehalose synthetisieren. Weder eine Trehalose-6-phosphat-Synthase noch eine Trehalose-6-phosphat-Phosphatase wurden bislang für *Leishmania* beschrieben. Auch wurden entsprechende Gensequenzen bislang nicht im Rahmen des *Leishmania*-Genomprojekts veröffentlicht (www.LeishDB.com). Zudem konnten Blum und Opperdoes (1994) zwar eine Sucrase-Aktivität in *L. donovani*-Promastigoten feststellen, jedoch keine Trehalase-Aktivität.

Die zur Verfügung stehenden Daten geben nur geringen Aufschluss darüber, inwieweit Faktoren, die in anderen Organismen zur Vermittlung von Thermotoleranz beitragen, auch in *Leishmania* von Bedeutung sind und darüber hinaus eine Erklärung für die unterschiedliche Thermotoleranz von *L. major* und *L. donovani*, als Vertreter dermatotroper und viszeralisierender *Leishmania*-Spezies, liefern könnten.

Die Annahme, dass die Funktion eines bestimmten Proteins in einem Organismus, auch der Funktion eines homologen Proteins in einem anderen Organismus entsprechen könnte, trifft zwar in einigen Fällen zu, findet aber auch oftmals keine Bestätigung.

Systematische genetische Studien zur Identifizierung der in die Entwicklung von Thermotoleranz involvierten Komponenten wurden bisher kaum durchgeführt. Ein *screen* zur Selektion von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten, die in ihrer Fähigkeit Thermotoleranz zu erwerben beeinträchtigt sind, wurde von Hong und Vierling (2000) beschrieben. Die Charakterisierung der Mutanten ergab die Beteiligung vier unterschiedlicher Genloci. Die Tatsache, dass ein Genlocus den kodierenden Sequenzen des *HSP101*-Gens zugeordnet werden konnte, hebt einmal mehr hervor, dass den Mitgliedern der HSP100-Familie bei der Vermittlung von Thermotoleranz eine wichtige Rolle zukommt. In *Leishmania* ist diese Funktion jedoch offensichtlich nicht dominierend.

Eine Möglichkeit, die Faktoren zu identifizieren, die in *Leishmania* für die Vermittlung von Thermotoleranz verantwortlich sind, bietet die Methode der funktionellen genetischen Komplementation.

1.3 Funktionelle Komplementation

Die Methode der funktionellen Komplementation wurde bereits für die Identifizierung der DNA als Träger der genetischen Information genutzt. Als man noch davon ausging, dass chromosomale Proteine die genetische Information in sich tragen, beschrieben im Jahre 1944 Avery und Kollegen, dass apathogene R-Pneumokokken, denen ein Enzym für die Synthese des Kapselpolysaccharids fehlt, durch die Zugabe der DNA-Fraktion eines Extrakts aus hitzeinaktivierten pathogenen S-Pneumokokken wieder zur Bildung einer Polysaccharidhülle fähig waren und auf Dauer ihre Pathogenität wiedererlangten (Stryer, 1991).

Die Möglichkeit des Ausgleichs eines genetischen Funktionsdefekts durch die Einführung intakter DNA in eine Mutante, hat sich mittlerweile als eine Strategie für die Identifizierung und Isolierung von Genen etabliert. Voraussetzung hierfür sind Mutanten mit einem im Vergleich zum Wildtyp deutlich verändertem Phänotyp, der die Selektion und Identifizierung der rekombinanten Zellen erlaubt, ein effektives Transformations- bzw. Transfektionssystem mit geeigneten Vektoren und insbesondere bei heterologer Komplementation die korrekte Expression und Prozessierung der rekombinanten Gene (Agnan *et al.*, 1997).

Wie viele andere genetische Methoden kam auch die funktionelle Komplementation zunächst bei einfach zu manipulierenden Mikroorganismen, wie *E. coli*, *S. cerevisiae* und anderen Hefestämmen zur Anwendung. So wurden beispielsweise Hefe-Gene, die für Enzyme kodieren, welche bei der Biosynthese von Leucin (β -Isopropylmalat-Dehydrogenase) und Histidin (Imidazol-Glyzerinphosphat-Dehydratase) eine wichtige Rolle spielen und später als genetische Marker eingesetzt wurden, durch Komplementation entsprechender Leucin- und Histidin-auxotropher *E. coli*-Stämme identifiziert (Struhl *et al.*, 1976; Ratzkin und Carbon, 1977).

Die Isolierung von Genen aus höheren Organismen, wie z. B. Säugetierzellen, durch Komplementation ist wesentlich aufwändiger und wird durch langsame Wachstumsraten, häufige Reversion des Phänotyps und einen Mangel an geeigneten mutanten Zellen erschwert. Es hat sich jedoch als möglich herausgestellt, durch Komplementation definierter Hefe-Mutanten äquivalente Gene aus höheren Organismen zu isolieren (Okazaki *et al.*,

1990). Lee und Nurse (1987) gelang es, das humane Homolog des *Schizosaccharomyces pombe* Zellzyklus-Kontrollgens *cdc2* durch Komplementation einer Hefe-Mutante mit einer humanen cDNA-Bibliothek zu identifizieren. Mit Hilfe von *S. cerevisiae*-Mutanten konnten in entsprechender Weise weitere in die Zellzyklus-Kontrolle involvierte humane bzw. Drosophila-Gene identifiziert werden (Lew *et al.*, 1991; Leopold und O'Farrell, 1991; Plon *et al.*, 1993). Es gibt ebenfalls einige Beispiele für die gezielte Klonierung von Trypanosomatidae-Genen durch diese Methode. Unter Verwendung von *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Mutanten wurden so u. a. die für die Stoffwechsellenzyme Xanthin-Phosphoribosyltransferase aus *L. donovani* (Jardim *et al.*, 1999) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *T. brucei* (Barrett und LePage, 1993) kodierenden Gene isoliert, sowie zwei Cyclin-Gene aus *T. brucei* (Van Hellemond *et al.*, 2000).

Neben der Identifizierung und Isolierung von funktionell äquivalenten Genen kann die genetische Komplementation auch für die experimentelle Demonstration der Funktion klonierter Gene herangezogen werden. Zoraghi *et al.* (2001) zeigten beispielsweise, dass eine cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE) aus *T. brucei* den Hitzeschock-suszeptiblen Phänotyp eines *S. cerevisiae* PDE1/PDE2-Deletionsstamms komplementieren kann.

Einen Hinweis darauf, dass die CRK3-Kinase aus *L. major* ein funktionelles Homolog der *Schizosaccharomyces pombe* *cdc2*-Kinase ist, lieferte die erfolgreiche Expression des *L. major*-Gens in der entsprechenden Hefe-Mutante, wodurch deren Wachstumsdefekt ausgeglichen wurde (Wang *et al.*, 1998).

Das Hefe-Genom ist bereits gut erforscht. *S. cerevisiae* war der erste Eukaryont, von dem die vollständige Genomsequenz erhalten wurde. Wahrscheinlich ist kaum ein anderer Eukaryont sowohl genetisch als auch physiologisch so einfach zu manipulieren. Es existieren bereits viele mutante Hefe-Stämme und darüberhinaus wurde eine Sammlung mutanter *S. cerevisiae*-Stämme konstruiert, von denen jeder jeweils eine definierte Deletion in einem der 5998 potentiellen Protein-kodierenden Hefe-Gene aufweist. Außerdem wurde ein System entwickelt, das unter Verwendung eines regulierbaren Promotors die vollständige oder teilweise Komplementation essentieller Hefe-Gene ermöglichen soll. Die Nutzung von Hefe als stellvertretender Wirtsorganismus im Rahmen von Komplementationsstudien könnte daher die funktionelle Analyse von Genen aus weniger zugänglichen Eukaryonten unterstützen und möglicherweise beschleunigen (Oliver, 2002).

Ein wesentlicher Vorteil der genetischen Komplementation liegt darin, dass für die Identifizierung und Isolierung keinerlei Kenntnisse über das entsprechende Gen erforderlich sind. Dadurch können im Gegensatz zu einer auf Sequenz-Homologie basierenden Klonierungs-Methode auch Gene erfasst werden, deren Homologie zu verwandten Genen aus anderen Spezies zu gering ist, um eine vorläufige Identifizierung durch Hybridisierung mit heterologen DNA-Sonden zu erlauben (Barrett und Le Page, 1993).

Außerdem besteht die Möglichkeit, nicht nur das Wildtyp-Allel des defekten Gens zu isolieren, sondern darüber hinaus auch solche Gene, die ebenfalls in der Lage sind, die Mutation phänotypisch zu komplementieren oder zu unterdrücken. Dies kann sich als nützlich erweisen für die Isolierung von Genen, die direkt oder indirekt mit dem mutierten Gen interagieren. Dabei kann es sich um Gene handeln, die sich die Funktion mit dem mutierten Gen teilen, die *downstream* vom mutierten Gen wirken, deren Protein-Produkte einen Komplex mit dem mutierten Protein bilden und es dadurch stabilisieren, oder die Überproduktion des mutierten Gens induzieren (Okazaki *et al.*, 1990). Nathan *et al.* (1999) haben diese Strategie

angewandt, um Zielproteine von HSP90 und Regulatoren der HSP90-Funktion in *S. cerevisiae* zu identifizieren. Indem auf Gene selektiert wurde, die infolge ihrer Überexpression den Temperatur-empfindlichen Wachstumsdefekt verschiedener HSP90-Mutanten unterdrücken konnten, wurden drei weitere Mitglieder des HSP90-Chaperonen-Netzwerks gefunden.

Die besondere Stärke der funktionellen Komplementation besteht entsprechend nicht ausschließlich in der Möglichkeit zur gezielten Klonierung bestimmter Gene, sondern insbesondere in der vorurteilsfreien Identifizierung und Isolierung von Genen, die an einem bestimmten zellulären Prozess oder Stoffwechselweg beteiligt sind.

Dadurch, dass Mutanten auf der Grundlage veränderter Eigenschaften bezüglich des untersuchten Prozesses isoliert werden und sich die Methode somit ausschließlich auf den Phänotyp stützt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die erhaltenen Gene direkt in den untersuchten Prozess involviert sind. Dabei können sich oftmals auch unerwartete Rollen oder Funktionen für Gene ergeben, die über Motivsuche oder Datenbankvergleiche nicht hätten nachgewiesen werden können (Beverley *et al.*, 2002).

Kunau *et al.* (1993) haben zum Beispiel das Ziel verfolgt, den Mechanismus der Peroxisom-Biogenese zu untersuchen und Komponenten der peroxisomalen Import-Maschinerie zu identifizieren. *S. cerevisiae*-Mutanten wurden isoliert, die einen Defekt hinsichtlich der Peroxisom-Zusammensetzung aufwiesen und peroxisomale Matrixproteine nicht in die Organelle importieren konnten. Durch funktionelle Komplementation gelang es die Wildtyp-Allele der betroffenen Gene zu klonieren, wobei 10 *PAS* (*peroxisomal assembly*)-Gene identifiziert wurden.

Bei einer Variante der Methode erfolgt die Isolierung von Genen auf der Grundlage eines übertragenen Phänotyps. Um beispielsweise den Mechanismus zu untersuchen, durch den die Kontrolle der Zellmorphologie mit der Zellzykluskontrolle koordiniert wird, insbesondere im Hinblick darauf, dass diese Prozesse bei Krebs-Erkrankungen in Säugetieren dereguliert sind, wurde eine humane cDNA-Bibliothek in *S. cerevisiae* exprimiert und nach Genen gesucht, die das Muster der Hefe-Knospung veränderten. Dabei wurde u. a. ein Gen identifiziert, das für einen neuen humanen Verstärker der Filamentation (HEF1) kodiert (Einarson und Golemnis, 2000).

In einem weiteren Beispiel wurde für die Klonierung eines Nucleosid-Transporter-Gens aus *Trypanosoma brucei* die Tatsache ausgenutzt, dass *S. cerevisiae* normalerweise exogenes Adenosin nicht aufnehmen kann, und dieses somit nicht als Purin-Quelle zur Verfügung steht. Hefe-Zellen mit einem Defekt in der Purin-Biogenese wurden mit einer *T. brucei* cDNA-Bibliothek transformiert und anschließend einer Selektion in einem Medium, das als einzige Purin-Quelle Adenosin enthielt, unterzogen. Plasmide, die den rekombinanten Zellen die Fähigkeit zur Proliferation vermittelten, konnten isoliert werden und führten zur Identifizierung des Adenosin-Transporter-Gens *TbAT1* (Mäser *et al.*, 1999).

Trotz der relativ einfachen Durchführbarkeit solcher Experimente in Hefe ist es dennoch insbesondere bei Spezies-spezifischen Fragestellungen von Vorteil, diese Methoden nach Möglichkeit direkt bei dem jeweiligen zu untersuchenden Organismus anwenden zu können.

Mittlerweile liegt ein breites Methoden-Spektrum für die genetische Manipulation von Trypanosomatidae vor (Clayton, 1999). Viele der in Hefe etablierten Untersuchungstechniken konnten auf *Leishmania* übertragen werden und erlauben die intensive Analyse der Funktion

bekannter Gene durch reverse genetische Methoden (Beverley und Turco, 1998). Darüber hinaus wurden Cosmid-*shuttle*-Vektoren mit DNA-Kapazitäten von ca. 40 kb entwickelt, durch die sich die Anzahl der ein vollständiges Parasiten-Genom repräsentierenden Klone erheblich reduzieren lässt, und die mit guter Effizienz transfiziert werden können. Dadurch wurden gute Voraussetzungen für die erfolgreiche Etablierung der Komplementations-Methodik in *Leishmania* geschaffen. (Ryan *et al.*, 1993a; Kelly *et al.*, 1994; Descoteaux *et al.*, 1994; Kelly, 1995; Beverley und Turco, 1995).

Ein wesentliches Hindernis für eine breitgefächerte Anwendung der funktionellen Komplementation in *Leishmania* stellt jedoch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter rezessiver Mutanten dar, was darauf zurückzuführen ist, dass Leishmanien asexuelle diploide Organismen sind und daher die Ausbeute an Mutanten selbst bei einer starken Mutagenese relativ gering ist. Zur Überwindung dieser Barriere sind effektive Selektionsmethoden für die Identifizierung von Mutanten erforderlich (Gueiros-Filho und Beverley, 1996; Beverley *et al.*, 2002). Dazu gehören beispielsweise auf Agglutination basierende Methoden, durch die auch Mutanten wiedergewonnen werden können, die nur mit geringer Häufigkeit auftreten. Diese Strategie kam bei der erstmaligen Anwendung der funktionellen genetischen Komplementation in *Leishmania* zum Einsatz, die das Ziel verfolgte, Gene zu identifizieren, die in die Biosynthese der Virulenz-Determinante Lipophosphoglycan involviert sind. Dabei wurde das Lektin Ricin-Agglutinin, das die β -verknüpften Galactosyl-Reste am nicht-reduzierenden Ende des LPGs erkennt, bzw. ein monoklonaler Antikörper, der gegen die subterminalen Disaccharid-Phosphat-Einheiten gerichtet ist, eingesetzt, um aus einer mutagenisierten Parasiten-Population nicht-agglutinierende LPG-defiziente *L. donovani*-Mutanten zu gewinnen. Nach Transfektion verschiedener Mutanten mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Wildtyp-Genom gelang es in umgekehrter Weise, rekombinante Parasiten, deren LPG-Phänotyp wiederhergestellt wurde, durch Antikörper-Bindung bzw. die Bindung an Ricin-Agglutinin zu isolieren. Von den verschiedenen erhaltenen Mutanten wurden bislang vier näher untersucht und das jeweils betroffene *L. donovani*-LPG-Gen identifiziert und charakterisiert (Ryan *et al.*, 1993b; Descoteaux *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Descoteaux *et al.*, 1998; Beverley und Turco, 1998; Descoteaux *et al.*, 2002).

Funktionelle Komplementation wurde in *Leishmania* ebenfalls angewendet, um einen Einblick in die Biogenese von Glycosomen zu erhalten, sowie um der Frage nachzugehen, ob diese Kinetoplastiden-spezifische Organelle und die in anderen Eukaryonten vorkommenden Peroxisomen aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind. Da Leishmanien möglicherweise ohne Glycosomen nicht überlebensfähig sind und es bisher nicht gelang, stabile Mutanten mit defekter Glycosomen-Biogenese herzustellen, wurde eine positive Selektions-Strategie gewählt, die es ermöglichte auch Mutanten mit einem partiellen Defekt bezüglich der glycosomalen Kompartimentalisierung zu erhalten. Es wurden rekombinante *L. donovani*-Promastigote, die ein Fusionsprotein exprimieren, das aus dem Bleomycin-Resistenz-Protein und Luciferase mit einem glycosomalen Zielsignal besteht, mutagenisiert und nachfolgend einer Phleomycin-Selektion unterzogen, die das Überleben von Zellen mit intaktem glycosomalen Import ausschließen sollte. Ein Luciferase-Assay nach subzellulärer Fraktionierung der Mutanten gab Aufschluss darüber, ob tatsächlich und in welchem Ausmaß eine fehlgeleitete cytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins vorlag. Eine *L. donovani*-Mutante mit einem Defekt bezüglich des Imports bestimmter glycosomaler Proteine, die zudem unerwarteterweise nicht zur Bildung von Lipidkörpern fähig war, wurde näher untersucht. Durch Komplementation mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Wildtyp-Genom

konnte ein Gen identifiziert werden, das für ein Protein mit Homologien zu dem an der Peroxisomen-Biogenese beteiligten Säugetier-Protein Peroxin2 kodiert (Flaspohler *et al.*, 1997).

Die Identifizierung von Nucleosid-Transporter-Genen ist ein weiteres Beispiel für die Anwendung der funktionellen genetischen Komplementation in *Leishmania*, die, wie alle parasitären Protozoa nicht zur *de novo* Purin-Synthese fähig sind und auf die Aufnahme und Wiederverwertung der Purine des Wirtsorganismus angewiesen sind (Landfear, 2001; Carter *et al.*, 2001). Aus einer chemischen Mutagenese sind die *L. donovani*-Zelllinien TUBA5 und FBD5 hervorgegangen, die Adenosin/Pyrimidin- bzw. Guanodin/Inosin-Nucleoside nicht transportieren können. Die Resistenz der Mutanten gegenüber den cytotoxischen Verbindungen Tubercidin (TUBA5), einem Adenosin-Analogon, und Formycin B (FBD5), einem Inosin-Isomer, wurde für die Selektion der mit einer *L. donovani*-Cosmid-Genbank transfizierten Mutanten ausgenutzt und die rekombinanten Zellen hinsichtlich der Wiederherstellung ihrer Tubercidin- bzw. Formycin B-Sensitivität durchmustert. Auf diese Weise wurden drei Nucleosid-Transporter-Gene identifiziert und kloniert (Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000).

Die Identifizierung und Isolierung von Genen basierend auf der Übertragung eines Phänotyps hat den Vorteil, dass die Herstellung und Selektion geeigneter Mutanten nicht unbedingt erforderlich ist. Für die Identifizierung von *Leishmania*-Genen, die eine Medikamenten-Resistenz vermitteln, bietet sich diese Strategie an, da die Amplifikation bestimmter Genloci und somit die Überexpression der entsprechenden Genprodukte einer der Mechanismen ist, die zur Entwicklung einer Medikamenten-Resistenz in *Leishmania* beitragen. So haben Cotrim *et al.* (1999) avirulente *L. major*-Stämme mit Cosmid-Genbanken aus dem Genom virulenter *L. major*-Stämme transfiziert und die Transfektanden anschließend mit den anti-Folaten Methotrexat und O/129 (2,4-Diamino-6,7-Diisopropylpteridin), dem toxischen Nucleosid Tubercidin oder den Sterol-Synthese-Inhibitoren Terbinafin bzw. Itraconazol behandelt. Neben Cosmiden mit bereits bekannten Resistenz-Genen wurden unter Verwendung von Tubercidin und den Sterol-Synthese-Inhibitoren auch Cosmide mit neuen Resistenz-Genloci aus überlebenden rekombinanten Parasiten isoliert.

In einem anderen Versuch konnte durch die Transfektion einer genomischen *L. tarentolae* Cosmid-Genbank in Wildtyp-Parasiten und die Selektion der rekombinanten Zellen unter Methotrexat-Gabe, ein hochaffiner Biopterin-Transporter als ein neues Methotrexat-Resistenz vermittelndes Gen identifiziert werden (Kündig *et al.*, 1999).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Dermotrope und viszeralisierende *Leishmania*-Spezies werden mit einer unmittelbaren Temperaturerhöhung konfrontiert, wenn sie von einer Schmetterlingsmücke in die Haut eines Säugetierwirts übertragen werden. Durch den plötzlichen Temperaturanstieg von 25°C auf ca. 35°C haben die Parasiten keine Gelegenheit zur Induktion von Thermotoleranz. Da Leishmanien dennoch in der Lage sind, ihre zellulären Funktionen aufrechtzuerhalten, was eine Voraussetzung für die Differenzierung und die Etablierung im Wirt ist, kann man davon ausgehen, dass sie von vornherein ein hohes Maß an basaler Thermotoleranz besitzen. Hinsichtlich ihres permissiven Temperaturbereichs unterscheiden sich jedoch die Erreger der kutanen und der viszeralen Leishmaniase. Der permissive Temperaturbereich korreliert mit den

Temperaturen der Organe, Haut bzw. innere Organe, in denen die Parasiten innerhalb des Säugetierwirts bevorzugt lokalisiert sind (Berman und Neva, 1981; Sacks *et al.*, 1989; Callahan *et al.*, 1996). So wird das Wachstum von *L. donovani* erst bei Temperaturen, die über 37°C hinausgehen beeinträchtigt, während *L. major* nur Temperaturen bis 35°C toleriert. Diese Unterschiede sind genetisch determiniert. Die Erweiterung des permissiven Temperaturbereichs durch eine graduelle Anpassung an höhere Temperaturen scheint nicht möglich zu sein. Entsprechend haben *in vitro*-Versuche gezeigt, dass die Vorbehandlung durch einen milden Hitzeschock das Überleben der Parasiten bei extremen Temperaturen von 40°C nicht beeinflusste (Brandau, 1996; Krobitch und Clos, 1999). Es erscheint naheliegend, dass die unterschiedliche Thermotoleranz den Tropismus der verschiedenen *Leishmania*-Spezies mitbestimmt.

Leishmanien weisen bereits bei niedrigen Temperaturen ein ungewöhnlich hohes HSP-Niveau auf und reagieren auf eine Temperaturerhöhung mit der verstärkten Synthese von HSP (Hunter *et al.*, 1984; Lawrence und Robert-Gero, 1985; Van der Ploeg *et al.*, 1985; Toyo und Remold, 1988; Shapira *et al.* 1988; Brandau *et al.*, 1995; Hübel *et al.*, 1995). Bestimmte HSP spielen in anderen Organismen eine Rolle bei der Vermittlung von Thermotoleranz (Parsell und Lindquist, 1994). Über eine solche Funktion ist hinsichtlich der von Leishmanien exprimierten HSP nur wenig bekannt. Eine Ausnahme stellt HSP100 dar. Da Mitglieder der HSP100-Familie für das Überleben verschiedener Organismen unter extremen Stressbedingungen von Bedeutung sind, wurde zunächst angenommen, dass dies möglicherweise auch in *Leishmania* der Fall sein könnte. Jedoch zeigte sich, dass HSP100 nur einen schwachen Thermotoleranz-vermittelnden Effekt auf *L. major* ausübt (Hübel *et al.*, 1997), während es überhaupt keinen Einfluss auf die Thermotoleranz von *L. donovani* hat (Krobitch und Clos, 1999). HSP100 kann somit als ein für die unterschiedliche Thermotoleranz von *L. major* und *L. donovani* verantwortlicher Faktor ausgeschlossen werden.

Durch funktionelle genetische Komplementation ist eine unvoreingenommene Identifizierung und Isolierung von Genen, die an einem bestimmten zellulären Prozess beteiligt sind, möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch diese Methode Gene identifiziert und isoliert werden, die für die höhere Thermotoleranz der viszeralisierenden *Leishmania*-Spezies *L. donovani* im Vergleich zur dermatropen *Leishmania*-Spezies *L. major* verantwortlich sind. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob solche Gene tatsächlich den Tropismus der Parasiten im Säugetierwirt beeinflussen und eine Viszeralisierung fördern.

Die Isolierung Thermotoleranz-vermittelnder Gene sollte auf der Grundlage eines übertragenen Phänotyps erfolgen, was den Vorteil hat, dass die Herstellung und Selektion geeigneter Mutanten nicht erforderlich ist. Dazu sollte die Temperatur-empfindlichere *Leishmania*-Spezies *L. major* mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert werden und eine Selektion der rekombinanten Parasiten bei der für *L. major* nicht-permissiven Temperatur von 37°C erfolgen.

Die aus überlebenden Parasiten isolierten und charakterisierten Cosmide sollten hinsichtlich ihrer Temperatur-Toleranz-vermittelnden Eigenschaften verifiziert werden. Definierte Zelllinien sollten durch Transfektion von *L. major* mit den identifizierten Cosmiden hergestellt werden und einer erneuten Temperatur-Selektion unterzogen werden.

Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten Parasiten-Stämmen sollte einen

Hinweis darauf liefern, ob bestimmte Cosmide *L. major* auch im Säugetierwirt einen Selektionsvorteil vermitteln.

Zur Eingrenzung der für einen Selektionsvorteil verantwortlichen Cosmid-Sequenzen, sollten aus entsprechenden Cosmiden konstruierte Plasmid-Genbanken, sowie durch Transposon-Insertion mutagenisierte Cosmide herangezogen werden. Alternativ sollte die vollständige Sequenzierung der Cosmid-Inserts erfolgen und die individuellen subklonierten ORF hinsichtlich ihres Einflusses auf Thermotoleranz und Tropismus miteinander verglichen werden.

Um die Voraussetzungen für eine Charakterisierung der von den identifizierten Genen kodierten Proteine zu schaffen, sollten spezifische polyklonale Antikörper hergestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung des mutmaßlichen Einflusses der Thermotoleranz auf den Tropismus zu leisten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid-Bisacrylamid	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Adenin	Sigma, St. Louis, U.S.A
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
6-Biopterin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid	Sigma, St. Louis, U.S.A
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
CSPD	Serva, Heidelberg
DIG-11-dUTP	Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTPs	MBI Fermentas, Litauen
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
EDTA	Serva, Heidelberg
EGTA	Serva, Heidelberg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ficoll 400	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid (35 %)	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted, U.K.
Glycin	United States Biochemical (USB), Cleveland, U.S.A.
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HCl (32 %)	Merck, Darmstadt
Hemin	Serva, Heidelberg
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Biomol, Hamburg
Hexanukleotidgemisch	Boehringer, Mannheim
Hybridisierungslösung HYB-9	Genra Systems, Minneapolis, U.S.A.
I-Block-Reagenz	Serva, Heidelberg
Imidazol	Merck, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg

Isoamylalkohol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L. R. White	London Resign Company, Berkshire, U.K.
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
MES	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Glücksklee)	Nestlé, Frankfurt am Main
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
NBT	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Nickelsulfat	Novagen, Madison, U.S.A.
N-Lauroylsarcosin	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Phenol	Biomol, Hamburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
PVP 40	Merck, Darmstadt
Seakem ME Agarose	FMC, Rockland, U.S.A.
Silbernitrat	Serva, Heidelberg
TEMED	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Biomol, Hamburg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
X-Phospat	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

2.1.2 Sonstige Materialien und spezielle Geräte

Sonstige Materialien:

Elektroporationsküvetten (0,4 cm)	BioRad, München
Elektroporationsküvetten (0,1 cm)	BioRad, München
3 MM-Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
HisBind Resin	Novagen, Madison, U.S.A.
Nitrozellulose-Membranfilter (BA 85)	Schleicher & Schüll, Dassel

Nuc Trap® push columns
 PVDF-Membranen
 Quiabrane Nylonmembranen
 Röntgenfilme, Biomax MR
 Zellkulturflaschen (50-, 250,-, 600 ml)

Stratagene, La Jolla, U.S.A.
 Pall Biosystems Support, Port Washington
 Quiagen, Chatsworth, U.S.A.
 Eastman Kodak, Rochester, U.S.A.
 Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Spezielle Geräte:

ABI PRISM™ 377 DNA-Sequencer
 Branson Sonifier 250
 Casy-Zellcounter & Analyzer
 Diode Array Spectrophotometer
 GenePulser™
 Hybridisierungsöfen
 Mastercycler gradient
 Thermocycler (Personal Cycler)
 Transmissionselektronenmikroskop
 (EM 301)
 UV Stratalinker™ 1800
 Ultramikrotom (Ultracut-E)

Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.
 G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
 Schärfe System, Reutlingen
 Hewlett Packard, Ratingen
 BioRad, München
 Biometra, Göttingen
 Eppendorf, Hamburg
 Biometra, Göttingen
 Philips, Eindhoven, Niederlande

Stratagene, La Jolla, U.S.A.
 Reichert

2.1.3 Kits

ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle
 Sequencing Ready Reaction Kit
 Easy Pure DNA Purification Kit
 FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit
 DIG-DNA Labeling and Detection Kit
Double-stranded Nested Deletion Kit
 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit
 GPS™-1 Genome Priming System
 MasterAmp™ Extra-Long PCR Kit
 Plasmid Maxi Kit
 PUREGENE® DNA Isolation Kit

Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Boehringer, Mannheim
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 New England Biolabs, Beverley, U.S.A.
 Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
 Quiagen, Hilden
 Genra Systems, Minneapolis, U.S.A.

2.1.4 Marker

DNA-Längenstandards:

1 kb DNA-Leiter
 1 kb DNA-Leiter
 Lambda-DNA *Hind* III-Marker
 Lambda-DNA
 Hefechromosomen-Marker
 (*Saccharomyces cerevisiae*, YPH80)

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
 New England Biolabs, Beverley, U.S.A.

Molekulargewichtsmarker für Proteine:

10 kD Protein-Leiter	Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.
----------------------	---------------------------------

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, U.S.A. MBI Fermentas, Vilnius, Litauen Pharmacia, Uppsala, Schweden
Taq-Polymerase	Beckmann Promega, Madison, U.S.A.
Alkalische Phosphatase (CIP)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
RNase A	Sigma, St. Louis, U.S.A.
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
Klenow-Polymerase	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
Proteinase K	Boehringer, Mannheim

2.1.6 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Boehringer, Mannheim
Anti-Huhn-IgY-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg
Protein-A, 10 nm Gold	Universität Utrecht, Niederlande

2.1.7 Oligonukleotide**Oligonukleotide für die Sequenzierung**

Die Sequenzierung der 5`- und 3`-Bereiche von DNA-Fragmenten, die in den Vektor pBluescript II KS(+) kloniert wurden, erfolgte mit den Oligonukleotiden M13R und M13F. Für die Sequenzierung der 5`- und 3`-Bereiche der Inserts des Cosmid-Vektors pcosTL wurden die Oligonukleotide M13R und CH-1 bzw. CH-2 verwendet.

M13R	5`-GGAAACAGCTATGACCATG-3`
M13F	5`-TTGTTAAACGACGGCCAG-3`
CH-1	5`-CACCTTCAGATGCCTGGTTG-3`
CH-2	5`-CCGTGTGATATCAGATGCCC-3`

Die den Integrationsort eines Transposons flankierenden Bereiche des Cosmids pcos8 wurden mit den Oligonukleotiden N und S sequenziert. Da die Qualität der Sequenzen nicht ausreichend war, wurden einige Varianten der ursprünglichen Oligonukleotide getestet. Für die Sequenzierung wurden letztendlich hauptsächlich die Oligonukleotide N1 und S1 eingesetzt.

Primer N (08268)	5`-ACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTG-3`
Primer N1(08965)	5`-GTCCAGTATGCTTTTTTCACAGC-3`
Primer N 2 (08966)	5`-CACAGCATAACTGGACTG-3`
Primer N** (08964)	5`-CTTTATTGTCATAGTTTAGATC

Primer S (08267)	5`-ATAATCCTTAAAACTCCATTTCCACCCCT-3`
Primer S1 (08967)	5`-ATTTCCACCCCTCCCAGTTC-3`
Primer S* (08635)	5`-CCTTAAAACTCCATTTCCAC

Für die Sequenzierung der 5`- und 3`-Bereiche von in den Expressionsvektor pJC45 subklonierter ORF wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

pJC45/fwd	5`-GGATAACAATTCCCCTCTAG-3`
pJC45/φT2	5`-ATATAGTTCCTCCTTTCAGC-3`

Die Sequenzierung der 5`- und 3`-Bereiche von ORF, die in die multiple Klonierungsstelle bzw. in die *Sma* I-site inseriert wurden, erfolgte mit folgenden Oligonukleotiden:

pIR/P-5` (10606)	5`-CGTGGCTCTGCGTTTCACTTGC-3`
pIR/P-3` (10607)	5`-CGACTCTAAGATGTCACGGAGG-3`
pIR/A-5` (10608)	5`-CACTTTCAAGGCTTCCCGAACG-3`
pIR/A-3` (10609)	5`-CACCCAAGGAGGTGCCACAC-3`

Oligonukleotide für die Amplifikation der ORF aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der offenen Leserahmen aus den Cosmiden pcos8 und pcos 13.12 verwendet. Eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und mit den entsprechenden Enzymen gekennzeichnet.

pcos8/ORF 2 (1886 bp)

5` ASC I 01 (10578)	5`-GGG <u>GGTACCT</u> TACAAGACATGCCGCCAAAACG-3` <i>Kpn</i> I
3` ASC I 02 (10579)	5`-CCCG <u>GATACCT</u> CAATCTATCTCGCCCAGTTGC-3` <i>Kpn</i> I
5` ASC I 03 (10390)	5`-GGG <u>CATATG</u> CCGCCAAAACGCTGGGC-3` <i>Nde</i> I
3` ASC I 04 (10391)	5`-GGGA <u>AGCTT</u> CAATCTATCTCGCCCAGTTGC-3` <i>Hind</i> III

pcos8/ORF 3 (2597 bp)

5` Helicase 01 (09705)	5`-GGGAGATCTACACGACGATGCGTAAGCG-3` <i>Bgl</i> II
3` Helicase 02 (09728)	5`-GGGAGATCTAGATCGTGGCACCAGTC-3` <i>Bgl</i> II
5` Helicase 03 (09707)	5`-GGG <u>CATATG</u> CGTAAGCGGGCGCGCGATG-3` <i>Nde</i> I

pcos8/ORF 4 (3398 bp)

5`Adaptin 01 (10087) 5`-GGGAGATCTACCTCTACGCATGTCGCTCGC-3`
Bgl II
 3`Adaptin 02 (10089) 5`-GGGAGATCTAGTGTGCACCCACCAGCTC-3`
Bgl II
 5`Adaptin 03 (10088) 5`-GGGCATATGTCGCTCGCCGCTTTCACG-3`
Nde I

pcos8/ORF 5 (1661 bp)

5`DSP 01 (10191) 5`-GGGGGATCCCGTGACTTGCATGCAGCGCTC-3`
Bam HI
 3`DSP 02 (10193) 5`-GGGGGATCCCTCACACAGGCCGCGTCACATC-3`
Bam HI
 5`DSP 03 (10192) 5`-GGGCATATGCAGCGCTCTGGTGGCGG-3`
Nde I

pcos13.12/ORF 1 (4772 bp)

5`PDE 01 (10194) 5`-GGGAGATCTCCTCCGACGGCTATGCCTGG-3`
Bgl II
 3`PDE 02 (10196) 5`-GGGAGATCTCAGCTCGCATCGCTTTCTTTC-3`
Bgl II
 5`PDE 03 (10297) 5`-GGGCATATGCCTGGGCGTTCAGGCAGTG-3`
Nde I

pcos13.12/ORF 2 (5327 bp)

5`Mucin 01 (10619) 5`-GGGCATATGCTTGAGCAAACCTTATCCCTC-3`
Nde I
 3`Mucin 02 (10620) 5`-GGGGATCCTAGAGTGGCGGCTGCACC-3`
Bam HI
 5`Mucin 03 (10621) 5`-GGGGAGCTCGTATCGACCATGCTTGAGCAAAC-3`
Sac I
 3`Mucin 04 (10622) 5`-GGGGAGCTCTAGAGTGGCGGCTGCACCG-3`
Sac I

pcos13.12/ORF 3 (2222 bp)

5`ORF3 01 (10623) 5`-GGGCATATGCAGCCACCGCCGAAGCCAC-3`
Nde I
 3`ORF3 02 (10624) 5`-GGGAGATCTACGCAGTGGCCGTCTCCTTC-3`
Bgl II
 5`ORF3 03 (10625) 5`-GGGAGATCTGTGGTCACCATGCAGCCACC-3`
Bgl II

Oligonukleotide für die Amplifikation Klon-spezifischer Fragmente

Zur Identifizierung rekombinanter *Leishmania*-Stämme in einem Gemisch wurde die genomische DNA aus *Leishmania*-Einzelklonen in eine PCR-Analyse eingesetzt. Die Kombination des Oligonukleotids 3`pIR/A mit den verschiedenen 5`Oligonukleotiden führt zur Amplifikation Klon-spezifischer Fragmente. Die Größe der Fragmente ist angegeben.

5`DSP (10563)	5`-GACTCGAACAGGTGGTGAGTC-3`	(573 bp)
5`ASC I (10564)	5`-CGGTATAAAGCGACACGAAGGC-3`	(849 bp)
5`Helicase (10565)	5`-CTTCACTGACCGTGACAAGAAG-3`	(1100 bp)
5`Adaptin (10566)	5`-GCAGAAGGTCTTCAGCATCAAC-3`	(1529 bp)
5`PDE/1 (10567)	5`-GCTGCACTTTCCGATGATGAGG-3`	(1997 bp)
3`pIR/A (CL010)	5`-CAAAGTAGTGGAAGATATCGCTG-3`	
5`pIR/A (CL015)	5`-GACCACAACGGTTTCCCTCTAG-3`	(722 bp)
5`ORF3 (CL012)	5`-CGAGAAGCTGAAGGCTGTCATG-3`	(709 bp)
5`PDE/2 (CL013)	5`-GATGCAGCAGGCGACTAGAATG-3`	(976 bp)
5`Mucin (CL014)	5`-CACTGACGTTTCGACGACTTGAG-3`	(1373 bp)

2.1.8 Vektoren und Plasmide

Vektoren

pBluescript II KS(+)

Der Vektor pBluescript II KS(+) (Stratagene, La Jolla, U.S.A.) wurde für die Subklonierung von DNA-Fragmenten verwendet, die nachfolgend sequenziert werden sollten, sowie für die Subklonierung einiger ORF aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12.

pcosTL

Der Vektor pcosTL wurde von J. M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London) zur Verfügung gestellt (Kelly *et al.*, 1994). pcosTL ist ein 8500 bp umfassender Cosmid-Vektor mit zwei *cos-sites*. Der Vektor wurde zur Herstellung der verwendeten Cosmid-Genbank aus dem Genom von *Leishmania donovani* eingesetzt und ermöglicht die Insertion von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 30 kb bis 44 kb. Der Vektor vermittelt Bakterien durch das β -Lactamase-Gen eine Ampicillin-Resistenz. Außerdem besitzt der Vektor ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das von den 5´- und 3´-untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi* flankiert wird und eine Selektion rekombinanter Leishmanien ermöglicht.

pJC45

Der Vektor pJC45 (Schlüter *et al.*, 2000) dient der rekombinanten Expression von Genen in *E. coli*. Dieser Vektor entspricht dem Expressionsvektor pJC40 (Clos und Brandau, 1994), weist jedoch neben dem Promotor für die T7-RNA-Polymerase auch einen *lac*-Operator auf. Rekombinant exprimierte Proteine erhalten am aminoterminalen Ende zusätzlich 20 Aminosäuren, inklusive 10 Histidin-Resten, die eine Aufreinigung durch Metall-Chelat-Chromatographie ermöglichen.

Die ORF 2, 3, 4 und 5 aus dem Cosmid pcos8 und die ORF 1, 2 und 3 aus dem Cosmid pcos13.12 wurden in pJC45 subkloniert und in *E. coli*/BL21(DE3) [pAPlac^o] exprimiert.

pIR(mcs2-)

Der Vektor pIR(mcs2-) ist ein Derivat des Vektors pIR1SAT, der von Dr. S. M. Beverley (Washington University of Medicine, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde, und entstand durch das Einfügen einer multiplen Klonierungsstelle in die *Bgl* II-Schnittstelle (Position:1625 bp) von pIR1SAT (Dr. J. Clos). Der Vektor besitzt u. a. flankierende Sequenzen eines Gens (*LPG 1*), das überwiegend in promastigoten Stadien von *Leishmania* exprimiert wird, sowie flankierende Sequenzen eines Gens (*CYS*), das verstärkt in Amastigoten exprimiert wird. Dadurch ist eine stadienspezifische Expression subklonierter Gene möglich. Für die Transfektion von *Leishmania* werden die mit *Swa* I linearisierten Konstrukte eingesetzt, die durch homologe Rekombination in den rDNA-Locus integrieren, wo eine effiziente Transkription gewährleistet ist. Zur Selektion in Leishmanien besitzt der Vektor ein Gen, das für die Streptothricin-acetyltransferase (SAT) kodiert und Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin vermittelt.

Die ORF 2, 3, 4 und 5 aus dem Cosmid pcos8 und die ORF 1, 2 und 3 aus dem Cosmid pcos13.12, sowie einige homologe ORF aus *L. major* wurden in die Promastigoten-spezifische bzw. in die Amastigoten-spezifische Expressionsstelle von pIR(mcs2-) subkloniert.

pBGS9neoR

Der Vektor pBGS9neoR ist ein Derivat des Vektors pBGS9 (Spratt *et al.*, 1986). In die *Bam* HI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle von pBGS9 wurde das 3476 bp große *Bam* HI/*Sa*I I-Fragment aus pcosTL kloniert. Das Fragment umfasst das Neomycin-Phosphotransferase-Gen mit den flankierenden Sequenzen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi* und ermöglicht eine Selektion transfizierter Leishmanien. Der Vektor besitzt außerdem ein Kanamycin-Resistenz-Gen.

Der Vektor wurde für die Herstellung von Plasmid-Genbanken aus den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 verwendet.

Plasmide

Die für die Herstellung der Plasmide verwendeten Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert, nachfolgend dephosphoryliert (2.2.10.2). und nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.12) aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt (2.2.13). Die für die Subklonierung eingesetzten DNA-Fragmente wurden entweder durch einen Verdau im präparativen Maßstab (2.2.10.1) gewonnen oder die DNA-Fragmente wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert (2.2.11) und nachfolgend mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Die aus einer PCR-Reaktion bzw. aus einem Verdau resultierenden DNA-Fragmente oder DNA-Fragmente, deren Einzelstrang-Überhänge aufgefüllt wurden, um stumpfe Enden zu erhalten (2.2.10.3), wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und aufgereinigt.

pBS/D1G1, pBS/D1K4

In die *Eco* RI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS(+) wurde ein ca. 6870 bp großes *Eco* RI-Fragment (pBS/D1G1) bzw. ein ca. 3340 bp großes *Eco* RI-Fragment (pBS/D1K4)

aus dem Plasmid pBGS9neoR/PbMixD1 kloniert, das aus Leishmanien isoliert wurde, die mit einer Plasmid-Genbank aus den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 transfiziert worden waren und eine 37°C-Selektion überlebten. Von den Plasmiden wurden durch *Nested Deletion*-Abbau (2.2.20) deletierte Subklone hergestellt, die nachfolgend sequenziert (2.2.21) wurden.

pBS/A5G8, pBS/A5K2

Die Plasmide enthalten ein ca. 7400 bp großes *Eco* RI-Fragment (pBS/A5G8) bzw. ein ca. 3510 bp großes *Eco* RI-Fragment (pBS/A5K2), das in die *Eco* RI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS(+) kloniert wurde. Die Fragmente stammen aus dem Plasmid pBGS9neoR/PbMixA5, das aus Leishmanien isoliert wurde, die mit einer Plasmid-Genbank aus den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 transfiziert worden waren und eine 37°C-Selektion überlebten. Von den Plasmiden wurden durch *Nested Deletion*-Abbau (2.2.20) deletierte Subklone hergestellt, die nachfolgend sequenziert (2.2.21) wurden.

pBS/Sa/ I-11.2, pBS/Sa/ I-D1

Die Plasmide resultierten aus der Subklonierung eines 1442 bp großen *Sa* I-Fragments aus Cosmid pcos11.2 bzw. aus pBGS9neoR/PbMixD1 in die *Sa* I-Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS(+).

pIR/P-ASC I

Das Plasmid enthält den ORF 2 (1886 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`ASC I 01 und 3`ASC I 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Acc* 65 I, ein Isoschizomer von *Kpn* I, behandelt und in die *Acc* 65 I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-ASC I

Das Plasmid enthält den ORF 2 (1886 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-ASC I mit *Acc* 65 I isoliert, in einer Auffüllreaktion mit stumpfen Enden versehen und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pIR/P-Helicase

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2597 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Helicase 01 und 3`Helicase 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II behandelt und in die *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-Helicase

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2597 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-Helicase mit *Bgl* II isoliert, in einer Auffüllreaktion mit stumpfen Enden versehen und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pIR/P-Adaptin

Das Plasmid enthält den ORF 4 (3398 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Adaptin 01 und 3`Adaptin 02 aus dem Cosmid pcos8

amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II behandelt und in die *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-Adaptin

Das Plasmid enthält den ORF 4 (3398 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-Adaptin mit *Bgl* II isoliert, in einer Auffüllreaktion mit stumpfen Enden versehen und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pIR/P-DSP

Das Plasmid enthält den ORF 5 (1661 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`DSP 01 und 3`DSP 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI behandelt und in die *Bam* HI-kompatible *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-DSP

Das Plasmid enthält den ORF 5 (1661 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`DSP 01 und 3`DSP 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI behandelt und zunächst in die *Bam* HI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS(+) kloniert. Anschließend wurde das aus dieser Subklonierung hervorgegangene Plasmid pBS/DSP mit *Bam* HI verdaut und das Fragment mit dem ORF 5 isoliert. In einer Auffüllreaktion wurde das Fragment mit stumpfen Enden versehen und nachfolgend in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/P-PDE

Das Plasmid enthält den ORF 1 (4772 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`PDE 01 und 3`PDE 02 aus dem Cosmid pcos13.12 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II behandelt und in die *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-PDE

Das Plasmid enthält den ORF 1 (4772 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-PDE mit *Bgl* II isoliert, in einer Auffüllreaktion mit stumpfen Enden versehen und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pIR/P-Mucin

Das Plasmid enthält den ORF 2 (5327 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Mucin 03 und 3`Mucin 04 aus dem Cosmid pcos13.12 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Sac* I behandelt und in die *Sac* I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-Mucin

Das Plasmid enthält den ORF 2 (5327 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-Mucin mit *Ecl* 136 II, ein Isoschizomer von *Sac* I, das stumpfe Enden erzeugt, isoliert und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pIR/P-ORF3

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2222 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`ORF3 03 und 3`ORF3 02 aus dem Cosmid pcos13.12 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II behandelt und in die *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert.

pIR/A-ORF3

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2222 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde nach einem präparativen Verdau des Plasmids pIR/P-PDE mit *Bgl* II isoliert, in einer Auffüllreaktion mit stumpfen Enden versehen und in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) ligiert.

pJC45/ASC I

Das Plasmid enthält den ORF 2 (1886 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`ASC I 03 und 3`ASC I 04 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Hind* III behandelt. Da der ORF 2 eine *Nde* I-Schnittstelle besitzt entstanden ein *Nde* I-Fragment und ein *Nde* I/*Hind* III-Fragment. Letzteres wurde zwischen die *Nde* I- und *Hind* III-Restriktionsschnittstelle des Vektors pJC45 ligiert. In das entstandene Konstrukt wurde nach der Linearisierung mit *Nde* I und anschließender Dephosphorylierung das *Nde* I-Fragment kloniert.

pJC45/Helicase

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2597 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Helicase 03 und 3`Helicase 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bgl* II behandelt und zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle (*Bgl* II-kompatibel) des Vektors pJC45 ligiert.

pJC45/Adaptin

Das Plasmid enthält den ORF 4 (3398 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Adaptin 03 und 3`Adaptin 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bgl* II behandelt und zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle (*Bgl* II-kompatibel) des Vektors pJC45 ligiert.

pJC45/DSP

Das Plasmid enthält den ORF 5 (1661 bp) des Cosmids pcos8. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`DSP 03 und 3`DSP 02 aus dem Cosmid pcos8 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bam* HI behandelt und zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pJC45 ligiert.

pJC45/PDE

Das Plasmid enthält den ORF 1 (4772 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`PDE 03 und 3`PDE 02 aus dem Cosmid pcos13.12 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bgl* II behandelt und zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle (*Bgl* II-kompatibel) des Vektors pJC45 ligiert.

pJC45/Mucin

Das Plasmid enthält den ORF 2 (5327 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`Mucin 01 und 3`Mucin 02 aus dem Cosmid pcos13.12

amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bam* HI behandelt. Da der ORF 2 eine *Nde* I-Schnittstelle besitzt entstanden ein *Nde* I-Fragment und ein *Nde* I/*Bam* HI-Fragment. Letzteres wurde zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pJC45 ligiert. In das entstandene Konstrukt wurde nach der Linearisierung mit *Nde* I und anschließender Dephosphorylierung das *Nde* I-Fragment kloniert.

pJC45/ORF3

Das Plasmid enthält den ORF 3 (2222 bp) des Cosmids pcos13.12. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5`ORF3 01 und 3`ORF3 02 aus dem Cosmid pcos13.12 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Bgl* II behandelt und zwischen die *Nde* I- und *Bam* HI-Restriktionsschnittstelle (*Bgl* II-kompatibel) des Vektors pJC45 ligiert.

Plasmide mit homologen ORF aus *L. major*

pIR/P-L.m.PDE

pIR/A-L.m.PDE

pIR/P-L.m.ORF3

pIR/A-L.m.ORF3

Eine Cosmid-Genbank aus dem Genom von *Leishmania major* (5ASKH), die mir freundlicherweise von K. Mellenthin zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit einer DIG-markierten (2.2.15) *L. donovani*-Pde-spezifischen Gensonde durchmustert (2.2.16), und es konnten letztendlich Cosmid pcos13.12-Homologe isoliert werden (L.m.pcos13.12-H/3.1, L.m.pcos13.12-H/1.1). Aus diesen Cosmiden ließen sich mit den von der *L. donovani*-Sequenz abgeleiteten Oligonukleotiden 5`PDE 01 und 3`PDE 02 die homologen ORF1 und ORF 3 amplifizieren. Die Subklonierung in pIR(mcs2-) erfolgte wie bereits beschrieben.

pIR(P)-L.m.DSP

pIR(A)-L.m.DSP

Ein Cosmid pcos8-Homolog aus der von K. Mellenthin zur Verfügung gestellten *L. major*-Cosmid-Genbank wurde verwendet, um in einer PCR mit den von der *L. donovani*-Sequenz abgeleiteten Oligonukleotiden 5`DSP 01 und 3`DSP 02 den homologen ORF5 zu amplifizieren. Das Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI behandelt und zunächst in die *Bam* HI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS(+) kloniert. Anschließend wurde das aus dieser Subklonierung hervorgegangene Plasmid pBS/L.m.DSP mit *Bam* HI verdaut und das Fragment mit dem ORF 5-Homolog isoliert. Das Fragment wurde in die *Bam* HI-kompatible *Bgl* II-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert [pIR/P-L.m.DSP], bzw. in einer Auffüllreaktion wurde das Fragment mit glatten Enden versehen und nachfolgend in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pIR(mcs2-) kloniert [pIR/A-L.m.DSP].

2.1.9 Medien und Zusatzstoffe

Agar

Serva, Heidelberg

Circle Grow

Bio 101 Inc., La Jolla, U.S.A.

Fötales Kälberserum(FCS)

Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.

M199

Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.

2.1.9.1 Antibiotika

Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Chloramphenicol	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Nourseothricin (clonNAT)	Werner BioAgents, Jena-Cospeda

2.1.10 Bakterienstämme

DH5 α (Hanahan, 1983)

Genotyp: F⁻, Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1*
hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*

Für Transformationen im Rahmen allgemeiner Klonierungsexperimente wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Gibco BRL, *subcloning efficiency DH5 α TM competent cells*) eingesetzt.

DH5 α -Zellen mit einer höheren Transformationseffizienz (Gibco BRL, *library efficiency DH5 α TM competent cells*) wurden verwendet, wenn aus Leishmanien isolierte episomale DNA in ein Transformationsexperiment eingesetzt werden sollte und für die Auswertung von Versuchen viele Transformanden erforderlich waren.

XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F⁻ *pro AB*
lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, Epicurian Coli® *Electroporation-competent cells*) wurde mit Derivaten des Cosmids *pcos8*, die durch eine Transposon-Mutagenese (2.2.18) erhalten wurden, durch Elektroporation transformiert.

BL21 (DE3) [pAP*lacI*^q]

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) [pAP*lacI*^q] wurde von O. Fayet (Centre National De La Recherche Scientifique, Toulouse) zur Verfügung gestellt und leitet sich von dem Bakterienstamm BL21 (DE3) (Studier und Mofatt, 1986) ab.

Genotyp: *hsdS gal* (λ *dts857 ind 1 Sam7 nir5 lacUV5-T7 gene 1*)

Das zusätzliche Plasmid des *E. coli*-Stamms BL21 (DE3) [pAP*lacI*^q] enthält ein Kanamycin-Resistenz-Gen und das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*).

Dieser Bakterienstamm wurde für die rekombinante Expression von ASC I, Helicase, Adaptin, DSP, PDE, Mucin und ORF3 eingesetzt.

2.1.11 *Leishmania*-Stämme

Leishmania major

Der von der WHO empfohlene Referenzstamm MHOM/SU/73/5ASKH wurde verwendet. Er

wurde von David Evans (London School of Hygiene and Tropical Medicine) zur Verfügung gestellt.

Leishmania donovani

Der *L. donovani*-Stamm MHOM/SD/??/LO8 wurde uns von Dan Zilberstein (Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa) zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Medien und häufig verwendete Puffer und Lösungen

<u>M199-Medium (pH 7,0):</u>	1 x M199-Medium 25 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,035 % Natriumhydrogencarbonat 20 µg/ml Gentamycin
<u>Modifiziertes M199-Medium (pH7,0):</u> (nach Kapler <i>et al.</i> , 1990)	1 x M199-Medium 25 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,035 % Natriumhydrogencarbonat 40 mM HEPES (pH 7,4) 10 µg/ml Häm 100 µM Adenin 1,2 µg/ml 6-Biopterin 20 µg/ml Gentamycin
<u>M199-Medium (pH 5,5):</u>	1 x M199-Medium 25 % FCS (hitzeinaktiviert) 25 mM MES (pH 4,5) 20 µg/ml Gentamycin
<u>Einfriermedium:</u>	20 % DMSO 50 % FCS(hitzeinaktiviert) 30 % M199 mit 15 % FCS
<u>M199-Agar-Platten:</u>	1 x M199-Medium 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 µg/ml Haem 1,2 µg/ml 6-Biopterin 100 µM Adenin 40 mM HEPES (pH 7,4) 20 µg/ml Gentamycin 1 % Agar 50 µg/ml Geneticin oder 150 µg/ml Nourseothricin
<u>Circle Grow (CG)-Medium:</u>	40 g/l CG

<u>CG/Ampicillin-Platten:</u>	15 g/l Agar 40 g/l CG
Antibiotika-Konzentration:	100 mg/l Ampicillin 10 mg/l Kanamycin 15 mg/l Chloramphenicol
Lösungen und Puffer	
<u>1 x PBS (pH 7,0):</u>	2,6 mM Kaliumchlorid 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat 136 mM Natriumchlorid 8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat- heptahydrat
<u>20 x SSC (pH 7,4):</u>	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat
<u>10 x TBE:</u>	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0

2.2 Methoden

2.2.1 *Leishmania*-Zellkultur

2.2.1.1 *In vitro*-Kultivierung von promastigoten Stadien

Die Kultivierung von promastigoten Stadien der Wildtyp-Stämme erfolgte in M199-Medium (pH 7,0) oder modifiziertem M199-Medium (pH 7,0) bei 25°C in Zellkulturflaschen aus Polystyren. Dem Medium wurden für die Kultivierung von rekombinanten Stämmen entsprechende Antibiotika zugesetzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml wurden die Kulturen 1:1000 verdünnt, bzw. die Zellen wurden je nach Bedarf mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml eingesät, so dass ein logarithmisches Wachstum aufrechterhalten werden konnte.

Die Zelldichte der Kulturen wurde mit einem CASY Cellcounter&Analyzer (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt.

2.2.1.2 *In vitro*-Kultivierung von axenischen amastigoten Stadien

Promastigote Stadien der *Leishmania*-Spezies *L. donovani* lassen sich durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur und durch ein Medium mit einem sauren pH-Wert axenisch in Amastigoten-ähnliche Zellformen umwandeln.

Für die Umwandlung wurden in M199-Medium (pH 7,0) kultivierte, logarithmisch wachsende Zellen verwendet. Die Parasiten wurden in Zellkulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml eingesät, wobei ein großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis eingehalten wurde, und bei 37°C in einem Brutschrank mit Kohlendioxid/Luftgemisch-Begasung (5 % Kohlendioxid, 95 % Luft) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, RT) und im doppelten Volumen M199-Medium (pH 5,5) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend maximal 5 Tage bei 37°C kultiviert, wobei nach 2 Tagen ein Mediumwechsel vorgenommen wurde.

2.2.1.3 Einfrieren von Stammkulturen

Leishmania-Promastigote in der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C), der Überstand abgesaugt und die Zellen in je einem Volumen eisgekühltem M199-Medium (oder modifiziertem M199-Medium) und Einfrier-Medium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml vorlag. Die Zellen wurden auf Eis in Zellkulturröhrchen (Nunc, Cryotubes 1,8 ml) aliquotiert. Die vorgekühlten Zellen wurden zunächst über Nacht in einer Styropor-Box bei -70 °C aufbewahrt, um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten, und anschließend über flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4 Klonale Selektion rekombinanter Leishmanien

M199-Agar-Platten:

Um Einzelklone zu erhalten, wurden 10^3 bis 10^4 Leishmanien auf M199-Agar-Platten

ausgestrichen. Die mit Parafilm abgedichteten Platten wurden 1 bis 2 Wochen bei 25°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden ausgestochen und zur weiteren Kultivierung in Zellkulturflaschen mit modifiziertem M199-Medium und dem entsprechendem Antibiotikum überführt.

Mikrotiterplatten

Die Kulturen wurden nach Bestimmung der Zellzahl durch eine serielle Verdünnung in modifiziertem M199-Medium auf eine Zelldichte von 5 Zellen/ml eingestellt. Mikrotiterplatten wurden mit 200 µl (= 1 Zelle) Zellsuspension je Vertiefung befüllt. Nach ca. 10 Tagen wurden die Zellen aus den einzelnen Vertiefungen zur weiteren Amplifikation in Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2 Transfektion von *Leishmania* durch Elektroporation

<u>Elektroporationspuffer:</u>	21 mM HEPES (pH 7,5)
	137 mM Natriumchlorid
	5 mM Kaliumchlorid
	0,7 mM Di-Natriumhydrogenphosphat heptahydrat
	6 mM Glucose

Bei der Elektroporation werden die Zellen zusammen mit der zu transfizierenden DNA in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. In der Plasmamembran entstehen dabei kurzzeitig Poren, durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen können.

Die Elektroporation von *L. major*- bzw. *L. donovani*-Promastigoten erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von Kapler *et. al.* (1990)

Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C), zweimal mit eiskühlem PBS und einmal mit Elektroporationspuffer (Potter, 1988) gewaschen und schließlich in Elektroporationspuffer aufgenommen, so dass eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml vorlag. Die zu transfizierende DNA wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 4 mm) pipettiert und mit 400 µl der gekühlten Zellsuspension gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser™ (BioRad) durch drei Stromstöße von 3750 V/cm und 25 µF. Die Zeitkonstante lag dabei zwischen 0,7 und 1,1 ms. Als Kontrolle diente ein Elektroporationsansatz, dem keine DNA zugefügt worden war. Die Elektroporationsansätze wurden anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert und nachfolgend in 10 ml modifiziertes M199-Medium überführt.

Nach 20 bis 24 Stunden wurden die Ansätze zentrifugiert (10 Minuten, 690 x g, RT) und die Zellen zur Selektion in frischem Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, aufgenommen. Selektionierte rekombinante Leishmanien wurden eingefroren (2.2.1.3), einer Temperatur-Selektion (2.2.4.1) unterzogen oder für die Infektion von BALB/c-Mäusen (2.2.5) vorbereitet.

2.2.2.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Ermittlung der Anzahl unabhängiger Transfektanden nach Elektroporation von *L. major* mit der Cosmid-Genbank-DNA wurde die Zellzahl der für die Elektroporation vorbereiteten Zellen bestimmt und nach der Elektroporation ein Aliquot auf eine Zelldichte von $1,66 \times 10^6$ Zellen/ml in modifiziertem M199-Medium eingestellt. Die verdünnten Zellen wurden in eine *limiting dilution*-Analyse (2.2.3) eingesetzt. Nach ca. 24 Stunden wurde den in Mikrotiterplatten seriell verdünnten Zellen 50 µg/ml Geneticin hinzugefügt.

Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen, welche die Elektroporation überlebt haben, wurden Zellen, die keiner Elektroporation ausgesetzt wurden und Zellen die transfiziert worden waren, in modifiziertem M199-Medium verdünnt, so dass eine Zelldichte von $1,66 \times 10^3$ Zellen/ml vorlag. Diese Verdünnungen wurden ebenfalls in eine *limiting dilution*-Analyse eingesetzt, wobei den Ansätzen jedoch kein Antibiotikum hinzugefügt wurde.

2.2.3 Limiting dilution-Analyse

Bei der *limiting dilution*-Analyse wird eine Zellsuspension durch aufeinanderfolgende Verdünnungsschritte in einer Mikrotiterplatte so weit verdünnt, dass letztendlich pro Vertiefung eine Zelle vorliegt.

96 *well*-Mikrotiterplatten wurden mit Ausnahme der ersten 8 Vertiefungen mit 150 µl modifiziertem M199-Medium je Vertiefung befüllt. Nach sorgfältigem Mischen der zu untersuchenden Zellsuspension mit einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf) wurde in die Vertiefungen der ersten (unverdünnt) und zweiten Reihe jeweils 150 µl der Zellsuspension gegeben, die darauffolgend in 1:2-Verdünnungsschritten seriell verdünnt wurde. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und bis zur Auswertung 2 bis 3 Wochen bei 25 °C inkubiert.

Für den höchsten Verdünnungsschritt, bei dem noch in 50 % der 8 Vertiefungen lebende Parasiten zu beobachten waren, wurde eine Verdünnung von einer Zelle/Vertiefung angenommen.

Die *limiting dilution*-Analyse wurde zur Bestimmung der Anzahl unabhängiger Transfektanden nach Elektroporation von *L. major* mit Cosmid-Genbank-DNA (2.2.2.1) eingesetzt, sowie für die Ermittlung des Anteils rekombinanter Leishmanien an der Parasitenlast von Organen aus BALB/c-Mäusen, die mit einem Gemisch von *L. major* [pcos]-Stämmen infiziert worden waren (2.2.5). Außerdem diente die Methode im Rahmen von Thermotoleranzstudien der Quantifizierung von überlebenden Parasiten (2.2.6).

2.2.4 In vitro-Selektion rekombinanter *L. major*-Promastigoter

2.2.4.1 Selektion bei 37°C

Primäre Selektion

L. major-Promastigote, die mit Cosmid-Genbank-DNA transfiziert worden waren, wurden unmittelbar nach der Geneticin-Selektion einer Selektion bei 37°C unterzogen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $4-5 \times 10^6$ Zellen/ml in modifiziertem M199-Medium mit 50 µg/ml Geneticin bei einem Gesamtvolumen von 70 ml eingesät und bis zu 8 Tagen bei 37°C inkubiert. Nach 4, 5 und 6 Tagen wurde den Ansätzen Aliquots entnommen, die Zellen in frisches Medium überführt und bei 25°C kultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten

entsprechende Ansätze des *L. major*-Wildtyp-Stamms, die in gleicher Weise behandelt wurden.

Rekombinante Leishmanien, die im Vergleich zum Wildtyp eine längere Behandlung bei 37°C überlebten, wurden eingefroren (2.2.1.3) bzw. zur Isolierung der Cosmid-DNA (2.2.9.4) amplifiziert.

Die primäre Selektion der Parasiten, die mit den Plasmid-Genbanken aus den Cosmiden transfiziert worden waren, erfolgte in entsprechender Weise, jedoch wurden den Ansätzen nach 5, 6 und 8 Tagen Proben entnommen.

Sekundäre konkurrierende Selektion

Die verschiedenen *L. major* [pcos]-Stämme, deren Wachstum durch tägliches Verdünnen über ca. eine Woche synchronisiert worden war, wurden mit einer Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml in modifiziertes M199-Medium mit 50 µg/ml Geneticin eingesät. Die verdünnten Kulturen wurden im gleichen Verhältnis miteinander gemischt und die Mischkulturen bei 37°C kultiviert, wobei den Ansätzen, wie oben beschrieben, nach 4, 5 und 6 oder 7 Tagen Aliquots entnommen und in einen 25°C-Brutschrank überführt wurden. Als Negativ-Kontrolle enthielten die Mischkulturen den mit dem Cosmid-Vektor transfizierten *L. major*-Stamm *L. m* [pcosTL].

Aus überlebenden Parasiten wurde die episomale DNA isoliert (2.2.9.4)

2.2.4.2 Selektion bei 25 °C

Nach Transfektion (2.2.2) von *L. major* mit Plasmid-Genbank-DNA und anschließender Geneticin-Selektion wurden die rekombinanten Parasiten 12 Wochen in modifiziertem M199-Medium mit bzw. ohne Geneticin bei 25 °C kultiviert und während dieser Zeit zweimal wöchentlich 1:20 verdünnt. Nachfolgend wurde aus den Zellen die episomale DNA isoliert (2.2.9.4)

2.2.5. Passage von *L. major*-Stämmen in der BALB/c-Maus

Die verschiedenen *Leishmania*-Stämme wurden in modifiziertem M199-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bis zum Erreichen der spät-logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und noch weitere 2 bis 3 Tage darüber hinaus, wobei täglich das Medium gewechselt wurde. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die stationären Parasiten sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C) und zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Die Zellsedimente wurden in PBS resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 1×10^9 oder 2×10^9 Zellen/ml vorlag.

Sollte ein Gemisch verschiedener Stämme für die Infektion eingesetzt werden, wurden die Zellen der Stämme vor der Sedimentation im gleichen Verhältnis miteinander gemischt.

Die Infektion der BALB/c-Mäuse erfolgte mit 5×10^7 Leishmanien in 50 oder 25 µl PBS, die in den rechten hinteren Fußballen injiziert wurden. Die Läsionsentwicklung wurde durch Messung der Dicke des rechten und linken Fußballens jeder Maus verfolgt und die Differenz dieser Werte als Läsionsgröße in mm dokumentiert.

Nach 9 bis 10 Wochen wurden die Mäuse getötet und Lymphknoten und Milzen entnommen. Die Organe wurden in modifiziertem M199-Medium homogenisiert und nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei 25°C kultiviert. Ansätzen zur Reisolierung von *L. major*-

pIR/A-Stämmen wurde kein Antibiotikum hinzugefügt. Sollte der Anteil rekombinanter Parasiten an den reisolierten Parasiten bestimmt werden, wurden die Organe zunächst in einem definierten Volumen modifiziertem M199-Medium homogenisiert. Aliquots der Homogenisate ohne Antibiotikum und mit Antibiotikum, wurden in eine *limiting dilution*-Analyse (2.2.3) eingesetzt.

Nachdem in den Ansätzen ein deutliches Wachstum promastigoter Formen zu verzeichnen war, wurden die Kulturen erweitert und anschließend eingefroren (2.2.1.3). Außerdem wurde zur Untersuchung der Verteilung der verschiedenen Stämme nach der Mauspassage aus den rekombinanten Parasiten entweder die episomale DNA isoliert (2.2.9.4), oder die Zellen wurden zur Herstellung von Einzelklonen, aus denen letztendlich die genomische DNA gewonnen werden sollte (2.2.9.5), verdünnt und in Mikrotiterplatten eingesät (2.2.1.4).

Zur Bestimmung der relativen Parasitenlast der Organe mittels *real time*-PCR wurden die Organe nicht homogenisiert, sondern in 4 (Milz) bzw 2 (Lymphknoten) Teile zerschnitten, gewogen und bis zur Isolierung der genomischen DNA (2.2.9.5) bei -70 °C eingefroren.

2.2.6 Thermotoleranzstudien

Für die Untersuchung der Thermotoleranz von unterschiedlichen rekombinanten *L. major*-Stämmen wurde das Wachstum der Stämme durch tägliches Verdünnen über ca. eine Woche synchronisiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in modifiziertes M199-Medium mit 50 µg/ml Geneticin eingesät und mehrere Tage bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Anzahl überlebender Zellen wurde ein Aliquot der Kulturen anschließend in eine *limiting dilution*-Analyse eingesetzt (2.2.3).

2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Durch eine Calciumchlorid-Behandlung werden Bakterienzellen für die Aufnahme von DNA-Molekülen empfänglich gemacht (Cohen *et al*, 1972).

Für die Herstellung Transformations-kompetenter Zellen des *E. coli*-Stamms BL 21 (DE 3) [pAPlac²] wurde von den Bakterien zunächst auf einer CG-Platte mit 10 µg/ml Kanamycin ein Verdünnungsausstrich angefertigt und bei 37°C über Nacht inkubiert. 200 ml CG-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin wurde mit einer Kolonie des Ausstrichs angeimpft und in einem Schüttel-Inkubator bei 37°C kultiviert bis eine OD_{600nm} von 0,2 bis 0,3 erreicht worden war. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (10 Minuten, 3000 x g, 4°C) und bei 4°C in 20 ml einer eisgekühlten 50 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert (15 Minuten, 420 x g, 4°C) und in 2 ml einer Lösung bestehend aus 50 mM Calciumchlorid, 50 % Glycerin und 7 % DMSO aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden auf einer Eis/Ethanol-Mischung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei -70°C gelagert.

2.2.8 Transformation von *Escherichia coli*

DH5α

Zur Transformation von DH5α-Zellen (Gibco BRL, *subcloning efficiency* DH5α™ *competent cells*) wurden 50 oder 100 µl auf Eis aufgetaute kompetente Zellen mit 1µl Plasmid- oder

Cosmid-DNA bzw. mit 1 bis 4 µl eines Ligationsansatzes (2.2.10.4) gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 bzw. 45 Sekunden in einem Wasserbad bei 37°C behandelt und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden nach Zugabe von 1 ml CG 1 h bei 37 °C geschüttelt, anschließend zentrifugiert (3 Minuten, 1000 x g, RT) und in 120 µl CG resuspendiert. Die Selektion von Transformanden erfolgte auf CG-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Es wurden jeweils 100 µl und 10 µl der Zellsuspension ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation von *E. coli* mit episomaler DNA, die aus rekombinanten Leishmanien isoliert worden war, wurden kompetente DH5α-Zellen mit einer höheren Transformationseffizienz verwendet (Gibco BRL, *library efficiency DH5α™ competent cells*) und 5 µl (ca. 50 ng) von der DNA eingesetzt.

BL 21 (DE 3) [pAPlac^Q]

Für die Transformation von BL 21 (DE 3) [pAPlac^Q] wurden 50 µl kompetente (2.2.7) Zellen und 1 µl einer Plasmid-DNA-Mini-Präparation eingesetzt. Abweichend vom oben beschriebenen Protokoll wurde die Hitze-Behandlung 30 Sekunden bei 42°C durchgeführt, es wurden nur 500 µl CG nach der zweiminütigen Inkubation auf Eis hinzugefügt, der Zentrifugationsschritt entfiel und es wurden direkt 50 µl und 100 µl des Ansatzes auf Ampicillin (100 µg/ml)- und Kanamycin (10µg/ml)-haltige CG-Agar-Platten ausgestrichen.

XL1-Blue

Die Transformation von *E. coli* mit Derivaten des Cosmids pcos8, das einer Transposon-Mutagenese (2.2.18) unterzogen worden war, erfolgte durch Elektroporation. Es kann durch diese Methode zur Transformation von *E. coli* eine wesentlich höhere Effizienz erzielt werden, als mit einer chemischen Transformationsmethode (Dower, W. J. *et al.*, 1988)

Für die Elektroporation von kompetenten XL1-Blue-Zellen (Stratagene, Epicurian Coli® *Electroporation-competent cells*) wurden 1 µl bzw. 10 µl einer 1:10-Verdünnung des Reaktionsansatzes mit jeweils 40 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien in vorgekühlten Reaktionsgefäßen gemischt und in ebenfalls vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser™ (BioRad) durch einen Stromstoß von 17000 V/cm und 25 µF. Die Zeitkonstante lag bei ca. 4 ms. Die Ansätze wurden auf Eis mit 960 µl CG-Medium versetzt, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion von Transformanden mit pcos8/Tn7-Derivaten wurden die Ansätze auf CG-Agar-Platten mit 15 µl/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

2.2.9 DNA-Isolierung

- Lösung 1: 50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl (pH8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)
- Lösung 2: 0,2 M Natriumhydroxid
1 % SDS

<u>Lösung 3:</u>	3 M Kaliumacetat
	2 M Eisessig
<u>TE:</u>	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	0,1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

Zur Analyse von Transformanten wurde Plasmid- bzw. Cosmid-DNA präpariert. Die Isolierung der DNA erfolgte durch alkalische Lyse in Anlehnung an die von Birnboim und Doly (1979) und Ish-Horowicz und Burke (1981) beschriebenen Methoden.

Jeweils 2 ml CG-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert (2 Minuten, 12000 x g, 4°C), in 200 µl Lösung 1 resuspendiert und anschließend mit 400 µl Lösung 2 lysiert (2 bis 3 Minuten, RT). Die Proteine und das SDS wurden durch Zugabe von 300 µl Lösung 3 und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis gefällt. Zelltrümmer, ausgefallene Proteine und SDS wurden durch Zentrifugation (15-30 Minuten, 12000 x g, 4°C) von der gelösten DNA getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (10 Minuten, RT). Das nach 15- bis 30- minütiger Zentrifugation (12000 x g, RT oder 4°C) erhaltene DNA-Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-30 µl TE mit 20 µg/ml RNase A gelöst.

Plasmid-DNA, die für die Sequenzierung (2.2.20) verwendet werden sollte, wurde über Säulen mit einer Glasfaser-Matrix aufgereinigt. Es wurde der GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia) verwendet. Die DNA wurde mit 300 bis 400 µl der Lösung 3 (Acetat-haltiger Puffer mit Chaotropen) des Kits gemischt und auf die Säule aufgetragen. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde zentrifugiert (30 Sekunden, 12000 upm, RT). Zur Entfernung von Verunreinigungen wurde auf die Säule ein Waschpuffer (Tris-EDTA-Puffer/80 % Ethanol) gegeben und anschließend zentrifugiert. Durch Wiederholung des Zentrifugationsschrittes wurde das Säulenmaterial getrocknet, und die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl A. dest. (HPLC). Nach einminütiger Inkubation wurde das Eluat durch Zentrifugation (2 Minuten, 12000 upm, RT) der Säule gewonnen.

2.2.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte wie eine Mini-Präparation durch alkalische Lyse. Zur Reinigung der DNA, die unter anderem für die Transfektion von Leishmanien (2.2.2) eingesetzt werden sollte, wurde entweder eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, oder es wurden Anionenaustauschersäulen (Plasmid-Maxi-Kit, QIAGEN) verwendet.

Zur Aufarbeitung einer 400 ml-Über-Nacht-Kultur wurden die Bakterien sedimentiert (10 Minuten, Beckman JA-10-Rotor, 5000 upm, 4°C), in 10 ml Lösung 1 suspendiert, mit 20 ml Lösung 2 durch vorsichtiges schwenken gemischt und 5 Minuten bei RT auf einem Rollenschüttler lysiert. Zum Bakterienlysat wurden zur Fällung der Proteine und des SDS 15 ml Lösung 3 hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der DNA von Zelltrümmern, ausgefallenen Proteinen und SDS

wurde durch Zentrifugation (30 Minuten, Beckman JA-10-Rotor, 10000 upm, 0°C) und Filtration des Überstandes erreicht. Aus dem Filtrat wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol 10 Minuten bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (20 Minuten, 4000 upm RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 4 ml TE gelöst.

Zur Isolierung der superhelicalen Form der Plasmid-DNA durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation wurde die in TE gelöste Plasmid-DNA mit 4,85 bis 4,95 g Cäsiumchlorid und 150 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt, das Luftblasen-frei mit einer 50 % igen Cäsiumchloridlösung aufgefüllt und anschließend zugeschweißt wurde. Nach der ersten Zentrifugation (Beckman vTi 65-Vertikalrotor, 45000 upm, 25°C, 16-18 h) wurde die Plasmid-DNA, die durch die Ethidiumbromid-Färbung als Bande in der Mitte des Röhrchens sichtbar war, in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen überführt, das mit 50 %iger Cäsiumchloridlösung aufgefüllt und zugeschweißt wurde. Es erfolgte eine zweite Zentrifugation für 6-7 Stunden bei 60000 upm. Mit einer Pasteurpipette wurde die superhelikale DNA entnommen und das interkalierte Ethidiumbromid durch mehrmalige Extraktion mit einem Volumen Ammoniumacetat-gesättigtem Isopropanol entfernt. Anschließend wurden 2 Volumen A. dest. hinzugefügt und die Plasmid-DNA mit 0,1 Volumen 10 M Ammoniumacetat und ca. 3 Volumen Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (20-30 Minuten, 4000 upm, RT), das DNA-Präzipitat mit 70 % iger Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 0,5 bis 1 ml TE gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm.

Die Plasmid- bzw. Cosmid-DNA-Präparation mit nachfolgender Aufreinigung der DNA über Anionenaustauschersäulen (QIAGEN-tip 500) erfolgte entweder unter Verwendung der im Plasmid-Maxi-Kit (QIAGEN) mitgelieferten Lösungen nach den Angaben des Herstellers, oder es wurden die selbst hergestellten Lösungen verwendet. Abweichend von dem bereits beschriebenen Protokoll wurde in diesem Fall das Filtrat mit 40 µg/ml RNase A behandelt (30 Minuten, 37°C) und anschließend auf die Säule aufgetragen. Eine Fällung mit Isopropanol vor der Aufreinigung erfolgte nur bei der Isolierung von Cosmid-DNA. Für die Aufarbeitung einer 200 ml-Über-Nacht-Kultur wurden geringere Volumen der Lösungen 1 (6 ml), 2 (12 ml) und 3 (9 ml) eingesetzt.

2.2.9.3 Präparation von Cosmid-Genbank-DNA

Für die Transfektion von *L. major* wurde Cosmid-Genbank-DNA aus *Escherichia coli* DH5α und XL1-Blue MRF´ isoliert. Mit einem 1 ml-Aliquot der Cosmid-Genbank wurden jeweils 400 bis 500 ml CG-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und 20 bis 22 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Präparation erfolgte zunächst wie unter 2.2.9.2 beschrieben, jedoch wurden 12 ml Lösung 1, 24 ml Lösung 2 und 18 ml Lösung 3 eingesetzt. Das nach Zentrifugation des mit Lösung 3 versetzten Lysats und Filtration des Überstandes erhaltene Filtrat wurde mit 40 µg/ml RNase A versetzt, mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 1780 x g, RT) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA, wie bereits beschrieben, mit Isopropanol gefällt, sedimentiert, mit 70 % iger Ethanol gewaschen und nachfolgend in 7,5 ml A. dest. gelöst. Die Reinigung der Cosmid-DNA erfolgte durch eine PEG-Präzipitation. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen PEG-Lösung (13 % PEG 6000, 0,8 M Natriumchlorid) versetzt, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 Stunde, 1780 x g, 4°C). Das kaum sichtbare

DNA-Präzipitat wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen und nach dem Entfernen des Ethanols sofort in ca. 500 µl TE bei 37°C über Nacht gelöst. Zur Qualitäts-Kontrolle der isolierten Cosmid-Genbank-DNA hinsichtlich ihrer Heterogenität wurde, wie bei Descoteaux *et al.* (1994) beschrieben, ein Aliquot vor der Transfektion (2.2.2) einer Restriktionsanalyse unterzogen (2.2.10.1).

2.2.9.4 Isolierung episomaler DNA aus Leishmanien

Die Isolierung episomaler DNA aus rekombinanten Leishmanien nach einer Geneticin-Selektion oder aus Leishmanien, die einer primären Selektion bei 37°C oder einer sekundären konkurrierenden Selektion unterzogen worden waren, erfolgte wie unter 2.2.9.1 beschrieben durch alkalische Lyse.

2 bis 3×10^9 Zellen der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C) und zweimal mit gekühltem PBS gewaschen. Abweichend von dem unter 2.2.9.1 beschriebenen Protokoll wurde jeweils das 10-fache Volumen der Lösungen 1, 2 und 3 eingesetzt. Nach Behandlung des Lysats mit Lösung 3 wurde zentrifugiert (30 Minuten, 1780 x g, 4°C) und der Überstand filtriert. Das Filtrat wurde einem RNase A-Verdau (40 µg/ml, 30 Minuten, 37°C) unterzogen und anschließend mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA wie beschrieben gefällt. Die Zentrifugation erfolgte jedoch bei 1780 x g und das DNA-Präzipitat wurde in 20 bis 30 µl TE gelöst.

Zur Isolierung von Cosmid-DNA aus den *L. major*-Stämmen *L. m.* [pcos11.2], *L. m.* [pcos11.3], *L. m.* [pcospcos13.12] und *L. m.* [pcos14.4], die für die Herstellung von Plasmid-Genbanken eingesetzt werden sollte, wurden ca. 5×10^{10} mit PBS gewaschene Leishmanien wie unter 2.2.9.2 beschrieben aufgearbeitet. Die Reinigung der DNA erfolgte über Anionenaustauschersäulen (QIAGEN-tip 500). Die DNA wurde in ca. 200 µl TE gelöst.

2.2.9.5 Isolierung genomischer DNA aus *Leishmania*-Einzelklonen und Organ-Homogenisaten

Die Identifizierung verschiedener *L. major*-pIR-Stämme in einem Gemisch erforderte die Isolierung genomischer DNA aus amplifizierten *Leishmania*-Einzelklonen (2.2.1.4).

$1-2 \times 10^8$ Zellen der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C), zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen, in ca. 20 µl PBS des zweiten Waschschriffs resuspendiert und anschließend aufgearbeitet oder bei -70°C eingefroren. Für die Isolierung der genomischen DNA wurde der PUREGENE® *DNA Isolation Kit* (Gentra Systems) verwendet, dem ein relativ schnelles und einfaches Protokoll zugrunde liegt. Die in PBS resuspendierten Zellen wurden zunächst lysiert, anschließend erfolgte der Abbau der RNA durch RNase A-Behandlung und Proteine wurden durch Salz-Präzipitation entfernt. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde die genomische DNA mit Isopropanol gefällt, das DNA-Präzipitat mit 70 % igem Ethanol gewaschen und in einer gepufferten Lösung mit einer DNA-stabilisierenden Komponente (*Hydration Solution*) gelöst.

Für die Isolierung der genomischen DNA aus Milz- oder Lymphknotengewebe wurden die Organfragmente zunächst in der Lösung zur Lyse der Zellen zermörsert, mit Proteinase K versetzt und bei 55°C über Nacht inkubiert bzw. bis die Gewebe-Partikel gelöst waren. Die

Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.10 Enzymatische Modifizierung von DNA

2.2.10.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von Plasmid- oder Cosmid-DNA wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

In einem Volumen von 15 µl wurden 1 bis 3 µl einer Plasmid-Mini-Präparation oder ca. 1 µg DNA mit ca. 1 U Restriktionsendonuklease in dem für das verwendete Enzym empfohlenen Puffer mindestens 2 Stunden bei den angegebenen Optimaltemperaturen inkubiert und anschließend in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.12).

Vektor-Plasmide und Fragmente, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurden durch einen Verdau im präparativen Maßstab erhalten. In einem 100 µl-Ansatz wurden 10-20 µg DNA mit 20 bis 60 U des entsprechenden Restriktionsenzym für 3 bis 5 Stunden oder über Nacht behandelt. Die DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt (2.2.13).

Für einen Partialverdau der Cosmide pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 wurde zunächst jeweils 1 µg Cosmid-DNA in einem 30 µl-Ansatz mit verschiedenen suboptimalen Konzentrationen der Restriktionsenzyme *Sau* 3AI bzw. *Mbo* I genau 1 Stunde bei 37°C verdaut. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Ansätze anschließend mit 20 mM EDTA versetzt und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Ansätze wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert, um den Enzymkonzentrationsbereich zu ermitteln, der zu einer relativ guten Ausbeute an DNA-Fragmenten der gewünschten Größe führt. Unter diesen Bedingungen wurde ein Partialverdau im präparativen Maßstab durchgeführt. Die nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarose-Gel isolierten DNA-Fragmente wurden zur Herstellung von Plasmid-Genbanken verwendet.

2.2.10.2 Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen endständiger 5'-Phosphatgruppen und wird zur Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA eingesetzt, um deren Rezirkularisierung während einer Ligation zu verhindern, und um somit die Klonierungseffizienz zu erhöhen.

Ein Restriktionsansatz wurde zur Dephosphorylierung der linearisierten DNA entweder direkt mit Reaktionspuffer und Alkalischer Phosphatase versetzt, oder es wurde DNA verwendet, die nach Extraktion eines Restriktionsansatzes mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aus der wässrigen Phase mit 0,1 Volumen 10 M Ammoniumacetat und ca. 3 Volumen Ethanol gefällt und nachfolgend in A. dest. gelöst wurde.

Ein Ansatz wurde mit 0,1 Volumen 10 x Reaktionspuffer und mindestens 1 U Alkalische Phosphatase versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Fragmente mit 5'-Überhang) bzw. es wurde anschließend nochmals Enzym hinzugefügt und die Behandlung für weitere 45 Minuten bei 55 °C fortgesetzt (Fragmente mit 3'-Überhang und Fragmente mit stumpfen Enden). Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch die Zugabe von EGTA (Endkonzentration: 5mM) und eine zehnminütige Inkubation bei 75°C. Die Vektor-DNA wurde

nachfolgend in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.12), isoliert und aufgereinigt (2.2.13).

2.2.10.3 Fill in-Reaktion zur Herstellung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten mit einzelsträngigen, 5'-überhängenden DNA-Enden in Vektoren mit stumpfen Enden wurden die Überhänge durch die *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym) mit 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphaten (dNTPs) aufgefüllt, um kompatible Enden zu erhalten.

In einem 10 µl-Ansatz wurden ca. 0,2 bis 0,5 µg eines aufgereinigten DNA-Fragments mit 1 U/µg Klenow-Enzym und je 33 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in dem für das Enzym empfohlenen Puffer 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA und einer zehnminütigen Inkubation bei 75°C gestoppt. Das Fragment wurde aufgereinigt und in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

2.2.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationsreaktion dient der Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit einem linearisierten Vektor. Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen Phosphatresten am 5'-Ende von doppelsträngigen DNA-Molekülen und benachbarten 3'-Hydroxylgruppen.

Zur Abschätzung des Vektor-Insert-Verhältnisses wurde nach der Auftrennung von jeweils 1 µl der aufgereinigten DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel, die Färbeintensität der Banden verglichen. Für die Ligation wurden ca. 50 ng eines linearisierten Vektors und die ein- bis zweifache Menge eines Inserts eingesetzt, das somit in einem molaren Überschuss vorlag. Die DNA-Fragmente wurden in einem 10 µl-Ansatz mit 5 U (Weiss-U) T4-DNA-Ligase in dem für die Ligase empfohlenen Puffer entweder 16 bis 18 Stunden bei ca. 4°C oder 4 Stunden bei 16°C ligiert. Die Ligationsreaktion von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden erfolgte mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur. Bis zur Transformation (2.2.8) wurde der Ansatz bei -20°C aufbewahrt.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der von Saiki *et al.* (1988) beschriebenen PCR-Methode werden DNA-Abschnitte, die von zwei Oligonukleotiden begrenzt werden, welche jeweils komplementär zum 3'-Ende eines DNA-Stranges sind, von der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) in einer zyklischen Abfolge von Hitzedenaturierung der Matrizen-DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide (*annealing*) und DNA-Synthese (Elongation), amplifiziert.

Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Subklonierung

Die ORF 2, 3, 4 und 5 aus dem Cosmid pcos8 und die ORF 1, 2 und 3 aus dem Cosmid pcos13.12 wurden in einer PCR mit den unter 2.1.7.2 angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert.

Für die Amplifikation wurde der FailSafe™PCR PreMix Selection Kit (Epicentre Technologies) verwendet, der sich aus einem Enzym-Mix und einer Auswahl von zweifach konzentrierten

Puffer-Mischungen zusammensetzt, die bereits alle vier dNTPs enthalten und unterschiedliche Konzentrationen an Magnesiumchlorid und die PCR unterstützende Substanzen (u. a. Betain) aufweisen. Der Enzym-Mix enthält u. a. eine thermostabile Polymerase mit einer *proof-reading*-Aktivität (5`-3` Exonukleaseaktivität), um eine hohe Genauigkeit bei der Synthese zu erzielen. Die Amplifikation der langen ORF 1 und 2 aus pcos13.12 erfolgte mit dem MasterAmp™ Extra-Long PCR Kit (Epicentre Technologies).

Ein 50 µl-Ansatz enthielt 25 µl einer Puffer-Mischung mit jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, ca. 500 ng Cosmid-DNA, 10 pmol von dem verwendeten 5`- und 3`-Oligonukleotid und 1,25 U bzw. 2,5 U (ORF 1 und 2 aus pcos13.12) Enzym-Mix.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra) oder in einem Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die Amplifikation der verschiedenen ORF nach einer initialen Denaturierung der Matrizen-DNA bei 95°C für 5 Minuten (pcos13.12/ORF 1 und 2: 2 Minuten) erfolgte in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung

Zeit: 30 Sekunden

Temperatur: 95°C

Annealing

Zeit: 30 Sekunden

Temperatur: 58°C (pcos8/ORF3)
65°C (pcos8/ORF 2, 4 und 5)
70°C (pcos13.12/ORF 1 und 2)
72°C (pcos13.12/ORF 3)

Elongation

Zeit: 2 Minuten (pcos8/ORF 2 und 5, pcos13.12/ORF 3)
3 Minuten (pcos8/ORF3)
3,5 Minuten (pcos8/ORF4)
5 Minuten (pcos13.12/ORF 1)
5,5 Minuten (pcos13.12/ORF 2)

Temperatur: 72°C

An den letzten Zyklus schloß sich ein zusätzlicher Elongationsschritt von 5 Minuten (pcos13.12/ORF 1 und 2: 7 Minuten) an, um die vollständige Synthese aller DNA-Fragmente sicherzustellen. Jeweils 5 µl der PCR-Ansätze wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.12), um die Puffer-Mischung zu ermitteln, die eine effiziente Amplifikation von DNA-Fragmenten der gewünschten Größe ermöglichte. Diese Puffer-Mischung wurde in eine Kontroll-PCR eingesetzt mit Ansätzen, die jeweils nur ein Oligonukleotid enthielt, bzw. keine DNA, um eine unspezifische Amplifikation bzw. eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.12) gelungener PCR-Ansätze aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt (2.2.13).

Amplifikation Klon-spezifischer Fragmente

Verschiedene *L. major* (pIR)-Stämme in einem Gemisch wurden durch eine PCR-Analyse der genomischen DNA aus *Leishmania*-Einzelklonen (2.2.9.5) identifiziert. In die Reaktion wurde eine Kombination von Oligonukleotiden oder 5'- und 3'-Oligonukleotidpaare (2.1.7.3) eingesetzt, die in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA zu einer Amplifikation eines spezifischen Fragments führen, dessen Größe für einen bestimmten *L. major* (pIR/A)-Stamm charakteristisch ist.

Ein 50 µl-Ansatz enthielt 2 µl genomische DNA (100-200 ng), jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega), 5 µl *Taq*-DNA-Polymerase-10xPuffer (Promega), 2,25 mM Magnesiumchlorid, jeweils 10 pmol 5'-und 3'-Oligonukleotid oder 2 µl eines Oligonukleotid-Gemischs. Das Gemisch setzte sich entweder aus den Oligonukleotiden 5`DSP, 5`ASC I, 5`Helicase, 5`Adaptin, 5`PDE/1 und 3`pIR/A zusammen, so dass im PCR-Ansatz jedes Oligonukleotid mit 6,6 pmol vertreten war, oder das Gemisch bestand aus den Oligonukleotiden 5`PDE/2, 5`Mucin, 5`ORF3 und 3`pIR/A. In diesem Fall enthielt ein Ansatz 10 pmol von jedem Oligonukleotid.

Als Positiv-Kontrollen wurde jeweils 100 ng der Plasmide, mit denen die Parasiten transfiziert worden waren oder die genomische DNA aus den *Leishmania*-Stämmen in eine Reaktion eingesetzt.

Die PCR wurde in einem Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in 35 Zyklen nach folgendem Programm: 2 Minuten, 95°C (Initiale Denaturierung); 0,5 Minuten, 95°C (Denaturierung); 0,5 Minuten, 64°C (Annealing), 2 Minuten, 72°C (Elongation); 5 Minuten, 72°C (Zusätzlicher Elongationsschritt nach dem letzten Zyklus). Zur Analyse der PCR-Ansätze wurde ca. ein Drittel der Ansätze in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.12).

Real time-PCR

Durch Fluoreszenzfarbstoffe, wie SYBR-Green I, die spezifisch an doppelsträngige DNA binden und den PCR-Ansätzen hinzugefügt werden, oder durch den Zusatz von Hybridisierungs sonden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, ist es möglich den Verlauf der Amplifikation eines PCR-Produkts direkt zu verfolgen (*in real time*). Die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen wird aufgezeichnet. Außerdem ist eine Schmelzkurven-Analyse zur Spezifizierung des Produkts möglich.

Zur Quantifizierung wird die exponentielle Phase der PCR-Kinetik analysiert. Je höher die Template-DNA-Konzentration in einer Probe, desto weniger Zyklen sind erforderlich, um die exponentielle Phase der Amplifikation zu erreichen. Der sogenannte *crossing point* oder *threshold cycle*, Ct, ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den Hintergrund-Wert übersteigt und die Amplifikation in die logarithmisch-lineare Phase eintritt. Durch die Bestimmung der Ct-Werte von Standard-Proben mit bekannter Konzentration erhält man eine Standardkurve. Die Ct-Werte werden in Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentrationen dargestellt und eine Quantifizierung unbekannter Proben ist anhand ihrer Ct-Werte möglich (Heid *et al.* 1996).

Die Bestimmung der Parasitenlast in Milz- und Lymphknoten-Gewebe aus BALB/c-Mäusen, die mit den *Leishmania*-Stämmen *L. m.* (pIR), *L. m.* (pIR/A-DSP), *L. m.* (pIR/A-PDE) bzw. *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) infiziert worden waren, erfolgte durch *real time*-PCR. Durchführung und Auswertung der *real-time*-PCR wurden freundlicherweise von A. Schulz und S. Graefe (Medizinische Zentral Diagnostik, BNI) übernommen.

Für die relative Quantifizierung wurde jeweils eine Reaktion zur Bestimmung des *Leishmania*-DNA-Gehalts und eine Reaktion zur Bestimmung des Maus-DNA-Gehalts durchgeführt.

Die Amplifikation eines *Leishmania major*-spezifischen 483 bp-Fragments aus dem ribosomalen RNA-Genlocus, der für die 18 S-rRNA kodiert, erfolgte in einem LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

Es wurden die Oligonukleotide IsS1 (Sense-Primer) und IsRv (Antisense-Primer) eingesetzt:

IsS1: 5`-GCTCCAAAAGCGTATATTAATGCTGT-3`

IsRv: 5`-TCCTTCATTCCTAGAGGCCGTGAGT-3`

Die Oligonukleotide Dif 1c und Dif 3, markiert mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein (X, Dif 1c) und LightCycler (LC) Red 640 (Dif 3), dienten als Hybridisierungs sonden und ermöglichen einen spezifischen und quantifizierbaren Nachweis der Amplifikation der *Leishmania*-DNA:

Dif 1c: 5`-GGTTTTAAAGGTCTATTGGAGATTATGGAGCTGTGCG X-3`

Dif 3: 5`-LC Red 640-CAAGCGCTTCCCATCGCAACCTCGGTp-3`

Die Oligonukleotide hybridisieren in unmittelbarer Nähe voneinander an die Ziel-DNA, so dass das 3`-Ende des Oligonukleotids mit dem Donor-Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein und das mit dem Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff markierte 5`-Ende des zweiten Oligonukleotids nur wenige Nukleotide voneinander entfernt sind. Nur durch die unmittelbare Nachbarschaft der Fluoreszenzfarbstoffe ist der Energie-Transfer vom Donor zum Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff möglich (FRET=*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Das Fluorescein wird von der Lichtquelle des LightCyclers angeregt und emittiert Licht grüner Wellenlänge, das vom Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff absorbiert wird, der dadurch seinerseits zur Fluoreszenz angeregt wird und Licht roter Wellenlänge aussendet, das vom Fluorimeter des Geräts erfaßt wird.

Ein 20 µl-PCR-Ansatz in einer 20 µl-Glaskapillare (LightCycler®) enthielt 2 µl DNA (ca. 400 ng) 3,5 mM Magnesiumchlorid, 1xPCR-Puffer [PE Applied Biosystems, Weiterstadt: 10 mM Tris-HCl, 50 mM Kaliumchlorid (pH 8,3)], jeweils 400 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (GeneAmp®, PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 0,35 µM IsS1, 0,5 µM IsRv, 0,2 µM Dif 1c, 0,2 µM Dif 3, 0,5 µl BSA (1 mg/ml, Sigma Aldrich, München) und 1 U AmpliTaqGold (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Minuten, erfolgte die Amplifikation in 45 Zyklen nach folgendem Programm: 10 Sekunden, 95°C (Denaturierung); 5 Sekunden, 55°C (Annealing); 40 Sekunden, 72°C (Elongation). Abschließend wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Nach einer initialen Denaturierung (10 Sekunden, 95°C) wurde bei einer Temperatur von 50°C 15 Sekunden inkubiert und anschließend die Temperatur kontinuierlich erhöht (0,1°C/Sekunde) bis eine Temperatur von 80°C erreicht worden war.

Die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs LightCyclerRed® wurde bei einer Wellenlänge von 640 nm gemessen (Detektor-Kanal 2, F2)

Reaktionsansätze mit Signalen, welche die Signale der Negativ-Kontrollen überstiegen, wurden als positiv hinsichtlich des Vorhandenseins von *Leishmania*-DNA angesehen.

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Anwendung des *Fit points*-Algorithmus der LightCycler-Quantifizierungs-Software.

Bei einer relativen Quantifizierung wird jede Probe hinsichtlich ihres Maus-DNA-Gehalts normalisiert. Die Ergebnisse sind somit unabhängig von der untersuchten DNA-Menge und damit von der Effizienz der DNA-Isolierung.

Die Amplifikation eines Maus-DNA spezifischen β -Actin-Fragments (347 bp) wurde in Anlehnung an die Beschreibung von Pahl *et al.* (1999) mit den folgenden Oligonukleotiden durchgeführt.

Sense-Primer: 5`-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3`

Antisense-Primer: 5`-TGGGTATGGAATCCTGTGGCATCC-3`

Als Hybridisierungssonde wurde folgendes Oligonukleotid eingesetzt:

5`-(FAM)TATGCTC(TAMRA)TCCCTCACGCCATCCTGCGT-3`

Es handelt sich dabei um eine sogenannte TaqMan-Sonde, die sowohl am 5`-Ende (FAM: 6-Carboxyfluorescein), als auch am 3`-Ende oder wie in diesem Fall intern (TAMRA: 6-Carboxy-N, N, N`, N`-tetramethylrhodamine) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die Sonde bindet an die zu amplifizierende DNA und das vom Reporter-Farbstoff (FAM) emittierte Licht wird vom *Quencher*-Farbstoff (TAMRA) absorbiert. Während der Elongationsphase des PCR-Zyklus wird jedoch der Reporter-Farbstoff durch die 5`-3`-Nuklease-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgespalten, wenn das Enzym im Verlauf der Synthese von dem 5` gelegenen Primer aus die Sonde erreicht. Das vom Reporter-Farbstoff emittierte Licht kann somit nicht mehr effektiv auf den *Quencher*-Farbstoff übertragen und absorbiert werden. Das Signal des Reporter-Farbstoffs steigt an, und die charakteristische Fluoreszenz kann gemessen werden.

Ein 50 μ l-PCR-Ansatz enthielt 2 μ l DNA (ca. 400 ng), 0,2 μ M von jedem Primer, 0,1 μ M Sonde, 3 mM Magnesiumchlorid, jeweils 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP (GeneAmp®, PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 10 μ M EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM Kaliumchlorid und 1 U AmpliTaqGold (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

Amplifikation und Nachweis der Fragmente erfolgte mit einem ABI Prism 7700 SDS-Gerät (PE Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.). Einem initialen Denaturierungsschritt (15 Minuten, 95°C) folgten 45 Zyklen, die jeweils 20 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 40 Sekunden bei 58 °C (Annealing und Elongation) umfassten. Die Quantifizierung erfolgte wie bei Bustin *et al.* (2000) beschrieben.

Die *Leishmania*-Genomäquivalente in einer Organ-Probe wurden als Vielfaches der Maus-Genomäquivalente ausgedrückt.

2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

Ladepuffer: 85 % Formamid

10 mM EDTA

0,1 % Bromphenolblau

0,1 % Xylencyanol

DNA-Fragmente können aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats und einer durch ihre Größe bedingte unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde eingesetzt zur Analyse von PCR-Reaktionen (2.2.11) und Restriktionsansätzen (2.2.10.1), im präparativen Maßstab, um DNA-Fragmente aufzureinigen (2.2.13), sowie zur Abschätzung der Konzentration isolierter DNA bzw. gereinigter DNA-Fragmente durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard bekannter Konzentration.

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA wurden 0,7 bis 1 % ige Agarose-Gele angefertigt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit 0,5 µg/µl Ethidiumbromid versetzt und in einen Träger einer Flachbett-Elektrophoresekammer gegossen. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und ein Kamm eingesetzt, um Geltaschen für die aufzutragenden Proben zu erhalten. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und die mit ca. 20 % Ladepuffer versetzten Proben, sowie ein DNA-Marker als Größenreferenz bzw. zur Konzentrationsbestimmung, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm oder 1V/cm bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden und wurden durch eine Aufnahme mit einer Sofortbildkamera dokumentiert.

2.2.13 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der Easy Pure DNA Purification Kit (Biozym) verwendet. Das in einem Agarose-Gel aufgetrennte (2.2.12) DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde bei 55°C in 3 Volumen einer Salzlösung (SALT) vollständig gelöst und anschließend mit 10 µl einer Suspension mit einer Silikatmatrix (BIND) versetzt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei RT inkubiert und regelmäßig gemischt. In dieser Zeit erfolgte die Bindung der DNA an die Silikatmatrix. Der Ansatz wurde zentrifugiert (15 Sekunden, 12000 x g, RT) und die Silikatmatrix mit der adsorbierten DNA zweimal mit 1 ml einer Waschlösung gewaschen. Zur Elution der DNA wurde die Silikatmatrix in ca. 20 µl A. dest. resuspendiert und 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation (1 Minute, 12000 x g, RT) gewonnen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Ausbeute gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.14 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

<u>1 x TBE:</u>	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA, pH 8,0
<u>ESP-Puffer:</u>	0,5 mM EDTA (pH 9,5)
	1 % N-Lauroylsarcosin
	2 mg/ml Proteinase K

Die elektrophoretische Auftrennung von *Leishmania*-Chromosomen erfolgte durch Pulsfeld-Gelelektrophorese. Diese Methode ermöglicht die Auftrennung hochmolekularer DNA durch eine periodische Änderung der Richtung des angelegten elektrischen Feldes. Die DNA-Moleküle befinden sich dabei in einem ständigen Wechsel von Relaxation, während einer Richtungsänderung, und erneuter Ausrichtung entlang des elektrischen Feldes. Da größere Moleküle mehr Zeit für eine Reorientierung nach einem Richtungswechsel benötigen, steht ihnen weniger Zeit für die Wanderung im Feld zur Verfügung als kleinen Molekülen.

Um eine Fragmentierung der Chromosomen durch Scherkräfte zu vermeiden, wurden die zu untersuchenden Zellen in Agarose eingeschmolzen und die Isolierung der chromosomalen DNA erfolgte durch Inkubation der Agaroseblöckchen in dem dafür erforderlichen Puffer.

Promastigote Leishmanien der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, 4°C), entweder einmal in PSG-Puffer (75 mM Dinatriumhydrogenphosphat, pH 8, 65 mM NaCl, 10 % Glucose) gewaschen und in 250 µl PSG-Puffer/2x10⁸ Zellen resuspendiert oder die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in 250 µl PBS/2x10⁸ Zellen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem gleichen Volumen 1 %iger InCert-Agarose (FMC) gemischt und nachfolgend in die Vertiefungen einer Blöckchen-Gießform (BioRad) gefüllt (50 µl=2x10⁷ Zellen/Agaroseblöckchen). Nach ca. 15 Minuten bei 4°C wurden die Blöckchen zur Lyse der Zellen in ESP-Puffer überführt und 2 Tage bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Blöckchen wurden anschließend in ESP-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Die Auftrennung der Chromosomen erfolgte in einem 0,7 %igen Agarose-Gel (Puls Field Certified-Agarose, BioRad, in 0,25 x TBE) mit einem Rotaphor®TypV-Gerät (Biometra). Die Agaroseblöckchen wurden in die Geltaschen überführt, die nachfolgend mit Agarose abgedichtet wurden. Als Längenmarker wurden die Chromosomen des *S. cerevisiae*-Stamms YPH80 eingesetzt. Der Gellauf erfolgte in 0,25 x TBE bei 13°C über eine Zeitspanne von 3 x 30 Stunden unter folgenden Bedingungen:

	<u>Start</u>	<u>30 Stunden</u>	
Zeit zwischen den Rotorbewegungen:	240 Sekunden	100 Sekunden	(log)
Winkel zwischen den 2 Feldrichtungen:	245°	235°	(lin)
Spannung:	120 Volt	90Volt	(lin)

Das Gel wurde im Laufpuffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und nach der Entfärbung dokumentiert. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert (2.2.17) und mit DIG-markierten DNA-Sonden (2.2.15) hybridisiert (2.2.16.2), um Cosmid-Inserts bestimmten Chromosomen zuordnen zu können.

2.2.15 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

STE-Puffer: 0,1 M NaCl
 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA (pH 8,0)

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden wurden im Rahmen von Southern-Blot-Analysen (2.2.17) verwendet, und für das Durchmustern einer Cosmid-Genbank (2.2.16) zur Identifizierung von

Klonen mit pcos13.12-homologen Cosmiden verwendet.

Die Markierung der DNA mit DIG-dUTP erfolgte durch die von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebene Methode des *random primed DNA labeling*. Bei dieser Technik wird ein Zufallsgemisch von Hexanukleotiden eingesetzt. Diese werden an die denaturierte Matrizen-DNA hybridisiert und dienen dem Klenow-Enzym als Startstellen für die DNA-Synthese, in deren Verlauf auch DIG-dUTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird.

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl waren ca. 50 bis 100 ng der zu markierenden DNA, 2 µl eines zehnfach konzentrierten Hexanukleotidgemischs, 2 µl DIG-dNTPs (jeweils 100 µM dATP, dCTP, dGTP, 66 µM dTTP, 33 µM dUTP) und 5 U Klenow-Polymerase enthalten. Die DNA wurde vor Zugabe der restlichen Komponenten 10 bis 15 Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert und 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Markierung erfolgte ca. 20 h bei 37°C. Die nicht inkorporierten dNTPs wurden durch Gelausschlußchromatographie mit Hilfe von Nuc Trap® push columns (Stratagene) nach Angaben des Herstellers entfernt. Die Sonden lagen anschließend in STE-Puffer vor und wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.15.1 Qualitätskontrolle von Digoxigenin-markierter DNA

Zur Abschätzung der Ausbeute an DIG-markierter DNA wurde eine Dot-Blot-Analyse der Sonden im Vergleich zu einer DIG-markierten Kontroll-DNA (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer) durchgeführt. Von der Kontroll-DNA (20 ng/µl) wurden seriell 1:20-, 1:200-, 1:2000-, 1:20000-, 1:200000- und 1:2000000-Verdünnungen in TE (2.2.9) hergestellt. In gleicher Weise wurden die gereinigten Sonden. Jeweils 1 µl der Verdünnungen wurden auf eine positiv geladene Nylon-Membran aufgetragen. Die DNA wurde anschließend durch *crosslinking* (Stratalinker™ 1800, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden und die DIG-markierte DNA wie unter 2.2.18 beschrieben nachgewiesen.

2.2.16 Kolonie-Hybridisierung

Denaturierungslösung: 0,5 M Natriumhydroxid
1,5 M Natriumchlorid
0,1 % SDS

Neutralisierungslösung: 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
1,5 M Natriumchlorid

Mit Hilfe der von Grundstein und Hogness (1975) beschriebenen Methode der Kolonie-Hybridisierung wurden Bakterienkolonien einer *L. major*-Cosmid-Genbank identifiziert, die pcos 13.12-homologe Cosmide enthalten.

2.2.16.1 Kolonie-Transfer

Von der Cosmid-Genbank aus dem Genom von *Leishmania major* (5ASKH), die freundlicherweise von K. Mellenthin zur Verfügung gestellt wurde, wurden jeweils 1000 bis 1200 cfu auf CG/Ampicillin-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Vor dem Transfer der Bakterienkolonien auf Nitrocellulosefilter wurden die Platten ca. 1 Stunde bei 4°C

aufbewahrt. Der Membranfilter wurde luftblasenfrei aufgelegt und nach einer Minute wieder abgezogen, nachdem Filter und Platte mit einer sterilen Kanüle asymmetrisch markiert worden waren.

Um ein Abschwemmen der auf den Filtern haftenden Bakterienkolonien zu vermeiden, wurden die Filter für die nachfolgend beschriebenden Behandlungsschritte luftblasenfrei auf 3 MM Whatman-Papier, das zuvor mit den erforderlichen Lösungen getränkt worden war, aufgelegt. Durch eine 15 minütige Behandlung der Filter mit Denaturierungslösung wurden die Bakterienkolonien lysiert und die DNA wurde denaturiert. Zur Neutralisierung, die für eine gute Bindung der DNA an die Nitrocellulose-Filter erforderlich ist, wurden die Filter jeweils 5 Minuten mit A. dest. und Neutralisierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Filter mit 2xSSC für 15 Minuten.

Um die einzelsträngige DNA auf den Filtern zu fixieren, wurden diese in einem Vakuumofen bei 80°C ca. 30 Minuten inkubiert.

Die Filter wurden in Rollglasflaschen überführt und ca. 2 Stunden bei 68°C mit 3 x SSC/0,1 % SDS gewaschen, um Zelltrümmer zu entfernen. Im Anschluß an die Hybridisierung (2.2.16.2) mit Digoxigenin-markierten Sonden (2.2.15) und dem Nachweis der markierten DNA (2.2.18) wurden die Signale auf den Filtern mit dem Koloniemuster der Platten verglichen. Mutmaßlich positive Bakterienkolonien wurden auf Ampicillin-haltigen CG-Platten ausgestrichen und zur Kontrolle erneut einer Kolonie-Hybridisierung unterzogen.

2.2.16.2 Hybridisierung von Membranen

Membranen bzw. Membranfilter wurden in Rollglasflaschen 1 bis 2 Stunden bei 65°C mit der Hybridisierungslösung HYB-9 (Gentra Systems) prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membranen zu blockieren.

Durch thermische Denaturierung in einem kochenden Wasserbad (15 bis 20 Minuten) und anschließendes Abkühlen auf Eis (5 Minuten) wurden die Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (2.2.15) in Einzelstränge zerlegt und anschließend zu 4 bis 6 ml Hybridisierungslösung (ca. 25 ng/ml) gegeben. Die Membranen bzw. Membranfilter wurden mit dieser Lösung 16 bis 18 Stunden bei 65 °C hybridisiert.

Die Hybridisierungslösung mit der Sonde konnte mehrmals verwendet werden und wurde bei -20 °C gelagert. Um nicht hybridisierte Sonde zu entfernen bzw. fehlerhafte Basenpaarungen zwischen Sonde und fixierter DNA aufzuheben, wurden die Membranen zunächst mehrmals mit 2xSSC/0,5 % SDS bei RT gespült und anschließend im Hybridisierungsofen wie folgt gewaschen:

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

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

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

30 Minuten mit 0,2 x SSC/0,5 % SDS bei 65 °C

Die Digoxigenin-markierte DNA wurde durch einen immunologischen Nachweis sichtbar gemacht (2.2.18).

2.2.17 Transfer von DNA auf eine Membran (Southern-Blot)

Die ursprünglich von Southern (1975) entwickelte Technik dient der weiteren Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA hinsichtlich spezifischer Sequenzen. Der nachfolgend beschriebene Kapillar-Blot wurde im Wesentlichen nach einem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Die mit Restriktionsendonukleasen behandelte (2.2.10.1) DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) aufgetrennt und das Gel unter UV-Licht mit einer Sofortbildkamera dokumentiert. Um die Transfereffizienz insbesondere großer DNA-Fragmente (>10 kb) zu erhöhen, wurde die DNA durch Schwenken des Gels in 0,2 N Salzsäure partiell depuriniert. Das Gel wurde zweimal für ca. 30 Sekunden in A. dest. gespült, anschließend 40 bis 60 Minuten mit Denaturierungslösung (2.2.16) behandelt, um Einzelstrang-DNA zu erhalten, und nachfolgend 2 x 20 Minuten in Neutralisierungslösung (2.2.16) geschwenkt. Für den Transfer wurde das Gel in Transfer-Puffer (20 x SSC) äquilibriert und mit der Oberseite auf einen Träger gelegt. Der Träger wurde zuvor mit 3 MM Whatman-Papier belegt, das in 20 x SSC getränkt worden war und mit beiden Seiten in ein Behältnis mit dem Transfer-Puffer reichte. Auf das Gel wurde eine positiv geladene Nylon-Membran (in A. dest. und Transferpuffer äquilibriert), 2 Lagen 3 MM Whatman-Papier (äquilibriert in 20 x SSC) und mehrere Lagen Zellstoffpapier geschichtet und der Aufbau mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Die DNA wurde durch Kapillarkräfte mit dem Puffer auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte mindestens vier Stunden. Nachfolgend wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV Stratalinker™ 1800, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden und wie unter 2.2.16.2 beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert.

Für einen Southern-Blot unter alkalischen Bedingungen, der unter anderem auch für den Transfer der durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (2.2.14) aufgetrennten *Leishmania*-Chromosomen durchgeführt wurde, erfolgte die Vorbehandlung des Gels in einer Lösung aus 0,2 M Natriumhydroxid und 1,5 M Natriumchlorid, die auch als Transfer-Puffer diente. Eine Behandlung des Gels mit Neutralisierungslösung entfiel.

2.2.18 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierter DNA

<u>Blockierungslösung:</u>	1 x PBS
	0,2 % I-Block™
	0,02 % Tween 20
	0,02 % Natriumazid
<u>CSPD-Puffer (pH 10,0):</u>	0,1 M Diethanolamin
	1,0 M Magnesiumchlorid
	0,02 % Natriumazid
<u>AP-Puffer:</u>	100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
	100 mM Natriumchlorid
	50 mM Magnesiumchlorid

<u>Färbelösung:</u>	10 ml AP-Puffer
	3,3 mg NBT (in 70 % Dimethylformamid gelöst)
	2,5 mg X-Phosphat (in Dimethylformamid gelöst)

Digoxigenin-markierte DNA wurde mit einem anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat kolorimetrisch oder durch Chemilumineszenz nachgewiesen.

Die Membranen wurden 5 Minuten in 1 x PBS äquilibriert und eine Stunde in Blockierungslösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen mit dem anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, das 1:5000 in der Blockierungslösung verdünnt worden war, mindestens eine Stunde unter Schwenken inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurden die Membranen nachfolgend mehrmals mit 1 x PBS gespült.

Für einen kolorimetrischen Nachweis wurden die Membranen 15 Minuten in AP-Puffer äquilibriert und nachfolgend im Dunkeln mit der Färbelösung inkubiert, bis das Farbpräzipitat deutlich zu erkennen war. Nach Beendigung der Farbreaktion durch Zugabe eines EDTA-haltigen Puffers (TAE) wurden die Filter getrocknet.

Für einen Chemilumineszenz-Nachweis wurden die Membranen 15 Minuten in CSPD-Puffer äquilibriert und die Membran-Oberfläche mit der fixierten DNA anschließend mit jeweils 1 ml Substratlösung (0,25 mM in CSPD-Puffer) benetzt. Überschüssige Lösung wurde mit 3 MM Whatmanpapier entfernt, die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Filmkassette geklebt. Es wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und bei RT exponiert bis deutliche Signale zu erkennen waren.

2.2.19 Transposon-Mutagenese

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Transposition und Integration in fremde DNA können Transposons für eine zufällige Mutagenese, sowie für die Kartierung und Sequenzierung von DNA genutzt werden.

Für die Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8 wurde das GPSTM-1 Genome Priming System (New England Biolabs) verwendet, das auf dem bakteriellen Transposon Tn7 basiert. Das Donor-Plasmid mit dem mobilen Element (1375 bp), das u. a. ein Chloramphenicol-Resistenzgen und Bindungsstellen für Sequenzier-Oligonukleotide (Primer N und S) besitzt, wird dabei mit der Ziel-DNA und einem Enzym-Mix, bestehend aus TnsA, TnsB und TnsC* inkubiert. Essentielle Co-Faktoren sind ATP und Magnesium-Ionen. Während TnsB spezifisch die Enden des Transposons Tn 7 erkennt, bindet TnsC an die Ziel-DNA und interagiert mit TnsB. TnsA bindet an die DNA:TnsB-Komplexe. TnsA und B bilden zusammen die Transposase und sind für den Transfer des Transposons in die Ziel-DNA verantwortlich. Die Transposition erfordert keine Replikation, sondern erfolgt nach einem *cut and paste*-Mechanismus und geht mit einer 5 bp-Duplikation der Ziel-DNA-Sequenz am Integrationsort einher (Craig, 1996). Durch eine Mutation in TnsC (TnsC*) kann die Transposition unabhängig von TnsD oder TnsE erfolgen und ist somit unabhängig von der Sequenz der Ziel-DNA (Stellwagen *et al*, 1997a). Die Transposition in ein DNA-Molekül, das bereits ein Transposon besitzt, wird unterdrückt. Man vermutet, dass TnsB die Dissoziation von TnsC von einem Ziel-DNA-Molekül, das Tn7-Enden aufweist, durch einen ATP-abhängigen Mechanismus unterstützt (Stellwagen *et al*, 1997b).

In einem Reaktionsansatz (20 µl Gesamtvolumen) wurden zunächst 0,1 µg Cosmid pcos8, 0,02 µg des Transposon-Donorplasmids pGPS2 mit 2µl 10 x GPS-Puffer [250mM Tris-HCl (p8,0), 20 mM DTT, 20 mM ATP, 500µg/ml BSA] und A. dest. ad 18 µl gemischt. Die Zugabe der TnsABC* Transposase (1 µl = 7 ng TnsA, 10 ng TnsB, 20 ng TnsC*) initiierte während einer zehnmütigen Inkubation bei 37°C die Bildung des DNA-Protein-Komplexes. Durch Zugabe von 15 mM Magnesiumacetat wurde die Transposition gestartet. Nach einer Stunde bei 37°C wurde die Reaktion durch Hitze-Inaktivierung (10 Minuten bei 75°C) der Enzyme beendet. Ein Aliquot des Ansatzes wurde anschließend zur Transformation von *E. coli* XL1 Blue durch Elektroporation (2.2.8) eingesetzt.

Als Positiv-Kontrolle wurde das mitgelieferte Plasmid LITMUS28 in eine Reaktion eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen dienten Ansätze ohne TnsABC*. Die Ergebnisse entsprachen den Angaben des Herstellers.

Aus einzelnen Transformanden wurden die pcos8/Tn7-Cosmide durch Mini-Präparation (2.2.9.1) isoliert und nachfolgend unter Verwendung der Primer N und S (2.1.7.1) sequenziert (2.2.21).

Die Bakterienkolonien von ca. 5000 Transformanden wurden vereinigt. Aus dem Gemisch wurden die pcos8/Tn7-Derivate durch eine Maxi-Präparation (2.2.9.2) isoliert, und die über Anionenaustauschersäulen (QUIAGEN-tip 500) aufgereinigte DNA wurde für die Transfektion von *L. major* (2.2.2) eingesetzt (Ansätze A,B,C,D).

2.2.20 Nested Deletion

Eine Strategie zur Sequenzierung größerer DNA-Fragmente (ca. 3000 bp) ist die Erzeugung unidirektionaler *nested deletions*, die 1984 von Steven Henikoff entwickelt wurde. Man macht sich dabei zunutze, dass das Enzym Exonuklease III nur DNA mit stumpfen und 5'-überhängenden Enden verdaut. Das Plasmid mit der zu sequenzierenden DNA wird daher zum Schutz der Vektor-Sequenzen mit einer Restriktionsendonuklease verdaut, die einen 3'-Überhang erzeugt und nachfolgend mit einer Restriktionsendonuklease behandelt, die einen 5'-Überhang erzeugt und deren Erkennungssequenz näher in Richtung Insert liegt. Die Exonuklease III greift das 5'-überhängende Ende eines Doppelstranges an und entfernt sukzessive den 3'-zurückgesetzten DNA-Strang. Das Ausmaß der Deletion wird durch die Dauer des Verdau kontrolliert. Die dem Reaktionsansatz in regelmäßigen Zeitintervallen entnommenen Proben werden dann zur Entfernung der 5'-Überhänge mit S1-Nuklease behandelt und anschließend zur Rezirkularisierung der DNA in eine Ligationsreaktion eingesetzt. Durch die Sequenzierung geeigneter Subklone, für die nur ein Sequenzier-Oligonukleotid erforderlich ist, kann letztendlich die gesamte Sequenz des Inserts in geordneter Weise erfaßt werden.

Von den Plasmiden pBS/D1G1, pBS/D1K4, pBS/A5G8, pBS/A5K2 wurden partiell deletierte Subklone hergestellt. Es wurde der *Double-stranded* Nested Deletion Kit (Pharmacia) verwendet.

In einem Reaktionsansatz wurden 40 µl zweifach konzentrierter Exonuklease III-Puffer mit dem gleichen Volumen (entsprechend ca. 4 µg DNA) des durch den Verdau mit den passenden Restriktionsenzymen vorbereiteten Plasmids gemischt, wobei die Endkonzentration von Natriumchlorid auf 75 mM eingestellt wurde. Unter diesen Bedingungen besitzt das Enzym zwar nicht die volle Aktivität, jedoch entwickelt sich die Aktivität des Enzyms über einen

längeren Zeitraum und der Abbau der DNA verläuft gleichmäßiger und kann besser kontrolliert werden. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert. Nach drei Minuten wurden dem Ansatz 2 µl entnommen (0-Probe) und der Verdau durch Zugabe von 2 µl (180 bis 260 U) Exonuklease III gestartet. In Zeitabständen von 2 Minuten bzw. 3 Minuten (ab 20 Minuten) wurden dem Ansatz über einen Zeitraum von ca. einer Stunde 2 µl-Aliquots entnommen und auf Eis mit 3 µl S1-Nuklease-Mix (1,66 x S1-Puffer und 1,2 bis 1,8 U S1-Nuklease) gemischt. Nachdem alle Proben entnommen worden waren erfolgte der Verdau mit der S1-Nuklease für 30 Minuten bei RT. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben mit 1 µl einer Lösung aus 303 mM Tris und 50 mM EDTA versetzt und anschließend 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden geteilt und jeweils 3 µl mit T4-DNA-Ligase rezirkularisiert, bzw. zur Analyse der Deletions-Reaktion in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.12). Die religierten Plasmide geeigneter Proben wurden nachfolgend in *E. coli* DH5α transformiert (2.2.8). Aus den Transformanden wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.2.9.1) und einer Restriktionsanalyse (2.2.10.1) unterzogen, um passende Subklone zu identifizieren.

2.2.21 DNA-Sequenzierung

Denaturierendes Polyacrylamidgel: 6 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
1 x TBE
8,3 M Harnstoff
0,03 % APS
1/2500 Volumen TEMED

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch enzymatische Synthese nach dem von Sanger entwickelten Kettenabbruch-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977).

Bei dieser Methode wird ausgehend von einem Sequenzier-Oligonukleotid, der an eine bekannte Sequenz der zu sequenzierenden DNA hybridisiert, durch eine DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Neben den 2'-Desoxy-ribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) enthält der Reaktionsansatz 2', 3'-Dideoxy-ribonucleosidtriphosphate (ddNTPs), deren Einbau in die DNA aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe zu einem Abbruch der Synthese des DNA-Strangs führt. Im Verlauf der Reaktion entstehen eine Serie von unterschiedlich langen DNA-Strängen, die alle mit einem bestimmten ddNTP enden.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Markierung der synthetisierten DNA-Fragmente erfolgte dabei durch die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten ddNTPs. Als Enzym wurde die AmpliTaq®-Polymerase FS (FS=Fluoreszenz-Sequenzierung) eingesetzt, die im Vergleich zum Wildtyp-Enzym aufgrund von zwei Mutationen im wesentlichen keine 5'-3' Nuklease-Aktivität besitzt und eine verbesserte Akzeptanz gegenüber ddNTPs aufweist. Im Terminator Ready Reaction Mix sind neben den genannten Komponenten die erforderlichen dNTPs, Magnesiumchlorid und Tris-HCl (pH 9,0) enthalten, sowie eine thermostabile Pyrophosphatase, die das bei der DNA-Synthese entstehende Pyrophosphat abbaut, so dass eine Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Rückreaktion, unterdrückt wird.

Ein Reaktionsansatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA oder 1,5 µg Cosmid-DNA, 10 pmol eines Sequenzier-Oligonukleotids (2.1.7.1), 4 µl Terminator Ready Reaction Mix und HPLC-H₂O ad 20 µl. Ansätze mit Cosmid-DNA enthielten außerdem 5 % DMSO.

Die Cycle Sequencing-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Personalcycler, Biometra) durchgeführt. Die lineare Amplifikation eines DNA-Stranges erfolgte in 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Denaturierung: 10 Sekunden, 96°C; Annealing: 5 Sekunden, 50°C; Elongation: 4 Minuten, 60°C.

Zur Aufreinigung wurde die DNA nach Zugabe von 80 µl HPLC-H₂O mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,75) und 250 µl Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation der Ansätze (15 Minuten, 12000 x g, RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend vollständig getrocknet und bis zur Gelelektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

Die Analyse der Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit einem Online-DNA-Sequenzierungsgerät (ABI PRISM™ 377 DNA-Sequencer, Applied Biosystems). Die dafür erforderlichen Schritte wurden freundlicherweise von H. Buß und S. Ofori durchgeführt. Die Proben wurden mit 4 µl Ladepuffer [80 % deionisiertes Formamid, 50 mM EDTA (pH 8,0)] versetzt und zur Denaturierung der DNA zwei Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. 1,5 µl der Ansätze wurden in einem denaturierenden 6 %igen Polyacrylamid-Gel mit 1 x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Die mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxy-DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden dabei durch ein Lasernachweissystem erfaßt und durch eine Computer-gestützte Analyse (Sequencing Analysis, Version 3.0. Applied Biosystems) konnten die Signale den entsprechenden Nukleotiden zugeordnet werden.

2.2.22 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>SDS-Probenpuffer:</u>	50 mM Tris-HCl (pH 6,8)
(nach Laemmli ,1970)	50 mM DTT
	2 % SDS
	0,01 % Bromphenolblau
	10 % Glycerin
<u>Trenngel (7,5 % ig):</u>	375 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	0,1 % SDS
	7,5 % Acrylamid/N,N´-Methylenbisacrylamid (37,5:1)
	0,1 % APS
	0,0006 Volumen TEMED
<u>Sammelgel (5 % ig):</u>	12,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	0,1 % SDS
	5 % Acrylamid/N,N´-Methylenbisacrylamid (37,5:1)
	0,1 % APS
	0,001 Volumen TEMED

<u>Elektrodenpuffer:</u>	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Solubilisierung von Proteinen erfolgt in SDS-Probenpuffer. Das darin enthaltene DTT reduziert Disulfidbrücken. SDS denaturiert Proteine und komplexiert sie. Infolge der Anlagerung von SDS-Molekülen, die annähernd proportional zur Molekülgröße der Proteine erfolgt, liegen diese als Polyanionen vor, deren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hauptsächlich durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird.

In eine aus 2 Glasplatten und einem Abstandhalter bestehenden mit Ethanol gereinigten Gelkassette wurde ein 7,5 %iges Trenngel gegossen, über das nach erfolgter Polymerisation ein 5 % iges Sammelgel geschichtet, und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt wurde. Das Sammelgel dient zu Beginn der Elektrophorese der Fokussierung der Proteine, wodurch eine schärfere Trennung erzielt wird. Nach dem Einbau der Gelkassette in eine Vertikal-Apparatur (Novex, Phase) wurden die Pufferkammern mit Elektrophorese-Puffer gefüllt, der Probenkamm entfernt und die Taschen zur Entfernung von Acrylamid-Resten gespült.

Bakterien- oder *Leishmania*-Sedimente wurden zweimal in PBS gewaschen, in SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C lysiert. Protein-Lösungen wurden mit einem gleichen Volumen zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt und in gleicher Weise behandelt. Die Proben wurden nach Zentrifugation (5 Minuten, 12000 x g, RT) bei einer Spannung von 15 V/cm aufgetrennt. Als Marker wurde eine 10 kD Protein-Leiter eingesetzt, die 13 Proteine mit Molekulargewichten zwischen 10 kD und 200 kD enthält. Anschließend wurde eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (2.2.23.1) bzw. eine Silberfärbung (2.2.23.2) durchgeführt, oder die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran transferiert (2.2.27)

2.2.23 Anfärbung der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.2.23.1 Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	1 g Coomassie Brilliant Blau R 250
	40 % Methanol
	10 % Essigsäure
<u>Coomassie-Entfärber:</u>	30 % Methanol
	12 % Essigsäure

Die Färbung und Fixierung der Proteine im Polyacrylamid-Gel erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur durch Schwenken in der Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurde das Gel mehrere Stunden entfärbt bis die Protein-Banden deutlich zu sehen waren. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals erneuert. Das Gel wurde in A. dest. gespült und anschließend zum Trocknen in einen Rahmen zwischen Zellophan-Folie gespannt.

2.2.23.2 Silberfärbung

<u>Silbernitratlösung:</u>	0,2 % Silbernitrat
	0,028 % Formaldehyd
<u>Entwicklerlösung:</u>	6 % Natriumcarbonat
	0,04 % Natriumthiosulfat
	0,019 % Formaldehyd

Mit einer Silberfärbung können auch geringe Proteinmengen nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10 ng und ist damit in etwa zehnmal niedriger, als bei einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung.

Die für die Färbung des Gels erforderlichen Schritte wurden bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zur Fixierung der im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine, wurde das Gel zunächst mindestens eine Stunde in einer Lösung aus 30 % Methanol und 10 % Essigsäure inkubiert. Das Gel wurde anschließend durch Behandlung mit 50 %igem Ethanol (3 x 20 Minuten) entwässert und nachfolgend zur Vorbehandlung genau eine Minute in einer 0,012 %igen Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Durch drei Waschschrte in A. dest (jeweils 20 Sekunden) wurde das Gel rehydriert und darauf mit einer Silbernitratlösung behandelt (20 Minuten). Das Gel wurde zweimal für jeweils 20 Sekunden in A. dest gespült und zur Anfärbung der Proteinbanden durch Reduktion der Silber-Ionen zu metallischem Silber in einer Entwicklerlösung inkubiert. Nach einer Minute wurde die Lösung erneuert. Die Reaktion wurde nach dem Erreichen der gewünschten Intensität der Banden durch Behandlung des Gels in der Fixier-Lösung oder in 50 mM EDTA beendet. Das Gel wurde in A.dest. gespült und anschließend zwischen Zellophan getrocknet.

2.2.24 Überexpression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Aus der Subklonierung der offenen Leserahmen aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12 in den Expressionsvektor pJC45 (2.1.8) gingen die Konstrukte pJC45/ASC I, pJC45/Helicase, pJC45/Adaptin, pJC45/DSP, pJC45/PDE, pJC45/Mucin und pJC45/ORF3 (2.1.8) hervor. Die rekombinante Überexpression der in pJC45 unter der Kontrolle des T7/lac-Promotors stehenden Sequenzen erfolgte in *Escherichia coli*-BL21(DE3) [pAP/lac^q], in dessen Chromosom das Genom des Bakteriophagen DE3 integriert ist. Das *int*-Gen des Bakteriophagen DE3, das für ein Rekombinationsenzym codiert, ist aufgrund eines inserierten Fragments inaktiviert, so dass Exzision und Integration des Virusgenoms ohne einen Helfer-Phagen nicht möglich ist. Dieses Fragment enthält die für den *lac*-Repressor (*lac* I) codierenden Sequenzen, den Anfang des *lacZ*-Gens und das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors (Studier und Moffat, 1986; Studier, *et al*, 1990). Der Bakterienstamm besitzt außerdem mehrere Kopien eines Plasmids, das neben einem Kanamycin-Resistenzgen ein zusätzliches *lac* I-Gen enthält. Dadurch wird sichergestellt, dass der *lac*-Repressor, der die *lac*-Promotoren negativ reguliert, in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden ist, um im uninduzierten Zustand die Transkription der T7-RNA-Polymerase und der vom T7-Promotor kontrollierten Gene effektiv zu unterdrücken. Zur Induktion der Expression werden die Kulturen mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) versetzt. IPTG ist ein synthetisches Substratanalogon der β -Galactosidase, das nicht metabolisiert wird. IPTG bindet an den *lac*-Repressor, der nachfolgend aufgrund einer Konformationsänderung die

Fähigkeit verliert, an das *lac*-Operon zu binden. Die Aktivierung der Transkription vom *lacUV5*-Promotor führt zur Expression der T7-RNA-Polymerase, die nachfolgend die Transkription der vom T7-Promotor kontrollierten Gene bewirkt.

Kompetente BL21(DE3) [pAP/*lacI*^q]-Zellen wurden mit den Plasmiden bzw. mit dem Vektor pJC45 als Kontrolle transformiert (2.1.8). Für einen präparativen Ansatz wurden jeweils mindestens 400 ml CG-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin enthielt, mit einer Kolonie angeimpft. Für eine Expression im analytischen Maßstab wurde eine 10ml-Kultur vorbereitet. Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt bis sie eine OD_{600nm} von ca. 0,06 bis 0,3 erreicht hatten. Je 1 ml der Bakteriensuspension wurde entnommen und auf Eis gestellt. Die Kulturen wurden zur Induktion der Expression mit 0,4 mM IPTG versetzt und weitere 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Es wurde nochmals die OD_{600nm} bestimmt und eine 1 ml-Probe entnommen. Die Proben wurden zur Analyse in einem SDS-Polyacrylamid-Gel wie unter 2.2.22 beschrieben vorbereitet und bis zur Elektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

2.2.24.1 Isolierung der rekombinanten Proteine nach Überexpression

Homogenisierungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,9)
500 mM Natriumchlorid
5 mM Imidazol

Die Bakterien wurden sedimentiert (10 Minuten, Beckman JA-10-Rotor, 5000 upm, 4°C), zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 20 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte durch Ultraschall-Behandlung auf Eis (Branson Sonifier 250: 45 % *output*, 6 bis 8 x 20 Sekunden mit jeweils 60 Sekunden Pause zwischen den Schritten). Nach Zentrifugation (30 Minuten, Beckman JA-12-Rotor, 10000 upm, 4°C) der Proben wurden die Zelltrümmer, einschließlich der Zelleinschlußkörper von den löslichen Bestandteilen im Überstand getrennt. Das Sediment wurde anschließend in 10 ml Homogenisierungspuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und zur Extraktion der unlöslichen Proteine aus den Zelleinschlußkörpern entweder eine Stunde auf Eis oder unter ständigem Rühren 16 bis 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Die extrahierten Proteine wurden nachfolgend durch Zentrifugation (30 Minuten, Beckman JA-12-Rotor, 10000 upm, 4°C) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Die im Verlauf des Aufschlusses von den Überständen nach Zentrifugation und den Sedimenten nach Resuspension entnommenen Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert (2.2.22).

Der nach Behandlung der Zelleinschlußkörper mit 8 M Harnstoff erhaltene Extrakt, der den überwiegenden Anteil der rekombinanten Proteine enthielt, wurde durch Metall-Chelat-Chromatographie aufgereinigt.

2.2.25 Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Metall-Chelat-Chromatographie

Dentaturierender Homogenisierungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,9)
500 mM Natriumchlorid
5 mM Imidazol
8 M Harnstoff

Die in *E. coli* exprimierten Genprodukte der in den Expressionsvektor pJC45 subklonierten offenen Leserahmen erhalten am aminoterminalen Ende zusätzlich ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Oligopeptid mit 10 Histidin-Resten, die eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine durch Metall-Chelat-Chromatographie ermöglichen. Man macht sich dabei zunutze, dass die Imidazol-Gruppen der Histidine mit zweiwertigen Metall-Ionen, wie z. B. Nickel, komplexieren können. Die rekombinanten Proteine werden über ihren Histidin-tag an ein Säulenmaterial mit immobilisierten Nickel-Ionen gebunden und können nach den erforderlichen Waschschritten durch Konkurrenz mit Imidazol-haltigen Lösungen eluiert werden.

Es wurde eine Säule mit 1,25 ml einer Matrix (HisBind Resin, Novagen) nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Nach der Aktivierung des Säulenmaterials mit 50 mM Nickelsulfat, wurde die Säule mit drei Volumen denaturierendem Homogenisierungspuffer äquilibriert und anschließend der aufzureinigende Extrakt aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde durch drei Waschschrritte mit jeweils 10 ml denaturierendem Homogenisierungspuffer mit zunehmender Imidazolkonzentration (5 mM, 20 mM, 60 mM) entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 4 ml denaturierendem Homogenisierungspuffer, bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt.

Aliquots der gesammelten Säulendurchflußfraktionen wurden durch SDS-PAGE (2.2.22) analysiert

2.2.26 Immunisierung und Antikörpergewinnung

Phosphat-Puffer: 10 mM Kaliumphosphat (pH 7,2)
100 mM Natriumchlorid

Durch die Immunisierung von Legehennen lassen sich große Antikörpermengen (IgY) gewinnen, die relativ einfach aus dem Eigelb isoliert werden können.

Legereife Hühner wurden mit den durch Metall-Chelat-Chromatographie (2.2.24.2) aufgereinigten, rekombinanten Proteinen rAdaptin, rORF3, rHelicase oder rDSP immunisiert. Aus jeweils 200 bis 400 µg Antigen und einem gleichen Volumen Freund'schem Adjuvant (vollständig) wurde eine Emulsion hergestellt und subkutan injiziert. Die Immunisierung wurde nach 2 und 4 Wochen wiederholt, wobei jedoch unvollständiges Adjuvant verwendet wurde. Aus den etwa ab der zweiten Woche nach der Sekundär-Immunisierung gelegten Eiern wurden die Antikörper isoliert. Für die Herstellung einer Prä-Immunitäts-Antikörperlösung wurden Eier verwendet, die vor der Immunisierung gelegt worden waren.

Die Extraktion der Antikörper aus dem Eigelb erfolgte durch fraktionierende Polyethylenglycol-Fällung (Polson *et al.*, 1980; Polson *et al.*, 1985). Zunächst wurde das Eigelb vom Eiweiß getrennt und mehrmals mit A. dest gewaschen, um das Eiweiß so gut wie möglich zu entfernen. Das Eigelb (ohne Dottersack) wurde mit einem Volumen Phosphat-Puffer gemischt. Anschließend wurde ein Volumen Phosphat-Puffer mit 7 % Polyethylenglycol (PEG) 6000 (Endkonzentration 3,5 %) hinzugefügt und 30 Minuten bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Dabei wurden Lipidverbindungen des Eigelbs gefällt und nachfolgend durch Zentrifugation (10 Minuten, Beckman JA-12-Rotor, 10000 upm, 4°C) und Filtration von den im klaren Überstand gelösten Antikörpern getrennt. Das Filtrat wurde zur Fällung der Antikörper mit 12 % PEG versetzt, die anschließend durch Zentrifugation sedimentiert wurden. Das Sediment wurde in 10 ml Phosphat-Puffer je Eigelb gelöst und die Antikörper nochmals durch

die Zugabe von einem Volumen Phosphat-Puffer mit 24 % PEG (Endkonzentration 12 %) gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat in 5 ml Phosphat-Puffer je Eigelb gelöst und nochmals zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der als Antikörper-Lösung verwendete klare Überstand wurde mit 0,02 % Natriumazid versetzt und bei 4°C aufbewahrt bzw. bei -70°C gelagert.

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

<u>Transfer-Puffer:</u>	48 mM Tris
	39 mM Glycin
	20 % Methanol
	0,037 % SDS

Im Rahmen einer Western-Blot-Analyse werden die in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979) und können mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Der Transfer wurde nach der Semi-Dry-Methode (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Auf die Kathodenseite der Semi-Dry-Apparatur wurden 2 bis 3 Lagen in Transfer-Puffer getränktes 3 MM Whatman Papier, das Gel, eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, die zuvor in Methanol angefeuchtet, in A. dest. geschwenkt (2 Minuten) und in Transfer-Puffer äquilibriert wurde, und 2 bis 3 weitere Lagen 3 MM Whatman Papier luftblasenfrei übereinander geschichtet. Der Deckel (Anodenseite) wurde aufgelegt, mit einem Gewicht beschwert und die Proteine bei 1 mA/cm² ca. eine Stunde transferiert. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine einem immunologischen Nachweis unterzogen, nachdem zuvor von der Membran die Bahn mit den Markerproteinen abgetrennt, in Coomassie-Färbelösung einige Sekunden geschwenkt und entfärbt wurde, bis die Banden deutlich zu sehen waren.

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

<u>Blockierungslösung:</u>	5 % Milchpulver
	0,1 % Tween 200
	02 % Natriumazid
	1 x TBS
<u>10 x TBS:</u>	1500 mM NaCl
	100 mM Tris

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte nach der indirekten Methode. Ein gegen die nachzuweisenden Proteine gerichteter Antikörper wurde dabei durch einen mit der Alkalischen Phosphatase konjugierten Sekundär-Antikörper mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

Die PVDF-Membran wurde in Methanol benetzt, kurz in A. dest. gespült und zur Blockierung freier Bindungsstellen eine Stunde in Blockierungslösung geschwenkt. Die Membran wurde anschließend eine Stunde mit dem spezifischen Antikörper, der 1:2000 in Blockierungslösung

verdünnt worden war, inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran mindestens dreimal mit 1 x TBS/0,02 % Tween 20 gespült und nachfolgend eine Stunde mit dem zweiten Antikörper (Anti-IgY-AP, 1:2500 in Blockierungslösung) behandelt. Die Membran wurde wieder mehrmals in 1 x TBS/0,02 % Tween 20 gewaschen und ca. 10 Minuten in AP-Puffer (2.2.18) äquilibriert. Für den Nachweis der Proteinbanden wurde die Membran im Dunkeln mit der Färbelösung (2.2.18), die das Substrat für die Alkalische Phosphatase (X-Phosphat) und NBT als Farbverstärker enthält, inkubiert, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Die Farbreaktion wurde mit einem EDTA-haltigen Puffer (TAE-Puffer) gestoppt und die Membran getrocknet.

2.2.28 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der RNA-Helicase erfolgte durch Elektronenmikroskopie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers (2.2.26).

Die Vorbereitung der Leishmanien für die Elektronenmikroskopie, die Anfertigung der Schnitte und die Immun-Elektronenmikroskopie wurden freundlicherweise von M. Krömer durchgeführt.

Ca. 1×10^8 Leishmanien wurden sedimentiert (10 Minuten, 690 x g, RT), zweimal in PBS gewaschen und eine Stunde in einer 2 %igen Paraformaldehyd-Lösung mit 0,025 % Glutaraldehyd bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend in A. dest. gewaschen und für jeweils eine Stunde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %) dehydriert. Nachfolgend wurde die Konzentration des Ethanols über einen Zeitraum von ca. 4 Tagen stufenweise in insgesamt 8 Schritten durch die Zugabe von L. R. White gesenkt bis die Zellen in 100 % L. R. White vorlagen. Die Zellen wurden für jeweils 8 bis 12 Stunden bei 4°C in den verschiedenen Mischungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in Gelantine-Kapseln überführt und mit L. R. White, das zur Härtung mit L. R. White-Accelerator (2-3 µl/ml) versetzt worden war, überschichtet. Die Polymerisierung erfolgte bei 4°C. Nach ca. 24 Stunden wurden von den Blöcken Schnitte (80 nm) an einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut-E) mit einem Diamantmesser angefertigt. Die Schnitte wurden auf Nickel-Gitter (Maschenweite: 300) platziert und über Nacht getrocknet.

Für die Immun-Elektronenmikroskopie wurden die erforderlichen Lösungen filtriert (Filter: 0,2 µm). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Lösung aus 3 % BSA und 0,1 % Tween 20 in PBS behandelt. Die Gitter mit den Schnitten wurden dabei auf einen Tropfen der Lösung gelegt. Die weiteren Schritte wurden in gleicher Weise durchgeführt. Nach der Blockierung wurden die Schnitte mit dem anti-Helicase-Antikörper bzw. mit dem entsprechenden Prä-immun-Antikörper (1:1000 in Blockierungslösung) 16 bis 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und nachfolgend mit einem aus Kaninchen gewonnenen anti-Huhn-IgG (1:1500 in Blockierungslösung) eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten wieder drei Waschschrte und nachfolgend eine Behandlung mit 10 nm Protein A-Goldpartikeln (1:65 in Blockierungslösung) für eine Stunde bei RT. Nach jeweils drei Waschschrten mit PBS/0,1% Tween und A. dest. wurden die Schnitte zur Kontrastierung 5 Minuten mit in A. dest. gesättigtem Uranylacetat behandelt, dreimal mit A. dest. gewaschen und anschließend getrocknet.

Die Präparate wurden mit einem Philips TEM 301-Gerät mikroskopiert.

2.2.29 Elektronische Bildbearbeitung

Chemoluminogramme, Photographien, Blots und getrocknete Gele wurden mit einem Flachbettscanner (Agfa Snapscan 600, Agfa-Gevaert) und Diapositive mit einem Nikon Coolscan 35 mm-Film-Scanner digitalisiert und unter Verwendung der Adobe Photoshop 5.0-Software bearbeitet. Die Halbton-Bilder wurden mit Strichzeichnungen und Texten zusammengefügt, die mit dem Programm Claris Draw 1,0 d angefertigt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von Cosmiden mit Temperatur-Toleranz-vermittelnden *L. donovani*-Genen aus rekombinanten *L. major*-Promastigoten

Leishmania donovani, der Erreger der viszeralen Leishmaniose ist in den inneren Organen des Säugetierwirts höheren Temperaturen ausgesetzt als *L. major*, der Erreger der kutanen Leishmaniose. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass sowohl amastigote als auch promastigote Stadien viszeralisierender *Leishmania*-Arten eine höhere Temperatur-Toleranz aufweisen, als *Leishmania*-Spezies, die eine kutane Leishmaniose verursachen. Es wird daher vermutet, dass Temperatur-Toleranz ein Faktor ist, der für den Tropismus der Parasiten im Säugetierwirt mitbestimmend ist (Berman und Neva, 1981; Callahan *et al.*, 1996).

Bislang ist nicht bekannt welche Faktoren *L. donovani* befähigen, bei Temperaturen von 37°C nicht nur zu überleben, sondern auch zu proliferieren, während *L. major* nur Temperaturen bis 35°C toleriert.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Temperatur-Toleranz und Tropismus untersuchen zu können, sollten zunächst Gene isoliert und identifiziert werden, die für die höhere Temperatur-Toleranz von *L. donovani* verantwortlich sind. Die Strategie, die dabei zur Anwendung kam, basiert auf funktioneller Komplementation.

Funktionelle Komplementation im klassischen Sinne liegt vor, wenn ein genetischer Defekt in einem Gen durch die Anwesenheit eines gleichartigen, intakten Gens aufgehoben wird, das die Funktion des defekten Gens übernimmt (Ibelgaufts, 1993). Es ist möglich, durch Mutagenese Temperatur-sensitive *L. donovani*-Mutanten herzustellen und durch Transfektion der Mutanten mit einer Genbank aus dem Wildtyp-Genom nach Revertanten mit Wildtyp-Phänotyp zu suchen. In dieser Arbeit wurde jedoch die unterschiedliche Temperatur-Toleranz der nah verwandten *Leishmania*-Arten *L. major* und *L. donovani* ausgenutzt, so dass eine Mutagenese und die Selektion nach Mutanten nicht erforderlich war.

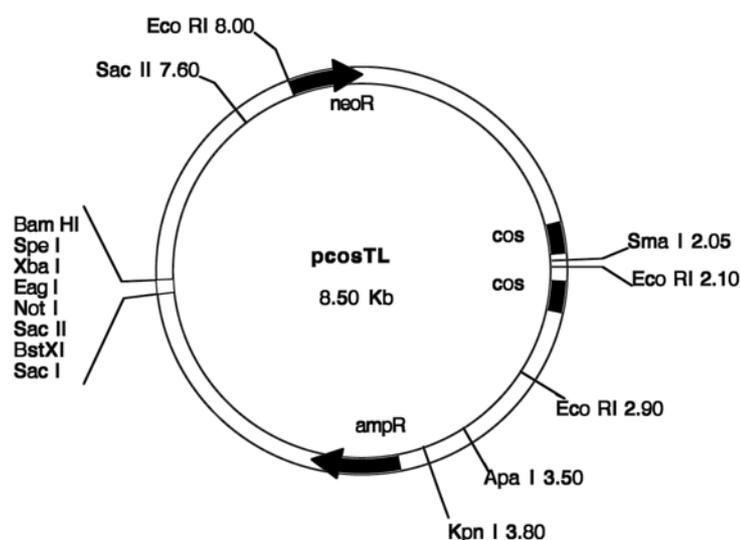


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Vektors pcosTL

Die Plasmidkarte zeigt den Cosmid-Vektor pcosTL, der für die Konstruktion der Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom verwendet wurde.

Entnommen aus Kelly *et al.* (1994)

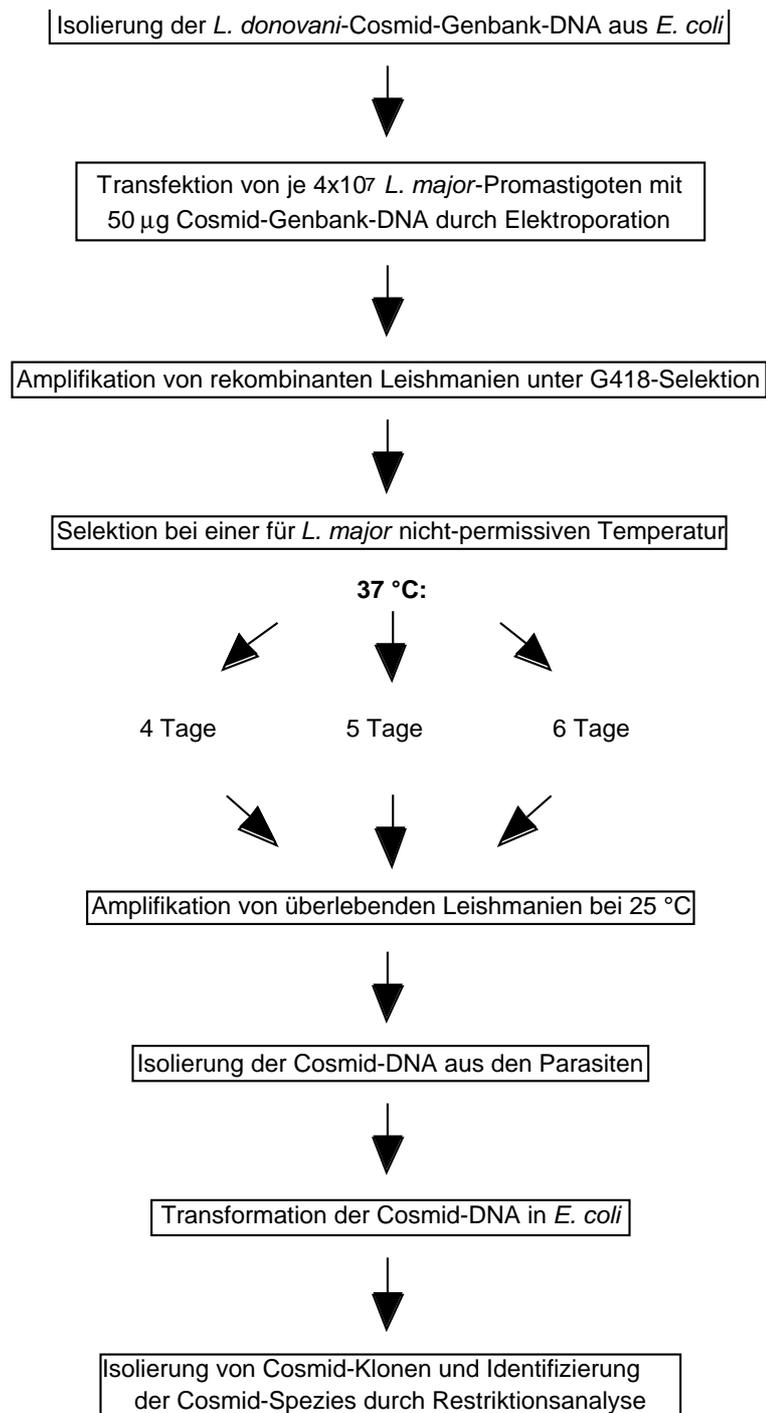


Abbildung 2: Primäre Temperatur-Selektion rekombinanter *L. major*-Promastigoter
Schematische Darstellung der Isolierung und Identifizierung von Cosmiden, die das Überleben von rekombinanten *L. major*-Promastigoten bei nicht-permissiven Temperaturen fördern.

3.1.1 Die verwendete *L. donovani*-Cosmid-Genbank

Die Identifizierung von Genen durch funktionelle Komplementation, setzt das Vorhandensein einer genomischen DNA-Bibliothek voraus. Während meiner Diplomarbeit habe ich eine Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom unter Verwendung des Cosmid-Vektors pcosTL (Kelly *et al.*, 1994) hergestellt (Diplomarbeit: Kapitel 3.1). Abbildung 1 zeigt eine Plasmid-Karte des Vektors. Für die Konstruktion der Cosmid-Genbank wurde der Vektor

zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Sma* I linearisiert und nachfolgend mit *Bam* HI verdaut, um die Vektorarme zu erhalten. Die mit *Sau* 3AI partiell verdaute genomische DNA wurde zur Herstellung der Cosmid-Genbank-DNA in die kompatible *Bam* HI-Schnittstelle der Vektorarme ligiert. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in die Phagenköpfe des Bakteriophagen Lambda verpackt, wobei der Vektoranteil zwischen den *cos*-Stellen verloren ging. Die Amplifikation der Cosmid-Genbank erfolgte durch Infektion der *E. coli*-Stämme DH5 α und XL1-Blue MRF⁻ mit den Phagenpartikeln. Die Cosmid-Genbank enthielt in der Weise, wie sie für die Amplifikation eingesetzt wurde, ca. 100000 potentielle cfu (ca. 50000 pro Bakterienstamm). Die durchschnittliche Cosmid-Insert-Größe (F) beträgt 38 kb. Nach der Poisson-Verteilung $N = \ln(1-P) / \ln[1-(F/G)]$ umfassen mit einer 99 %igen Wahrscheinlichkeit (P) 4360 unabhängige Klone (N) das $3,6 \times 10^7$ bp große *Leishmania*-Genom (G) (Wincker *et al.*, 1996). Somit enthält diese Cosmid-Genbank das 23-fache *Leishmania*-Genom. Die Komplexität und die ebenfalls überprüfte Repräsentativität der *L. donovani*-Cosmid-Genbank wurde für den geplanten *screen* als ausreichend erachtet.

3.1.2 Transfektion und primäre Temperatur-Selektion

In Abbildung 2 ist die Vorgehensweise der primären Selektion rekombinanter Parasiten mit erhöhter Temperatur-Toleranz schematisch dargestellt. Aus der in *E. coli* amplifizierten Genbank wurde die Cosmid-DNA isoliert und deren Qualität untersucht. Eine Behandlung der Cosmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Sac* II sollte nach Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel nur Vektor-spezifische Banden von ca. 7100 bp (*Sac* II), bzw. 3300 bp (*Eco* RI) als definitive Banden erkennen lassen, während die nicht voneinander zu trennenden Banden von den heterogenen genomischen DNA-Fragmenten herrühren. Zusätzliche Banden würden darauf hindeuten, dass in der Über-Nacht-Kultur bestimmte Klone dominierten, bzw. dass nur eine begrenzte Anzahl an Rekombinanten repräsentiert sind (nicht gezeigt).

Die Elektroporation von jeweils 4×10^7 *L. major*-Promastigoten wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, mit 50 μ g Cosmid-Genbank-DNA (25 μ g aus DH5 α und 25 μ g aus XL1-Blue MRF⁻) durchgeführt. Die Selektion erfolgte in modifiziertem M199-Medium mit 50 μ g/ml Geneticin (G418). Nach einer erfolgreichen Transfektion erforderte die Amplifikation rekombinanter Leishmanien unter Geneticin-Selektion ca. 6-10 Tage.

3.1.2.1 Transfektionseffizienz und Heterogenität der rekombinanten Leishmanien

Für einen groß angelegten *screen*, der das gesamte *Leishmania*-Genom umfassen soll, ist es notwendig, die Anzahl unabhängiger rekombinanter Klone, die durch einen Elektroporationsansatz erhalten werden, zu kennen. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe einer *limiting-dilution*-Analyse. Nach Elektroporation wurde ein Aliquot des Transfektionsansatzes auf eine Zelldichte von $1,66 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt. Nach 24 Stunden bei 25°C, wurden 50 μ g/ml Geneticin zu den Ansätzen gegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für weitere drei Wochen bei 25°C inkubiert. Die Anzahl überlebender Parasiten wurde bestimmt und die Transfektionseffizienz berechnet. Die Ergebnisse von 7 Transfektionseffizienz-Bestimmungen sind nachfolgend aufgelistet.

Transfektionsansatz	Transfektionseffizienz [Transfektanden/Ansatz]
10	489
11	489
12	978
13	978
14	978
15	265
16	530

Tabelle 1:

Ergebnisse der Transfektionseffizienzbestimmungen der Ansätze 10 bis 16

Die durchschnittliche Transfektionseffizienz beträgt 672 +/- 298 Transfektanden pro Transfektionsansatz. Demnach wären theoretisch mindestens 7 Transfektionen erforderlich, um 4360 rekombinante *L. major*-Promastigote zu erhalten, die das gesamte *L. donovani*-Genom umfassen. Insgesamt wurden 20 Transfektionen durchgeführt (davon 9 während der Diplomarbeit).

Um einen Eindruck von der Heterogenität der rekombinanten *Leishmania*-Zellen zu erhalten, wurde aus den Parasiten der Transfektionsansätze 10-14 die episomale Cosmid-DNA isoliert und durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *Sac* II analysiert. In Abbildung 3, Bahn 4, 6, 8, 10 und 12 ist jeweils in einem Schmier die erwartete Vektor-spezifische Bande von ca. 7100 bp zu erkennen. Das Fehlen weiterer eindeutiger Banden lässt darauf schließen, dass nach der Geneticin-Selektion ein Gemisch unterschiedlicher Klone vorhanden war.

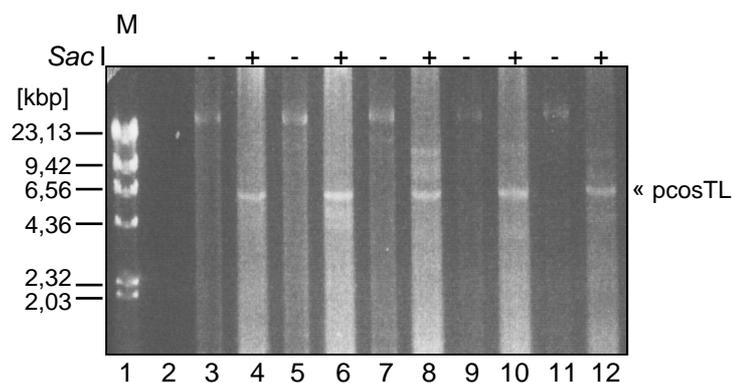


Abbildung 3: Überprüfung der Heterogenität episomaler DNA aus rekombinanten *L. major*-Promastigoten nach Antibiotika-Selektion

Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel. Nach Geneticin-Selektion wurde aus ca. 1×10^9 rekombinanten *L. major*-Promastigoten der Transfektionsansätze 10, 11, 12, 13 und 14 die episomale DNA anhand einer modifizierten Plasmid-Mini-Präparationsmethode isoliert. Jeweils 15 μ l der isolierten DNA wurden in einem 30 μ l-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *Sac* II behandelt. Die Restriktionsansätze, sowie 4 μ l der unbehandelten DNA wurden in dem dargestellten 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard diente *Hind* III-verdaute λ -DNA (Bahn 1). Die Längen des Standards sind an der linken Seite angegeben. Über den Bahnen sind die Stämme gekennzeichnet, aus denen die aufgetragene DNA isoliert wurde, sowie die Behandlung der DNA mit oder ohne Enzym. An der rechten Seite ist die bei Verdau der Cosmide mit *Sac* I auftretende Vektor-spezifische Bande markiert.

3.1.2.2 Verlauf der primären Temperatur-Selektionen

Nach dem Erreichen einer ausreichenden Zelldichte unter Geneticin-Selektion, wurden die rekombinanten Parasiten der verschiedenen Ansätze einer Temperatur-Selektion unterzogen. Als Negativ-Kontrolle diente der *L. major*-5ASKH-Wildtyp-Stamm. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml in modifiziertem M199-Medium eingesät und bis zu 6 Tagen oder länger bei 37°C gehalten. Nach 4, 5 und 6 Tagen bei 37°C wurden Aliquots entnommen, mit frischem Medium versetzt und in einen 25°C-Brutschrank überführt. Das Wachstum der überlebenden Zellen wurde qualitativ im Durchlicht-Mikroskop verfolgt.

Zum Zeitpunkt der Rückführung der Zellen auf die niedrigere Kultivierungstemperatur waren oftmals keine oder nur sehr vereinzelt lebende Zellen zu erkennen. Im Verlauf der Temperatur-Selektion mit den Ansätzen 10 bis 15 ist der Wildtyp-Stamm nach 4 Tagen bei 37°C nicht mehr angewachsen. Auch bei den Selektionen, die ich noch während meiner Diplomarbeit durchgeführt habe, überlebte der Wildtyp nur maximal 2 Tage (3. Tag wurde nicht untersucht) bei der erhöhten Temperatur. Die rekombinanten Parasiten der Ansätze 10, 11 und 12 tolerierten 5 Tage bei 37°C und zeigten nach 14 bis 18 Tagen bei 25°C deutliches Wachstum, während die Zellen der Ansätze 13 und 14 auch nach sechstägiger Inkubation bei 37°C und 13 bis 17 Tagen bei 25°C wieder proliferierten.

Die Temperatur-Selektion der Ansätze 15, 16, 17, 18, 19 und 20 war nicht erfolgreich. Es zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp kein verbessertes Überleben der rekombinanten Parasiten bei 37°C. Auffällig war, dass der Wildtyp wesentlich länger als 4 Tage bei 37°C überlebte. Die Ansätze 15-19 überlebten 6 Tage bei 37°C. Im Kontrollansatz, sowie im Ansatz 20 war nach 7 Tagen bei 37°C und 11 Tagen bei 25°C wieder ein deutliches Wachstum der überlebenden Zellen zu verzeichnen. Denkbar ist, dass eine Kontamination des Wildtyp-Stamms mit Zellen eines Temperatur-resistenteren rekombinanten Stamms vorlag. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht und die Ansätze wurden verworfen.

3.1.2.3 Isolierung und Identifizierung von Cosmiden aus überlebenden Leishmanien

Zur weiteren Analyse wurden nur Zellen aus den Ansätzen herangezogen, welche die Selektion bei der erhöhten Temperatur am längsten überlebten, während ein in gleicher Weise behandelter Kontrollstamm nicht überlebte.

Aus den rekombinanten Parasiten wurde nach Amplifikation der Zellen die Cosmid-DNA isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI behandelt. Die Auftrennung der Fragmente in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel ist in Abbildung 4 dargestellt. Im Gegensatz zum Verdau der episomalen DNA aus Antibiotika-selektierten Zellen (Abb. 3) sind nach der Temperatur-Selektion neben der Vektor-spezifischen Bande von ca. 3300 bp weitere definierte Banden zu erkennen (Bahn 4, 6, 8, 10, 12), so dass man davon ausgehen kann, dass durch die Temperatur-Selektion die Vielfalt der vorhandenen Cosmide drastisch eingengt wurde.

Zur Identifizierung und Isolierung der verschiedenen Cosmide wurde mit der aus den Parasiten gewonnenen episomalen DNA kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Aus den Bakterien-Klonen wurde durch Mini-Präparation die Cosmid-DNA isoliert. Abbildung 5 zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten Cosmide einiger Bakterien-Klone der Ansätze 12 (A), 13 (B) und 14 (C) unverdaut bzw. nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bam* HI. Das Bandenmuster, das sich nach dem *Eco*RI-Verdau der Cosmid-DNA aus den

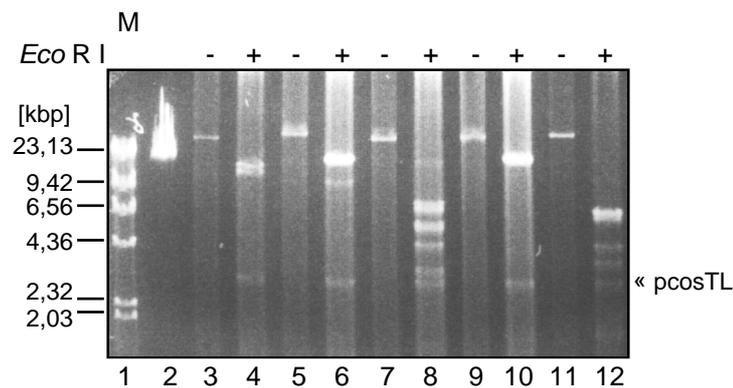


Abbildung 4: Charakterisierung episomaler DNA aus rekombinanten *L. major*-Promastigoten nach Temperatur-Selektion

Dargestellt ist ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel. Rekombinante *L. major*-Promastigote der Transfektionsansätze 10, 11, 12, 13 und 14, die eine Temperatur-Selektion bei 37°C 5 Tage (T.-A.: 10, 11, 12) bzw. 6 Tage (T.-A.: 13, 14) überlebten, wurden bei 25°C amplifiziert. Aus ca. 1×10^9 Parasiten wurde die episomale DNA anhand einer modifizierten Plasmid-Mini-Präparationsmethode isoliert und 8 μ l der isolierten DNA in einem 30 μ l-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI behandelt. Die Restriktionsansätze, sowie 2 μ l der unbehandelten DNA, wurden in dem dargestellten 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard diente *Hind* III-verdaute λ -DNA (Bahn 1). Die Längen des Standards sind an der linken Seite angegeben. Zusätzlich wurden 0,4 μ g ungeschnittene λ -DNA aufgetragen (Bahn 2). Über den Bahnen sind die Stämme gekennzeichnet, aus denen die aufgetragene DNA isoliert wurde, sowie die Behandlung der DNA mit oder ohne Enzym. An der rechten Seite ist die bei Verdau der Cosmide mit *Eco* RI auftretende Vektor-spezifische Bande markiert.

Parasiten insbesondere der Ansätze 12 und 14 zeigte, ist wiederzuerkennen (A: Bahn 3, 6, 9, 12, 15, 18; B: 3, 6, 15, 18; C: 3, 6, 9, 12, 15). Tatsächlich ergab die Analyse der Bakterien-Klone, dass jeweils nur 1 (Ansätze: 10, 12, 14) bis 2 (Ansätze: 11, 13) verschiedene Cosmide in den Temperatur-selektierten Transfektionsansätzen vorhanden waren. Die Vermutung liegt nahe, dass nur bestimmte Cosmide den Parasiten einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verleihen können.

Zusammen mit den Cosmiden pcos7.1, pcos7.2 und pcos8, die aus Temperatur-Selektionen während meiner Diplomarbeit resultierten, wurden die Cosmide pcos10.5, pcos11.2, pcos11.3, pcos12.1, pcos13.4, pcos13.12, und pcos14.4, also 10 Cosmide identifiziert und isoliert. Davon weisen anscheinend mindestens 7 Cosmide Temperatur-Resistenz-vermittelnde Gensequenzen aus *L. donovani* auf.

Bezüglich der Ansätze 7, 11, und 13, aus denen zwei verschiedene Cosmide isoliert worden waren, stellte sich die Frage, welches Cosmid den Leishmanien die Fähigkeit verlieh, den höheren Temperaturen besser zu widerstehen, bzw. ob beide Cosmide zusammen in synergistischer Weise diese Wirkung erzielten. Letzteres zu untersuchen setzt die Generierung eines *L. major*-Stammes, der beide Cosmide trägt, voraus. Die Selektion eines solchen Stammes ist aufgrund eines fehlenden zweiten Selektions-Markers nicht möglich, so dass nur durch Zufall über die Analyse von rekombinanten *Leishmania*-Einzelklonen ein solcher Stamm erhalten werden kann. Der Versuch, durch die Transfektion von *L. major* mit einem Cosmid-DNA-Gemisch, Stämme zu erhalten, die mehrere verschiedene Cosmide tragen, ist fehlgeschlagen. Alle untersuchten Einzelklone trugen jeweils nur ein Cosmid bzw. die analysierte episomale DNA ließ sich, möglicherweise aufgrund von

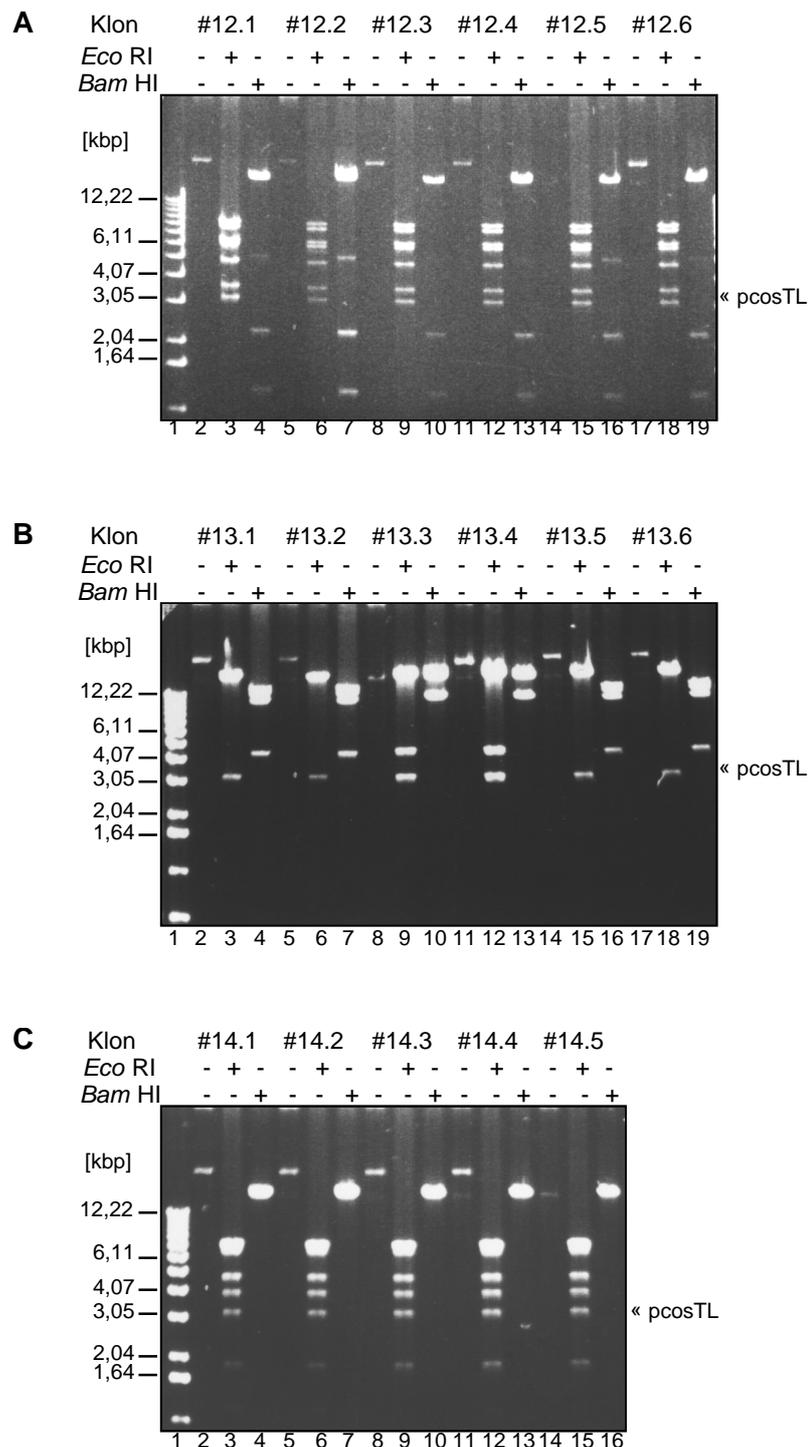


Abbildung 5: Restriktionsanalyse von Cosmiden nach Transformation von *E. coli*-DH5 α mit Cosmid-DNA aus Temperatur-selektierten *L. major*-Promastigoten

Die Abbildung zeigt drei mit Ethidiumbromid gefärbte Agarose-Gele. Die aus den rekombinanten *L. major*-Promastigoten der verschiedenen Transfektionsansätze nach Temperatur-Selektion isolierte Cosmid-DNA wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Aus den Transformanden wurde die Cosmid-DNA isoliert. In einem 50 μ l-Ansatz wurden 4 μ l DNA mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI bzw. *Bam* HI verdaut. Je 20 μ l der Ansätze, sowie 1 μ l ungeschnittene DNA wurden in den abgebildeten 0,7 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Dargestellt sind einige Cosmide, die aus den Transfektionsansätzen 12 (A), 13 (B) und 14 (C) resultierten. Als DNA-Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker (Gibco BRL; Bahn 1). Die Längen des Standards sind an der linken Seite angegeben. Über den Bahnen sind die Klone gekennzeichnet, aus denen die aufgetragene DNA isoliert wurde, sowie die Behandlung der DNA mit oder ohne Enzym. An der rechten Seite ist die bei Verdau der Cosmide mit *Eco* RI auftretende Vektor-spezifische Bande markiert.

Rekombinationsereignissen, keinem der in die Transfektion eingesetzten Cosmide zuordnen (nicht gezeigt).

Die Cosmide pcos7.1 und pcos7.2 habe ich während meiner Diplomarbeit aus überlebenden Parasiten eines Ansatzes isoliert, der 4 Tage bei 36 °C inkubiert worden war. Es überlebten aber auch Zellen des Ansatzes, der 6 Tage bei der erhöhten Temperatur gehalten wurde. Die Analyse, die ich aus Zeitgründen erst während meiner Doktorarbeit durchführen konnte, ergab, dass nur pcos7.2 in diesem Ansatz vorhanden war (nicht gezeigt). Aufgrund dessen ist es wahrscheinlich, dass der Effekt eher auf pcos7.2 als auf pcos7.1 zurückzuführen ist.

Im weiteren sollten die isolierten Cosmide hinsichtlich ihrer Fähigkeit, *L. major* das Überleben bei nicht-permissiven Temperaturen zu ermöglichen, überprüft werden. Es wurde zunächst untersucht, ob die Cosmide überlappende Sequenzen aufweisen.

3.2 Charakterisierung der identifizierten Cosmide hinsichtlich überlappender Sequenzen mittels Kreuzhybridisierung

Eine Kreuzhybridisierung der isolierten Cosmide gibt Auskunft über ein mögliches Vorhandensein homologer Sequenzen. Dadurch ließen sich die für den Selektionsvorteil verantwortlichen Sequenzen einengen. Die wiederholte Isolierung homologer Cosmide wäre zudem ein Hinweis darauf, dass das gesamte *L. donovani*-Genom durch die Selektionen erfaßt worden ist.

Bei der Herstellung der Cosmid-Genbank wurden die mit *Sau* 3AI verdauten genomischen DNA-Fragmente in die *Bam* HI-Schnittstelle kloniert (3.1). Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass die Schnittstelle dabei verloren ging, da statistisch gesehen nur jede vierte *Sau* 3AI-Schnittstelle zu einer funktionellen *Bam* HI-Schnittstelle ligiert wird. Die Vektor-Sequenz jenseits der *Bam* HI-Schnittstelle war nicht bekannt. Der Bereich wurde mit dem universellen Primer M13R sequenziert, wodurch eine *Eco* RV-Schnittstelle identifiziert werden konnte. Durch eine Behandlung der Cosmide mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Eco* RV ließ sich nun der Vektor zwar nicht vollständig aber weitestgehend vom Insert trennen. Wie in Abbildung 6 (links) zu sehen ist, lassen sich zudem die verschiedenen Cosmide mit Hilfe des *Xba* I/*Eco* RV-Doppelverdaus gut voneinander unterscheiden, was auch für weitere Analysen von Bedeutung war (siehe 3.3 und 3.4).

Zur Ermittlung von homologen Sequenzen mittels Kreuzhybridisierung wurden von jedem Cosmid sowie vom Cosmid-Vektor pcosTL DIG-markierte Sonden hergestellt. Die Cosmide wurden nach der Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Eco* RV in Agarose-Gelen aufgetrennt und anschließend einer Southern-Blot-Analyse unterzogen.

In einigen Organismen sind bestimmte Hitzeschock-Proteine an der Vermittlung von Thermotoleranz beteiligt. In *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise geht die Abwesenheit von HSP 104 aufgrund einer Mutation im *HSP 104*-Gen mit einer Verringerung der Überlebensfähigkeit bei extremen Temperaturen einher (Parsell *et al.*, 1993). Der Austausch des für HSP 100 kodierenden *CipB*-Gens in *L. major* bewirkt eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit der Parasiten an der oberen Grenze des permissiven Temperaturbereichs (35°C) (Hübel *et al.*, 1997)

Um zu untersuchen, ob die aus der Temperatur-Selektion resultierenden Cosmide das

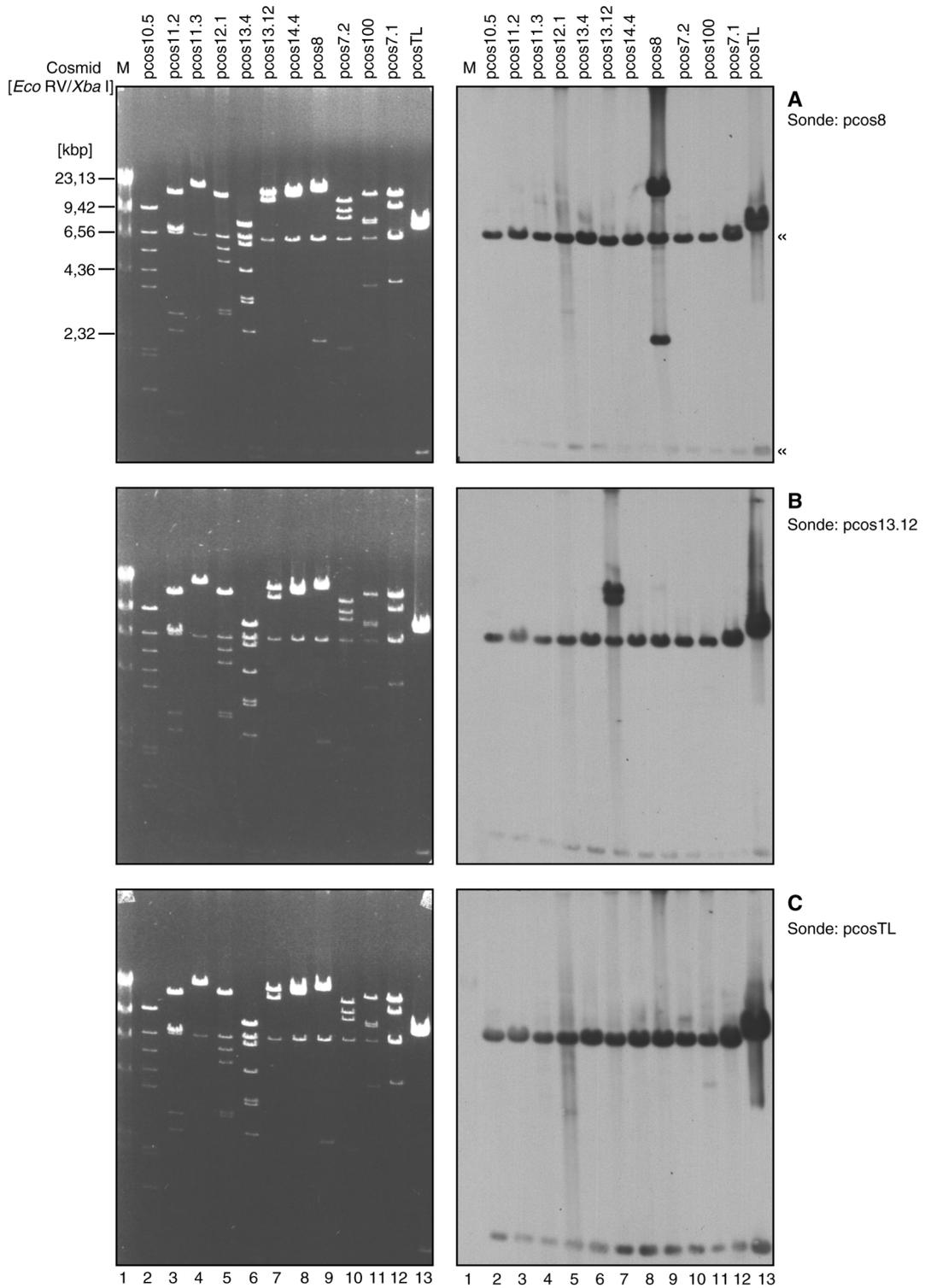


Abbildung 6 (vorherige Seite): Southern-Blot-Analyse der identifizierten Cosmide zur Ermittlung von überlappenden Sequenzen (Kreuzhybridisierung)

Dargestellt sind drei von 11 mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gelen (links) und die Chemiluminogramme (rechts) der entsprechenden Southern-Blot-Analysen. Ca. 270 bis 670 ng mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xba* I verdaute Cosmid-DNA wurde in den gezeigten 0,7 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Zusätzlich wurde der Cosmid-Vektor pcosTL (Bahn13) sowie ein Cosmid mit dem *Clp* B-Genlocus (pcos100; Bahn 11), die in gleicher Weise behandelt wurden, mit aufgetrennt. Die drei gezeigten Gele entsprechen sich bezüglich des Probenauftrags und der Bahnverteilung. Als DNA-Längenstandard diente *Hind* III-verdaute λ -DNA (Bahn 1). Die Längen des Standards sind an der linken Seite angegeben. Vektor-spezifische Banden sind rechts markiert. Die aufgetragenen Cosmide sind über den entsprechenden Bahnen angegeben (A). Nach dem Gellauf wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten Cosmid pcos8-Sonde (A) bzw. mit einer DIG-markierten Cosmid pcos13.12-Sonde (B) oder mit einer DIG-markierten pcosTL-Sonde (C) über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte mit Hilfe eines anti-DIG-Antikörpers, der mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für das Enzym wurde in die Chemilumineszenzreaktion CSPD eingesetzt und ein Röntgenfilm 15 Minuten exponiert.

Hitzeschock-Gen *ClpB* enthalten, wurde das Cosmid pcos100 mit dem *ClpB*-Genlocus in den Versuch einbezogen.

Die sich entsprechenden Membranen wurden mit den verschiedenen DIG-markierten Cosmid-Sonden behandelt. Um Fehlinterpretationen aufgrund der bereits erwähnten unvollständigen Abtrennung des Vektors von den Insert-Sequenzen zu vermeiden, war eine Hybridisierung mit einer DIG-markierten pcosTL-Sonde ebenfalls erforderlich.

Abbildung 6 zeigt als Beispiel das Ergebnis von zwei Southern-Blot-Analysen, sowie der Kontrollhybridisierung (C). Sowohl mit der DIG-markierten pcos8-Sonde (A) als auch mit der DIG-markierten pcos13.12-Sonde (B) ließen sich neben den Vektor-Fragmenten nur die jeweiligen Positiv-Kontrollen in Bahn 9 (A) bzw. in Bahn 7 (B) nachweisen. Auch die Analysen mit den anderen Cosmid-Sonden ergaben keinen Hinweis auf homologe Sequenzen (nicht gezeigt). Durch die bisherigen Selektionen wurde demnach noch nicht das gesamte *L. donovani*-Genom erfaßt, das heißt der *screen* war nicht vollständig.

Das Vorhandensein des *ClpB*-Gens auf den Cosmiden kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Sonden nicht mit dem Cosmid pcos100 hybridisierten. Inzwischen konnte allerdings auch gezeigt werden, dass *L. donovani*- Δ *ClpB*-Mutanten keine verminderte Temperatur-Toleranz aufweisen (Krobtsch und Clos, 1999). Man kann davon ausgehen, dass HSP 100 nicht für den höheren permissiven Temperaturbereich von *L. donovani* verantwortlich ist. Es erscheint auch nicht sehr wahrscheinlich, dass für die Ausprägung des Merkmals Temperatur-Toleranz nur ein Gen verantwortlich ist. Die Isolierung verschiedener Cosmide spricht eher für eine Beteiligung verschiedener Genorte.

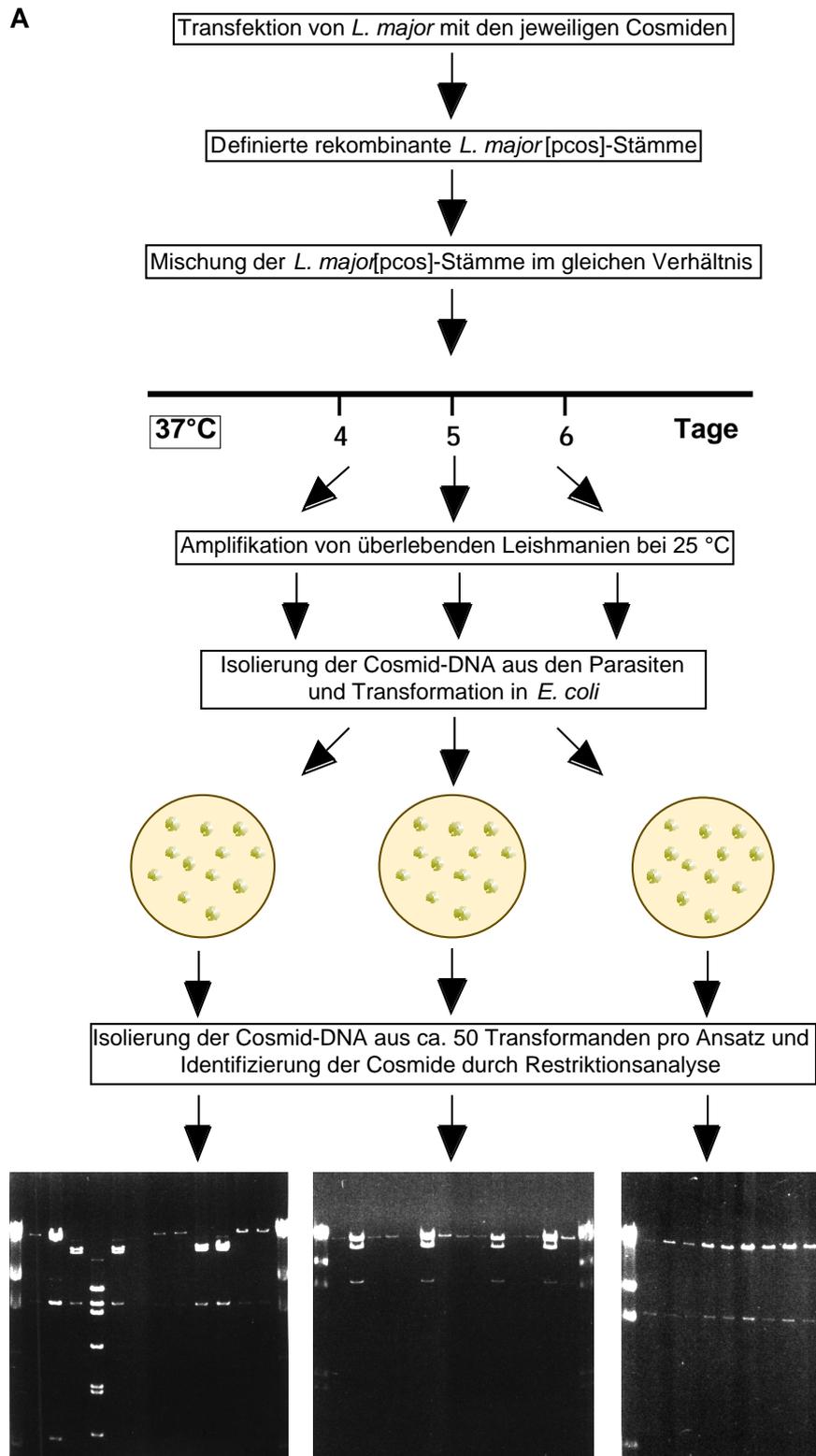
3.3 Konkurrierende Temperatur-Selektion rekombinanter *L. major* [pcos]-Stämme *in vitro*

Die Fähigkeit und das Ausmaß der im Verlauf der primären Temperatur-Selektion isolierten Cosmide *L. major* einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen zu verleihen, sollte überprüft werden.

Durch die Transfektion des *L. major*-Wildtyps mit den jeweiligen Cosmiden wurden zunächst definierte rekombinante Stämme hergestellt.

Für einen quantitativen Vergleich der einzelnen Stämme wurden die Zellen vier bis 7 Tage bei 37°C kultiviert. Täglich wurden Proben entnommen und mit Hilfe einer *limiting dilution*-Analyse erfolgte die Bestimmung der Anzahl der überlebenden Parasiten.

Ein anfängliches vielversprechendes Ergebnis lieferte ein Versuch mit den Stämmen *L. m.* [pcos7.1], *L. m.* [pcos7.2], *L. m.* [pcos8] und *L. m.* [pcosTL] als Negativ-Kontrolle. Während der Vektor-Stamm 7 Tage bei 37°C nicht überlebte und die Anzahl der Überlebenden des



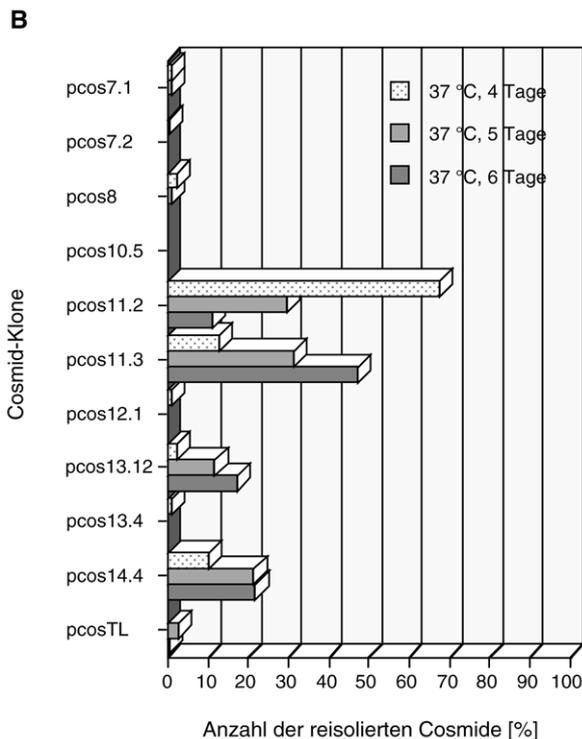


Abbildung 7: Verteilung der Cosmide in rekombinanten *L. major*-Promastigoten nach sekundärer, konkurrierender Temperatur-Selektion *in vitro*

A (vorherige Seite): Schematische

Darstellung der konkurrierenden Temperatur-

Selektion der *L. major*[pcos]-Stämme *L. m.*

[pcos10.5], *L. m.* [pcos11.2], *L. m.* [pcos11.3], *L.*

m. [pcos12.1], *L. m.* [pcos13.4], *L. m.*

[pcos13.12], *L. m.* [pcos14.4], *L. m.* [pcos8], *L. m.*

[pcos7.1], *L. m.* [pcos7.2] sowie des Stammes *L.*

m. [pcosTL], der als Negativ-Kontrolle diente.

B:

Das Wachstum der *L. major*[pcos]-Stämme wurde

über ca. eine Woche durch tägliches Verdünnen

auf eine Zelldichte von $1,66 \times 10^6$ Zellen/ml

synchronisiert. Am Versuchstag wurden die

verschiedenen Stämme nach dem Verdünnen im

gleichen Verhältnis gemischt und bei 37°C

inkubiert. Nach 4, 5 und 6 Tagen wurden der

Mischkultur Aliquots entnommen, die Zellen

sedimentiert, in frischem modifiziertem M199-

Medium resuspendiert und überlebende Zellen

bei 25°C amplifiziert. Die episomale DNA wurde

aus den rekombinanten Parasiten isoliert, in *E. coli*

transformiert und die Cosmid-DNA aus ca. 50

Transformanten je Ansatz durch Verdau mit den

Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xba* I

analysiert. Die Identifizierung der Cosmide war

nach Auftrennung der Restriktionsansätze in

einem mit Ethidiumbromid gefärbten 0,7 %igem

Agarose-Gel anhand spezifischer Bandenmuster

möglich. Die gezeigte graphische Darstellung der

prozentualen Verteilung der Cosmide ist eine

Zusammenfassung von 6 Versuchen.

Stammes *L. m.* [pcos7.1] stark reduziert war, zeigten die Stämme *L. m.* [pcos7.2] und *L. m.* [pcos8] im Verlauf des Versuchs nach einer geringen Abnahme der Zellzahl wieder Wachstum. Die Anzahl der Parasiten des Stammes *L. m.* [pcos7.2] stieg nach 7 Tagen 37°C wieder ungefähr auf die Ausgangszellzahl an, während die Zellzahl des Stammes *L. m.* [pcos8] diese sogar um ein Vielfaches überstieg (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren. Möglich ist, dass die Brutschrank-Temperatur gegen Ende des Versuchs wesentlich geringer war als 37°C. Eine Proliferation der rekombinanten *L. major*-Stämme bei 37°C wurde jedenfalls in Wiederholungsexperimenten nicht mehr beobachtet.

Auch weitere Versuche, in die alle rekombinanten Stämme einbezogen waren, ergaben nur widersprüchliche Ergebnisse.

Bei einer *limiting dilution*-Analyse wirken sich ausschließlich Unterschiede von mindestens 50 % auf das Ergebnis aus. Anscheinend sind solche ausgeprägten Unterschiede zwischen den verschiedenen rekombinanten Stämmen nicht zu erzielen, so dass diese Methode wohl nicht geeignet ist, um die Stämme untereinander zu vergleichen. Natürlich ist es möglich, weiter aufgefächerte Verdünnungsschritte zu wählen, jedoch bedeuten bereits 1:10-Verdünnungsschritte den fünffachen Arbeitsaufwand dieser ohnehin sehr arbeitsintensiven Methode. Auch wenn man versucht, durch ein Vorexperiment den entscheidenden Bereich

grob zu ermitteln, um diesen nachfolgend genauer aufzuschlüsseln, ist aufgrund der beobachteten Schwankungen zwischen den Versuchen nicht unbedingt damit zu rechnen, dass in einem Wiederholungsexperiment der gleiche Bereich Gültigkeit hat.

Alternativ habe ich versucht, die Stämme unter konkurrierenden Bedingungen einer Temperatur-Selektion auszusetzen, um nachfolgend, anhand der Verteilung der Stämme in den überlebenden Parasiten, eine Aussage darüber machen zu können, welche Cosmide den Parasiten einen Vorteil bei nicht-permissiven Temperaturen verschaffen und in welchem Ausmaß dies der Fall ist.

Die Wachstumsraten der verschiedenen rekombinanten Stämme wurden zunächst durch tägliches Verdünnen über ca. eine Woche synchronisiert. Wie in Abbildung 7 A schematisch dargestellt, wurden die Stämme für die Temperatur-Selektion im gleichen Verhältnis gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 4, 5 und 6 bzw. 7 Tagen wurden der Mischkultur Proben entnommen und überlebende Zellen bei 25°C amplifiziert. Nach Transformation der aus den überlebenden Leishmanien gewonnenen Cosmid-DNA in *E. coli*, erfolgte die Analyse von ca. 50 Transformanten je Ansatz. Die Cosmide konnten dabei durch gleichzeitige Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *Xba I* und nachfolgende Auftrennung in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel anhand ihrer spezifischen Bandenmuster identifiziert werden.

Die Verteilung der rekombinanten Stämme in dem Gemisch nach Temperatur-Selektion ist in Abbildung 7B graphisch dargestellt als die prozentuale Verteilung der Cosmide, die aus den überlebenden Parasiten isoliert wurden. In der Graphik ist die Zusammenfassung der Ergebnisse von 6 Versuchen gezeigt, während in der Tabelle 2 die Ergebnisse der Einzelversuche aufgeführt sind.

Ein Cosmid (pcos10.5) wurde gar nicht wiedergefunden. Bis zu vier Tagen wurden noch die Cosmide pcos7.2, pcos12.1 und pcos13.4 gefunden, wogegen nach 5 Tagen vereinzelt die Cosmide pcos7.1 und pcos8 auftraten. Auch der Cosmid-Vektor pcosTL wurde vereinzelt reisoliert.

Aus den in der Tabelle aufgeführten Einzelversuchen geht hervor, dass diese hinsichtlich der isolierten Cosmide nicht immer gleich verliefen. Zusammenfassend wird aber deutlich, dass am häufigsten pcos13.12, pcos14.4 und insbesondere pcos11.3 vertreten waren und zwar mit steigender Tendenz, je länger bei 37°C inkubiert wurde. Auch das Cosmid pcos11.2 wurde sehr häufig aus überlebenden Parasiten isoliert. Auffällig ist jedoch, dass in diesem Fall die beschriebene Tendenz gegenläufig war. Aus den in der Tabelle angegebenen Daten wird zudem deutlich, dass je öfter die Parasiten amplifiziert werden mussten, um für die weiteren Analysen verwertbare Cosmid-DNA zu erhalten, desto stärker war das Cosmid pcos11.2 vertreten. Möglicherweise zeichnet sich dieses Cosmid dadurch aus, dass es den Parasiten nicht vorrangig einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verleiht, sondern eher für einen Wachstumsvorteil verantwortlich ist. Dies wurde auch in weiteren Versuchen deutlich (3.4 u. a.).

Die Cosmide pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 zeichnen sich dagegen nach diesen Ergebnissen dahingehend aus, dass sie *L. major* bei nicht-permissiven Temperaturen ein besseres Überleben ermöglichen.

Zu dem Zeitpunkt, als diese Versuche abgeschlossen wurden, lagen die Ergebnisse der Selektion in der BALB/c-Maus, die im folgenden Kapitel beschrieben wird, noch nicht vor. Die

pcos	I	I	I	II	II	II	III	III	III
	4 Tage 37°C [%] (4)	5 Tage 37°C [%] (1)	6 Tage 37°C [%] (1)	4 Tage 37°C [%] (5)	5 Tage 37°C [%] (1)	6 Tage 37°C [%] (1)	4 Tage 37°C [%] (1)	5 Tage 37°C [%] (1)	6 Tage 37°C [%] (1)
10.5	-	-	-	∅	-	-	-	-	-
11.2	89,6	-	-	∅	2	64	2	-	-
11.3	2,1	58	-	∅	28	22	46	64	100
12.1	2,1	-	-	∅	-	-	-	-	-
13.4	-	-	-	∅	-	-	4	-	-
13.12	-	8	100	∅	18	-	-	32	-
14.4	4,2	12	-	∅	48	-	34	-	-
8	-	2	-	∅	4	-	8	-	-
7.2	-	-	-	∅	-	-	-	-	-
7.1	-	4	-	∅	-	-	4	-	-
pcosTL	-	14	-	∅	-	2	-	-	-
?	2,1	2	-	∅	-	12	2	4	-

pcos	IV	IV	IV	V	V	V	VI	VI	VI
	4 Tage 37°C [%] (1)	5 Tage 37°C [%] (3)	6 Tage 37°C [%] (1)	4 Tage 37°C [%] (2)	5 Tage 37°C [%] (2)	6 Tage 37°C [%] (1)	4 Tage 37°C [%] (3)	5 Tage 37°C [%] (1)	7 Tage 37°C [%] (1)
10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.2	59,3	100	-	98	90,5	-	96,7	30,8	-
11.3	3,7	-	100	2	4,8	14	-	13,5	54
12.1	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-
13.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.12	14,8	-	-	-	-	-	-	3,8	-
14.4	7,4	-	-	-	2,4	82	-	50	46
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-
7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pcosTL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
?	7,4	-	-	-	2,4	-	3,3	1,9	-

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Cosmide in überlebenden Parasiten einer Mischkultur aus *L. major* [pcos]-Stämmen nach Temperatur-Selektion bei 37°C für 4, 5 und 6 bzw. 7 Tage. Die Ergebnisse der Versuche I bis VI sind aufgeführt. Die in Klammern gesetzten Ziffern in der Kopfzeile geben an, wie oft die Parasiten für die Isolierung der Cosmid-DNA amplifiziert wurden.

oben erwähnte Vermutung, dass das Cosmid pcos11.2 für einen Wachstumsvorteil verantwortlich ist, hatte somit noch keine weitere Bestätigung erhalten, so dass in die parallel zur Mauspassage durchgeführten weiteren Versuche alle vier Cosmide einbezogen wurden. Durch die Herstellung von Plasmid-Genbanken aus diesen Cosmiden, nachfolgender Transfektion des *L. major*-Wildtyps und Temperatur-Selektion der rekombinanten Parasiten,

wurde versucht, die für den Selektionsvorteil verantwortlichen Sequenzen einzuengen (3.6).

3.4 Konkurrierende Selektion rekombinanter *L. major* [pcos]-Stämme im Säugetierwirt

Im Säugetierwirt sind die rekombinanten Parasiten keinem Antibiotika-Selektionsdruck ausgesetzt. Nicht benötigte Cosmide können entsprechend verloren gehen. Es sollte untersucht werden, ob die aus den rekombinanten *L. major*-Promastigoten nach Temperatur-Selektion isolierten Cosmide auch während einer Mauspassage stabil sind, das heißt den Parasiten einen Selektionsvorteil verschaffen. Die Verteilung der verschiedenen rekombinanten Stämme im Lymphknoten und in der Milz könnte auf eine mögliche

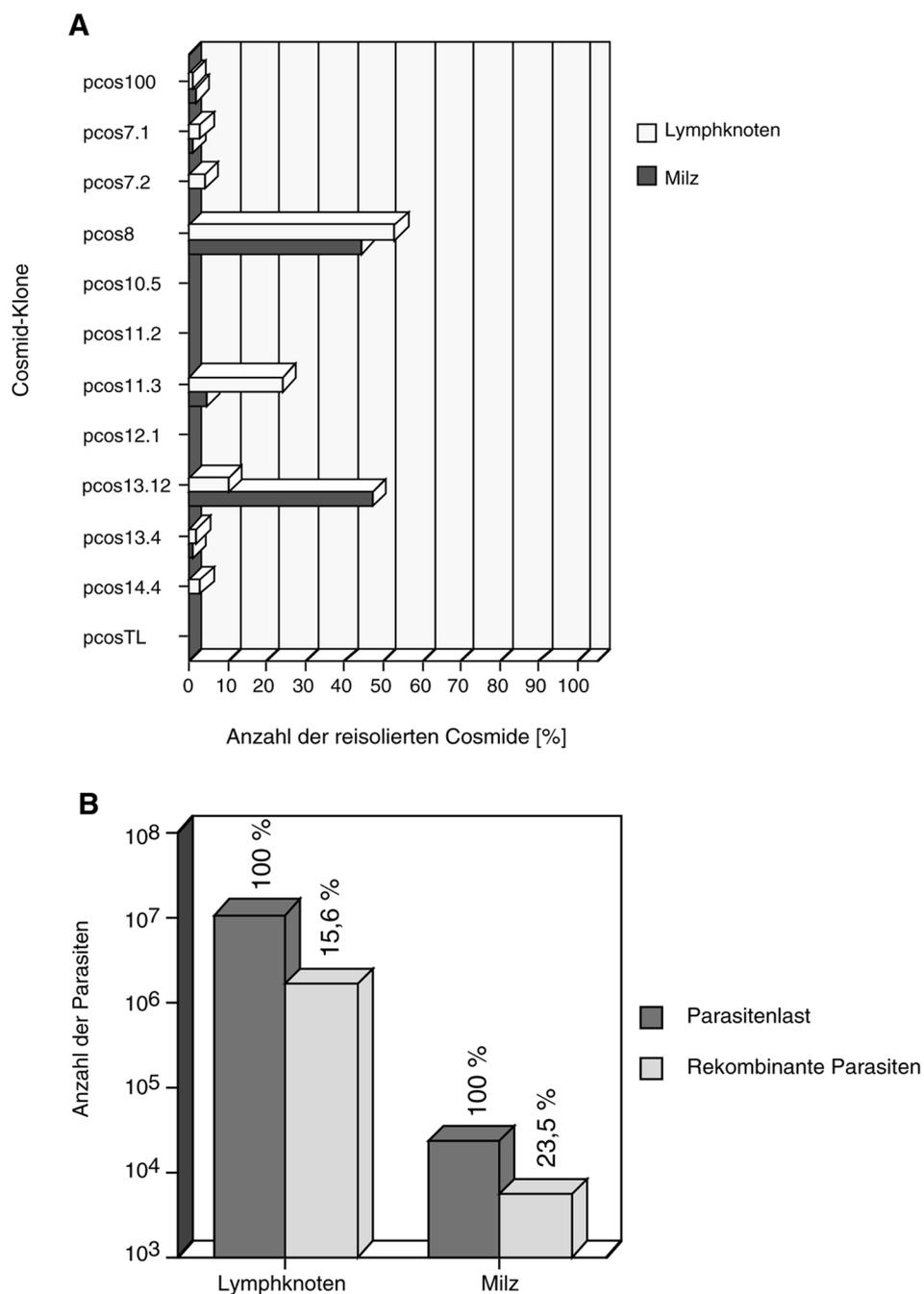


Abbildung 8 (vorherige Seite): Konkurrierende Selektion rekombinanter *L. major*-Stämme im Säugetierwirt

A: Stationäre Zellen der *L. major*-Stämme *L. m.* [pcos10.5], *L. m.* [pcos11.2], *L. m.* [pcos11.3], *L. m.* [pcos12.1], *L. m.* [pcos13.4], *L. m.* [pcos13.12], *L. m.* [pcos14.4], *L. m.* [pcos8], *L. m.* [pcos7.1], *L. m.* [pcos7.2], *L. m.* [pcos100], sowie des Stamms *L. m.* [pcosTL], der als Negativ-Kontrolle diente, wurden im gleichen Verhältnis miteinander gemischt. Zwei BALB/c-Mäuse wurden mit jeweils 5×10^7 Zellen des Gemischs infiziert, wobei die Parasiten in den hinteren rechten Fußballen inokuliert wurden. Nach 10,5 Wochen hatten sich ausgeprägte Läsionen entwickelt. Die Tiere wurden getötet, Lymphknoten und Milzen isoliert und in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin homogenisiert. Aliquots jeder Zellsuspension wurden direkt in eine *limiting dilution*-Analyse (B) eingesetzt, während die restlichen Zellsuspensionen unter Geneticin-Selektion zur Amplifikation von promastigoten Zellen bei 25°C kultiviert wurden. Die episomale DNA wurde aus den rekombinanten Parasiten isoliert, in *E. coli* transformiert und die Cosmid-DNA aus ca. 50 Transformanten je Ansatz durch Verdauung mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xba* I analysiert. Die Identifizierung der Cosmide war nach Auftrennung der Restriktionsansätze in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 0,7 %igem Agarose-Gel anhand spezifischer Bandenmuster möglich. Die gezeigte graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Cosmid-Spezies ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der zwei Infektionen.

B: Die graphische Darstellung zeigt die Auswertung einer *limiting dilution*-Analyse. Zur Bestimmung der Gesamtzahl der Parasiten bzw. der Anzahl der rekombinanten Parasiten in Milz und Lymphknoten wurde jeweils ein Aliquot der verschiedenen Homogenisate (A) in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin bzw. mit Geneticin in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt und anschließend drei Wochen bei 25 °C kultiviert. Die Anzahl überlebender Parasiten wurde bestimmt und aus den Daten der prozentuale Anteil rekombinanter Zellen an der Gesamtzahl der Parasiten in Lymphknoten und Milz berechnet. Die angegebenen Werte sind eine Zusammenfassung der Ergebnisse der zwei Infektionen.

Beeinflussung des Tropismus durch bestimmte Cosmide hinweisen, sowie auf einen Selektionsdruck für Temperatur-Toleranz, falls die gleichen Cosmide dominieren sollten, wie nach der Temperatur-Selektion.

Es wurden zwei BALB/c-Mäuse mit einem Gemisch der verschiedenen *L. major* [pcos]-Stämme infiziert. Zusätzlich zu den im Abschnitt 3.3 angegebenen Stämmen enthielt das Gemisch auch einen Stamm mit dem Cosmid pcos100, das den *ClpB*-Genlocus trägt (siehe auch 3.2). Nach 10,5 Wochen hatten sich ausgeprägte Läsionen entwickelt und die Tiere wurden getötet. Die entnommenen Lymphknoten und Milzen wurden in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin homogenisiert und Aliquots der Suspensionen zur Bestimmung der Parasitenlast und zur Ermittlung des Anteils an rekombinanten Parasiten in eine *limiting dilution*-Analyse mit und ohne Geneticin im Kulturmedium eingesetzt. Die verbleibenden Organ-Homogenisate wurden in modifiziertem M199-Medium mit Geneticin aufgenommen. Rekombinante *L. major*-Promastigote wurden zur Isolierung der Cosmid-DNA angezüchtet. Um die Verteilung der einzelnen Cosmide in den Parasiten zu bestimmen, wurde die isolierte Cosmid-DNA in *E. coli* transformiert. Die Cosmid-DNA aus ca. 50 Transformanten pro Ansatz wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen und die Cosmide konnten anhand ihres spezifischen Bandenmusters identifiziert werden.

Parallel zur Mauspassage wurde das Gemisch über den gesamten Zeitraum der Infektion bei 25°C in modifiziertem M199-Medium mit bzw. ohne Geneticin kultiviert. Analog wurde der Anteil an rekombinanten Parasiten in der Kultur, die ohne Antibiotikum gezogen wurde anhand einer *limiting dilution*-Analyse bestimmt und die Verteilung der Cosmide in den rekombinanten Parasiten beider Kulturen nach Amplifikation der Zellen ermittelt.

Erstaunlicherweise lag der Anteil an rekombinanten Parasiten in der 25°C-Kultur bei 100 %. Die Untersuchung der Verteilung der Cosmide ergab unabhängig davon, ob im Kulturmedium

Geneticin vorhanden war oder nicht, dass nur der Stamm *L. m.* [pcos11.2] nach den 10,5 Wochen in der Kultur vertreten war. Im Verlauf der Mauspassage dagegen war das Cosmid nicht stabil (Abbildung 8 A).

Wie schon in Kapitel 3.3 erwähnt, wurde vermutet, dass das Cosmid pcos11.2 möglicherweise einen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten hat. In einem früheren Versuch wurde ebenfalls die Verteilung der rekombinanten Stämme in einer Mischkultur, die eine Woche bei 25°C kultiviert wurde, untersucht. Der Stamm *L. m.* [pcos11.2] war jedoch im Vergleich zu den anderen Stämmen nicht verstärkt vorhanden (nicht gezeigt). Abgesehen von der viel kürzeren Kultivierungszeit, war ein wesentlicher Unterschied, dass die Kultur täglich verdünnt wurde und die Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Im Gegensatz dazu wurden die 25°C-Mischkulturen während der 10,5 Wochen nur zweimal wöchentlich verdünnt, so dass die Zellen regelmäßig auch die stationäre Phase erreichten. Anscheinend fördert das Cosmid pcos11.2 das Überwinden eines Wachstumsarrestes, so dass stationäre Zellen schneller die logarithmische Wachstumsphase erreichen können. Weitere Versuche haben dies bestätigt (3.6.3.1).

Die quantitative Auswertung der *limiting dilution*-Analyse der Organ-Homogenisate ergab, dass 15,6 % der Parasiten aus den Lymphknoten und 23,5 % der Parasiten aus den Milzen rekombinant waren (Abb. 8B). Ein erheblicher Anteil der Parasiten hatte also die Cosmide verloren, so dass man davon ausgehen kann, dass nur wenige Cosmide für die rekombinanten *L. major*-Amastigoten von Vorteil sind.

Abbildung 8A zeigt die graphische Darstellung der Verteilung der Cosmide in den Parasiten nach der Mauspassage. Weder der Cosmid-Vektor pcosTL, noch die Cosmide pcos10.5 und pcos12.1 waren in den Parasiten, die aus den Lymphknoten und den Milzen reisoliert wurden, vertreten. Einige Cosmide wurden nur vereinzelt aus den Parasiten der Lymphknoten (pcos7.2, pcos14.4) bzw. auch aus den Parasiten der Milzen (pcos100, pcos7.1, pcos13.4) isoliert.

Die Cosmide pcos11.3 und pcos13.12 waren bereits in überlebenden *L. major*-Promastigoten nach Temperatur-Selektion stark repräsentiert (3.3). Auch im Säugetierwirt scheinen die Cosmide, die insbesondere aus Parasiten der Lymphknoten (pcos11.3) bzw. der Milzen (pcos13.12) isoliert wurden, den amastigoten Stadien von Vorteil zu sein. Das Cosmid pcos8 dagegen trat nach der Temperatur-Selektion nur vereinzelt in Erscheinung, während es nach der Mauspassage in den Reisolaten sowohl der Lymphknoten als auch der Milzen mit einem Anteil von 53 % bzw. 44 % vertreten war.

Der Versuch hat gezeigt, dass einige Cosmide, die *L. major* ermöglichen, hohen Temperaturen besser zu widerstehen, auch während einer Mauspassage für die Parasiten von Vorteil sind. Am Beispiel des Cosmid pcos8 wird jedoch deutlich, dass Temperatur-Toleranz und Überlebensfähigkeit im Säugetierwirt bzw. Tropismus nicht notwendig miteinander verknüpft sein müssen.

3.5 Chromosomale Lokalisation der *L. donovani*-Sequenzen ausgewählter Cosmide

Aufgrund der Ergebnisse der konkurrierenden Temperatur-Selektion (3.3) und der konkurrierenden Selektion der *L. major* [pcos]-Stämme im Säugetierwirt (3.4) wurden die Cosmide pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12, pcos14.4 und pcos8 für weitere Untersuchungen ausgewählt.

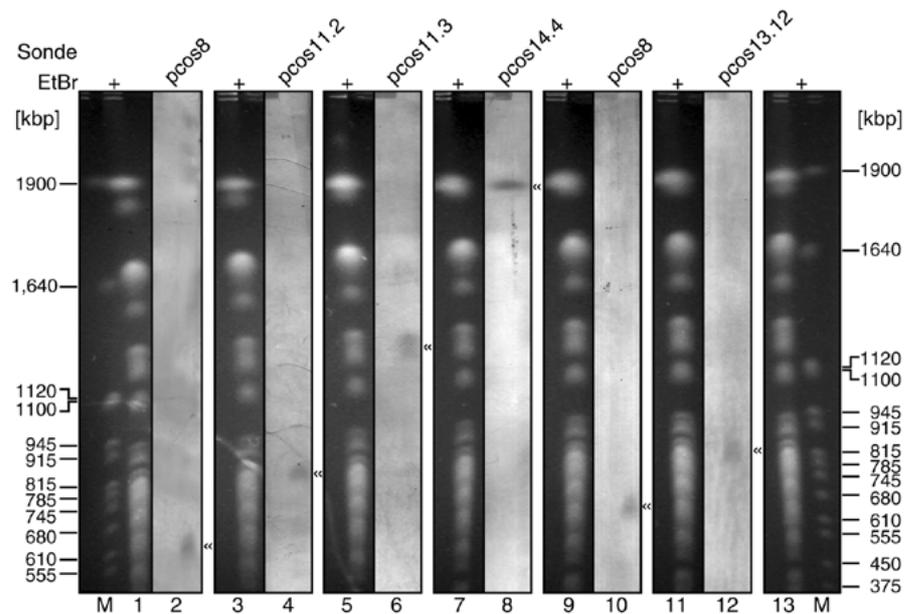


Abbildung 9: Chromosomale Lokalisation der *L. donovani*-Sequenzen ausgewählter Cosmide durch Pulsfeld-Gelelektrophorese und Southern-Blot-Analyse

Die Chromosomen von 2×10^7 *L. donovani*-Promastigoten wurden in einem 1%igen Agarose-Gel mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Längenstandard (M) dienen die Chromosomen des *Saccharomyces cerevisiae*-Stamms YPH80, deren Größen jeweils rechts und links angegeben sind. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und anschließender Dokumentation wurden die Chromosomen auf eine Nylonmembran transferiert und mit den über den entsprechenden Bahnen angegebenen DIG-markierten Cosmid-Sonden über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte kolorimetrisch mit Hilfe eines anti-DIG-Antikörpers, der mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für das Enzym wurden NBT und X-Phosphat in die Farbreaktion eingesetzt. Links neben den Membranen sind jeweils die diesen entsprechenden mit Ethidiumbromid gefärbten Gel-Abschnitte dargestellt. Die etwas schwachen Farbsignale sind mit Pfeilen markiert.

Zunächst habe ich die chromosomale Lokalisation der *L. donovani*-Sequenzen dieser Cosmide annäherungsweise bestimmt, um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob bereits im Rahmen des *Leishmania*-Genom-Projektes (Ravel *et al.*, 1998) Sequenz-Informationen über die in Frage kommenden Chromosomen vorliegen.

Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden die Chromosomen von *L. donovani* voneinander getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die Membran-Abschnitte mit DIG-markierten Sonden der jeweiligen Cosmide hybridisiert. Es muss nochmals betont werden, dass es sich bei der hier durchgeführten chromosomalen Lokalisation nur um eine Annäherung handelt. Während die Anordnung der Gene auf den Chromosomen verschiedener *Leishmania*-Spezies konserviert ist (Ravel *et al.*, 1995; Wincker *et al.*, 1996; Britto *et al.*, 1998; Ravel *et al.*, 1999), weisen die homologen Chromosomen verschiedener *Leishmania*-Spezies und sogar verschiedener Stämme innerhalb einer Spezies einen ausgeprägten Größenpolymorphismus auf (Pages *et al.* 1989; Bastien *et al.*, 1992; Wincker *et al.*, 1996), der u. a. auf Amplifikationen und Deletionen repetitiver Sequenzen in den subtelomeren Bereichen der Chromosomen zurückzuführen ist (Blaineau *et al.*, 1991; Ravel *et al.*, 1996; Sunkin *et al.*, 2000). Auch homologe Chromosomen eines Stamms können in ihrer Größe variieren. Im Referenzstamm des *Leishmania*-Genom-Projektes, *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin, z. B. sind davon die Chromosomen 1, 2 und 27 betroffen (Ravel *et al.*, 1998). Es ist daher nicht möglich,

Chromosomen allein anhand ihrer Größe zu identifizieren, da nicht-homologe Chromosomen im gleichen Größenbereich co-migrieren und homologe Chromosomen sich in ihrer Größe unterscheiden können. Eine exakte Zuordnung einer Sequenz zu einem Chromosom erfordert eine vergleichende Analyse von gut charakterisierten Karyotypen mehrerer verschiedener *Leishmania*-Spezies (Wincker *et al.*, 1996; Ravel *et al.*, 1998).

In Abbildung 9 sind die mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel-Abschnitte dargestellt, die den Karyotyp des *L. donovani*-Stamms MHOM/SD/??/LO8 zeigen (Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14), während rechts daneben jeweils der entsprechende colorimetrische Nachweis des Southern-Blots, der mit der über der Bahn angegebenen DIG-markierten Cosmid-Sonde hybridisiert wurde, zu sehen ist.

Die *pcos8*-Sonde hybridisierte mit einer chromosomalen Bande von ca. 650 kb (Bahn 2, und 11). In Anlehnung an den Karyotyp des klonierten *L. infantum*-Stamms LEM1317, der als Referenzstamm für die Erstellung der Chromosomen-Nomenklatur diente (Wincker *et al.* 1996), könnte diese Bande den Chromosomen 13 oder 14 entsprechen, die beide eine Größe von 650 kb aufweisen. Die großen Chromosomen 34 (2000 kb), 35 (2200 kb) und 36 (3000kb) konnten unter den gegebenen Laufbedingungen nicht ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden und liefen überwiegend als eine Bande. In diesem Bereich hybridisierte die *pcos14.4*-Sonde (Bahn 8). Das Signal, das mit der DIG-markierten *pcos13.12*- (Bahn 12) bzw. *pcos11.2*-Sonde (Bahn 4) erzielt wurde, liegt ungefähr auf einer Höhe mit dem 815 kb großen Hefechromosom II (M). Möglicherweise könnte es sich in diesem Fall um die Chromosomen 19 (800 kb) oder 20 (800 kb) handeln. Das der *pcos11.3*-Sonde entsprechende Signal liegt ungefähr zwischen 1200 kb und 1300 kb (Bahn 6). Im Original-Blot wird allerdings deutlich, dass es sich hier anscheinend um zwei Signale handelt. Dies bedeutet nicht unbedingt, dass das *pcos11.3*-Insert aus Anteilen nicht benachbarter Sequenzen zusammengesetzt ist. Wie bereits erwähnt, können auch homologe Chromosomen erheblich in ihrer Größe variieren. Die *L. donovani*-Sequenzen des Cosmids *pcos11.3* könnten von einem solchen Chromosom stammen. In Frage käme das Chromosom 27, obwohl im Falle des *L. infantum*-Stamms LEM1317 die homologen Chromosomen mit 1150 kb (27a) und 1300 kb (27b) relativ weit auseinander liegen, während man einen so großen Abstand aufgrund des mit der *pcos11.3*-Sonde erzielten Signals nicht vermuten kann. Allerdings ist auch nicht anzunehmen, dass in dem untersuchten *L. donovani*-Stamm die gleichen Größenverhältnisse vorliegen. Desweiteren liegen in dem Bereich um 1300 kb die Chromosomen 29 (1400 kb), 28 (1300 kb) und 26 (1100 kb).

Zur damaligen Zeit standen nur begrenzte Sequenz-Informationen aus dem *Leishmania*-Genom-Projekt zur Verfügung. Die Sequenzierung des Chromosoms 1 wurde 1998 abgeschlossen (Myler *et al.*, 1999). Mittlerweile liegt auch die vollständige Sequenz der Chromosomen 3 und 4 bzw. die nahezu vollständige Sequenz der Chromosomen 19 und 23 vor. Die Sequenzierung der anderen Chromosomen wurde mit Ausnahme von 7, 8, 9, 10 und 11 in Angriff genommen. Zahlreiche offene Leserahmen dieser Chromosomen, insbesondere von 5, 13, 14, 15, 20, 21, 26 und 35, sind bereits in der Genbank annotiert (Myler *et al.*, 2000; www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html).

Als die ersten Sequenzen des Cosmids *pcos8* vorlagen, zeigte sich jedoch keine Übereinstimmung mit den in der Genbank angegebenen *Leishmania*-Sequenzen, so dass eine vollständige Sequenzierung unumgänglich war. Auch die Sequenzen der anderen Cosmide wiesen keine guten Homologien zu bekannten *Leishmania*-Sequenzen auf. Eine

Ausnahme bildet das Cosmid pcos11.2, dessen Sequenzierung erst kürzlich abgeschlossen wurde. Einige offene Leserahmen der *L. donovani*-Sequenz des Cosmids stimmen gut mit Sequenzen des *L. major*/Friedlin-Chromosoms 12 (*GeneBank Accession-N°* AL390114.3) überein. Das Chromosom 12 in *L. infantum* besitzt allerdings eine Größe von 600 kb, während die pcos11.2-Sonde mit einer chromosomalen Bande von ca 800 kb hybridisierte. Wie erwähnt, liegen in diesem Bereich bezüglich des *L. infantum*-Stamms LEM1317 die Chromosomen 19 und 20. Für die vorliegenden Sequenzen des Chromosoms 12 wurde angegeben, dass sie noch vorläufig sind. Außerdem wurde nicht ausgeschlossen, dass aufgrund von Kreuz-Kontaminationen Sequenzen anderer Chromosomen enthalten sein könnten. Andererseits ist auch denkbar, dass im untersuchten *L. donovani*-Stamm das Chromosom 12 wesentlich größer ist als in *L. infantum* LEM1317, wie es auch bei anderen *Leishmania*-Stämmen der Fall ist (Wincker *et al.*, 1996).

3.6 Eingrenzung der Sequenzen, die *L. major* [pcos]-Stämmen einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen verleihen mit Hilfe von Plasmid-Genbanken aus ausgewählten Cosmiden

Die Protein-kodierenden Sequenzbereiche der Chromosomen 1, 3 und 4 weisen eine Gendichte von 1 Gen/3,7 kb auf (Myler *et al.*, 2000). Demnach wären bei einer durchschnittlichen Cosmid-Insert-Größe von 38 kb (3.1.1) ca. 10 Gene zu erwarten.

Eine Möglichkeit, die Sequenzen der Cosmide, die den *L. major*/pcos-Stämmen einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen verschaffen, einzuengen, ist die Temperatur-Selektion rekombinanter Parasiten, die mit Plasmid-Genbanken der entsprechenden Cosmide transfiziert wurden. Ausgehend von den Ergebnissen der konkurrierenden Temperatur-Selektion *in vitro* (3.3) wurden von den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 Plasmid-Genbanken hergestellt.

Die aus *E. coli* präparierte Cosmid-DNA der einzelnen Cosmide sowie eines Gemischs der vier Cosmide wurde partiell mit der Restriktionsendonuklease *Sau* 3AI verdaut. Zusätzlich wurde auch aus den rekombinanten *L. major*-Stämmen isolierte und mit *Mbo* I behandelte Cosmid-DNA für die Konstruktion von Plasmid-Genbanken eingesetzt.

Die Bedingungen für den Partialverdau wurden so gewählt, dass ein möglichst hoher Anteil der Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 6 kb vorlagen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die entsprechenden Fragmente aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

In einem ersten Versuch habe ich für die Konstruktion einer Plasmid-Genbank den mit *Bam* HI linearisierten und mit der Alkalischen Phosphatase dephosphorylierten Cosmid-Vektor pcosTL eingesetzt. Die Transformation eines Ligationsansatzes, der nur die partiell verdaute Cosmid-DNA enthielt, ergab jedoch, dass die Anzahl an Transformanden, die auf die Ligation von Cosmid-Fragmenten, die Vektoranteile mit dem β -Lactamase-Gen enthalten, zurückzuführen sind, annähernd so hoch war, wie die Anzahl der Transformanden, die aus dem eigentlichen Ligationsansatz resultierten. Aufgrund dessen wurde für die Herstellung der Plasmid-Genbanken der Vektor pBGS9neoR konstruiert, der eine Selektion unter Kanamycin erlaubt und somit das Entstehen solcher Klone nicht zulässt. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, ging pBGS9neoR aus dem Vektor pBGS9 (Spratt *et al.*, 1986) hervor. Zwischen die *Bam* HI- und

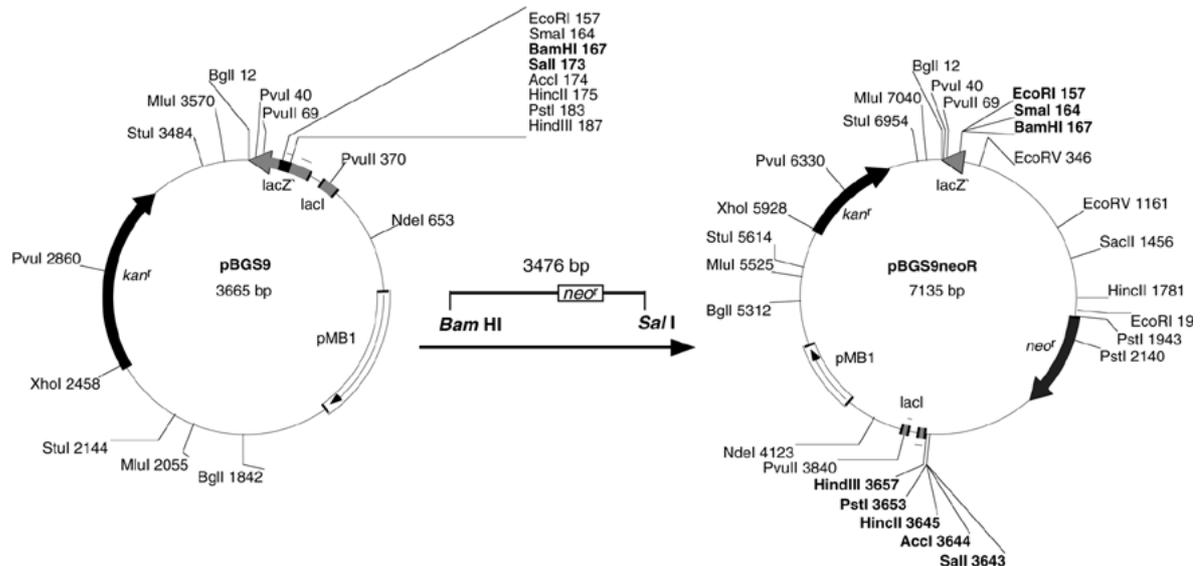


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Vektoren pBGS9 und pBGS9neoR

Die Plasmidkarte links zeigt den Vektor pBGS9 (Spratt *et al.*, 1986), der als Grundlage für die Konstruktion des Vektors pBGS9neoR (rechts) diente. Das 3476 bp große *Bam* HI/*Sal* I-Fragment aus dem Cosmid-Vektor pcosTL (Abbildung 1) enthält das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi* flankiert wird und eine Selektion rekombinanter Leishmanien ermöglicht. Das Fragment wurde zwischen die *Bam* HI- und *Sal* I-Schnittstellen von pBGS9 kloniert. Der Vektor pBGS9neoR wurde für die Herstellung der Plasmid-Genbanken aus den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 verwendet.

Sal I-Schnittstellen von pBGS9 wurde das 3476 bp-*Bam* HI/*Sal* I-Fragment aus pcosTL ligiert. Das Fragment umfaßt das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi* flankiert ist und eine Selektion rekombinanter Leishmanien ermöglicht. In der Plasmidkarte des Vektors pBGS9neoR sind die exakten Positionen der Restriktionsschnittstellen des *Bam* HI/*Sal* I-Fragments angegeben, die allerdings erst nach der Sequenzierung der Cosmide (3.9) ermittelt werden konnten.

Die *Bam* HI-kompatiblen *Sau* 3AI- bzw. *Mbo* I-Fragmente der Cosmide wurden in pBGS9neoR ligiert und in *E. coli* transformiert. Das Auftreten vieler sehr kleiner Kolonien, die auf die Ligation von Insert-Fragmenten mit dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen zurückzuführen sind, konnte durch den Einsatz einer höheren Kanamycin-Konzentration (100 µg/ml) unterdrückt werden. Jede Plasmid-Genbank bestand aus ca. 20000 gepoolten Kolonien. Die Restriktionsanalyse der DNA einiger Transformanden zeigte, dass der Anteil an rekombinanten Klonen mit Plasmiden, welche die erwarteten Vektorbanden und ein Insert aufwiesen, bei ca. 90 % lag (nicht dargestellt).

Die Plasmid-Genbank-DNA wurde isoliert und in *L. major* transfiziert. Rekombinante Parasiten wurden einer Temperatur-Selektion unterzogen.

3.6.1 Temperatur-Selektion der mit Plasmid-Genbank-DNA transfizierten *L. major*-Promastigoten

Die Temperatur-Selektion wurde nach der Geneticin-Selektion zunächst mit rekombinanten Leishmanien von je vier Ansätzen, die mit der Cosmid pcos11.3-Plasmid-Genbank (*L. major*

[Pb11.3A], -[Pb11.3B], -[Pb11.3C], -[Pb11.3D]) bzw. mit der Plasmid-Genbank, die aus dem Gemisch der vier Cosmide (*L. major* [PbMixA], -[PbMixB], -[PbMixC], -[PbMixD]) hergestellt wurde, durchgeführt. Als Kontrollen dienten der *L. major*-Wildtyp, sowie der Stamm *L. major* [pBGS9neoR]. Die Parasiten wurden mit einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml in modifiziertem

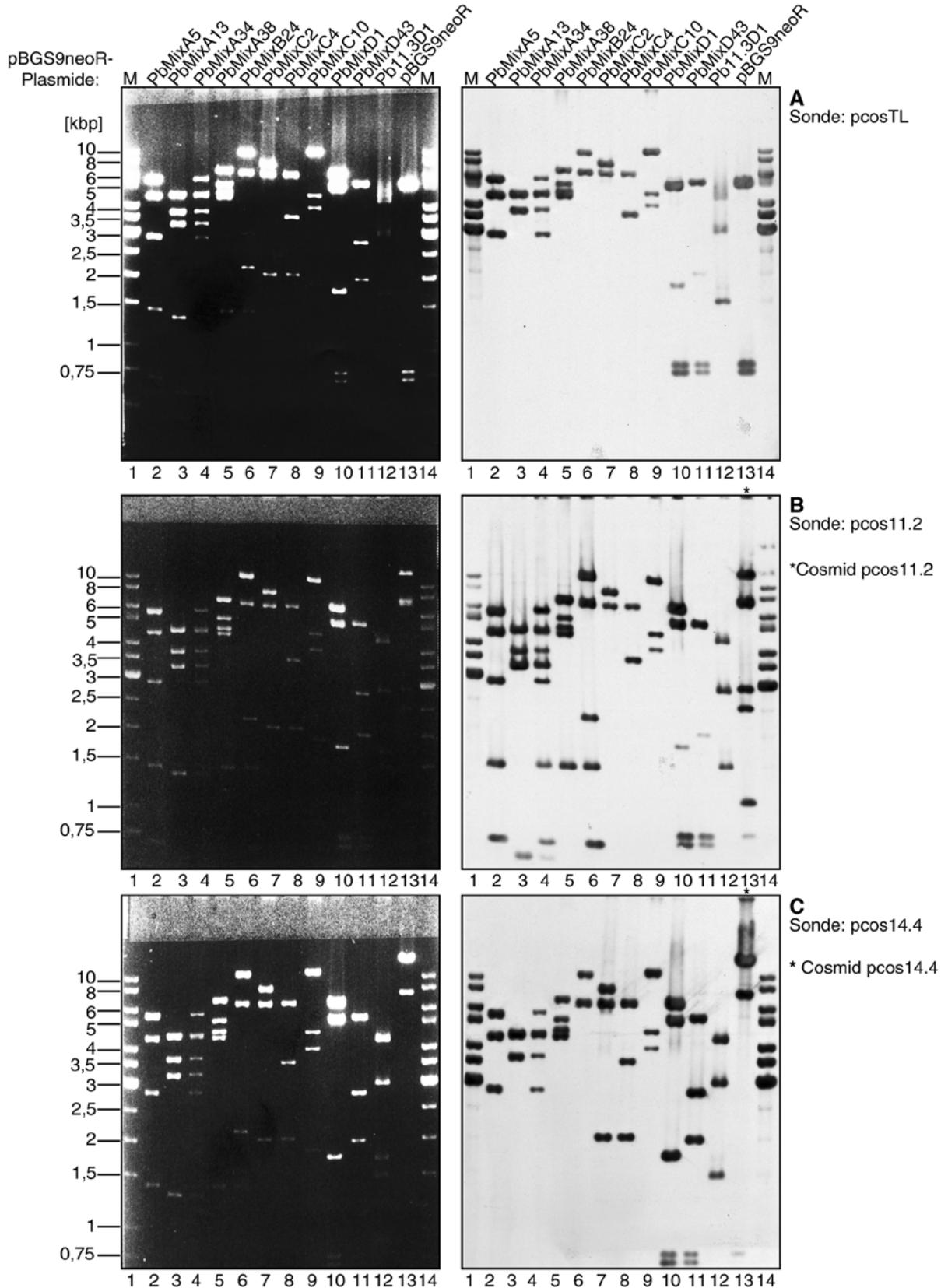


Abbildung 11 (vorherige Seite): Southern-Blot-Analyse zur Ermittlung der Zusammensetzung der nach einer Temperatur-Selektion aus überlebenden Leishmanien isolierten pBGS9neoR/PbMix-Plasmide

Abgebildet sind drei mit Ethidiumbromid gefärbte Agarose-Gele (links) und die Chemiluminogramme (rechts) der entsprechenden Southern-Blot-Analysen.

Ca. 0,5 bis 1 µl mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I (Bahn 2-9) oder *Eco* RI/*Eco* RV (Bahn 10 und 11) behandelte DNA einer Mini-Präparation der über den Bahnen angegebenen Plasmide wurden in den dargestellten 0,7%igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Als Positiv-Kontrollen wurden ca. 400-530 ng des Vektors pBGS9neoR (A: Bahn 13; *Eco* RI/*Eco* RV-Verdau), sowie der Cosmide pcos11.2 (B: Bahn 13; *Eco* RV/*Xba*I-Verdau) und pcos14.4 (C: Bahn 13; *Eco* RV/*Xba*I-Verdau) eingesetzt. Zusätzlich wurde auch das mit *Pst*I verdaute Plasmid pBGS9neoR/Pb11.3D1 (Bahn 12) aufgetragen. Als Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker (M; Bahn 1 und 14). Die Größen und Positionen des DNA-Markers sind an der linken Seite angegeben. Die DNA wurde nach dem Gellauf auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten pcosTL-Sonde (A) bzw. mit einer DIG-markierten Cosmid pcos11.2-Sonde (B) oder mit einer DIG-markierten Cosmid pcos14.4-Sonde (C) über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte mit Hilfe eines anti-DIG-Antikörpers, der mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für das Enzym wurde in die Chemilumineszenzreaktion CSPD eingesetzt und ein Röntgenfilm 30 bis 60 Minuten exponiert.

M199-Medium eingesät und bei 37°C inkubiert. Nach 5, 6, und 8 Tagen wurde den Kulturen Aliquots entnommen und in einen 25 °C-Brutschrank überführt. Die Proliferation überlebender Zellen wurde qualitativ im Durchlicht-Mikroskop verfolgt.

Nach 6 Tagen bei 37°C wuchs der *L. major*-Wildtyp, sowie die Zellen der Ansätze *L. major* [Pb11.3A] und -[Pb11.3C] nicht wieder an. Parasiten der *L. major* [pBGS9neoR]-Kultur überlebten zwar die sechstägige Kultivierung bei 37 °C, jedoch war die Proliferation bei 25°C im Vergleich zu den anderen Ansätzen, insbesondere *L. major* [PbMixA], -[PbMixB], und -[PbMixD], verzögert. *L. major* [PbMixA], und -[PbMixD] zeichneten sich nach der Rückführung der Zellen auf die niedrigere Kultivierungstemperatur im Vergleich zu den anderen Ansätzen durch ein schnelles Anwachsen aus. Nur Zellen dieser beiden Kulturen überlebten die achttägige Inkubation bei 37°C.

Die Plasmid-DNA wurde aus den rekombinanten Leishmanien, die 6 und 8 Tage bei 37°C überlebten, nach dem Erreichen einer ausreichenden Zelldichte isoliert und anschließend in *E. coli* transformiert. Die Plasmid-DNA aus 50 Transformanden je Ansatz wurde isoliert, mit der Restriktionsendonuklease *Sal*I hydrolysiert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Plasmid-Klone in den Ansätzen ist in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgelistet. Da bei der Konstruktion der Plasmid-Genbanken der Vektor und nicht die Cosmid-Fragmente dephosphoryliert wurden, ist es nicht ungewöhnlich, dass die Inserts der Plasmide häufig aus Fragmenten unterschiedlicher Cosmide bestehen. Zudem ist zu erwarten, dass die Inserts von Plasmiden, die nur einem Cosmid zuzuordnen sind, sich auch aus mehreren im Cosmid nicht benachbarten Fragmenten zusammensetzen können.

Die Zuordnung der pBGS9neoR/PbMix-Klone zu den vier Cosmiden wurde durch eine Southern-Blot-Analyse mit Hilfe von DIG-markierten pcos11.2-, pcos11.3-, pcos13.12- und pcos14.4-Sonden bestimmt und ist ebenfalls in der Tabelle angegeben. Die Southern-Blot-Analysen zum Nachweis von pcos11.2- und pcos14.4-Sequenzen, sowie die Kontroll-Hybridisierung mit einer DIG-markierten pcosTL-Sonde sind in Abbildung 11 dargestellt.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, dass die Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und pBGS9neoR/PbMixD1 bereits in den Leishmanien, die 6 Tage bei 37 °C überlebten, am

pBGS9-neoR-Plasmide	6 Tage 37°C [%]	8 Tage 37°C [%]	DIG-pcos11.2-Sonde	DIG-pcos11.3-Sonde	DIG-pcos13.12-Sonde	DIG-pcos14.4-Sonde
PbMixA5	84	100	X			
PbMixA13	12	-	X	X		
PbMixA34	2	-	X	X		
PbMixA38	2	-	X		X	
<u>PbMixB24</u>	100	-	X			
PbMixC2	72	-	X		X	X
PbMixC4	20	-				X
PbMixC10	8	-			X	
PbMixD1	98	100	X			X
PbMixD43	2	-				X
Pb11.3B 1	100	-				
Pb11.3D 1	100	-				

Tabelle 3: Zusammensetzung und prozentuale Verteilung der Plasmid-Spezies in überlebenden Parasiten der *L. major* [PbMix]-Ansätze A, B, C und D bzw. der *L. major* [Pb11.3]-Ansätze B und D, nach einer Temperatur-Selektion bei 37°C für 6 und 8 Tage.

Der Nachweis von Cosmid-Sequenzen mit den angegebenen DIG-markierten Cosmid-Sonden ist gekennzeichnet. Die Plasmide pBGS9neoR/Pb11.3B1 und -Pb11.3D1 entsprechen sich. Das Plasmid pBGS9neoR/PbMixB24 wurde durch Unterstreichen gekennzeichnet. Es wurde aus Leishmanien des Ansatzes *L. major*[PbMixB] isoliert, die im Vergleich zu den Parasiten der anderen Ansätze, die ausschließlich 6 Tage bei 37 °C überlebten, deutlich früher zu proliferieren anfangen. Die für weitere Analysen ausgewählten Plasmide sind durch Fettdruck hervorgehoben.

stärksten vertreten waren und ausschließlich in den Parasiten zu finden waren, die nach 8 Tagen bei 37°C wieder angewachsen sind. Auffällig ist, dass der Anteil an Fragmenten des Cosmids pcos11.2 in den Plasmiden mit 70 % am höchsten ist. Außerdem ist zu bemerken, dass die Inserts zweier Plasmide, pBGS9neoR/PbMixA5 (Abb. 11, Bahn 2) und pBGS9neoR/PbMixB24 (Abb. 11, Bahn5) ausschließlich von Cosmid pcos11.2 stammen. Das Plasmid pBGS9neoR/PbMixB24 wurde zwar aus Leishmanien isoliert, die nur 6 Tage bei 37°C überlebten, jedoch erholten sich die Parasiten dieses Ansatzes wesentlich schneller im Vergleich zu den Zellen der Ansätze, die ausschließlich nach 6 Tagen bei 37 °C noch Wachstum zeigten.

Eine weitere Temperatur-Selektion rekombinanter Leishmanien, die mit den Plasmid-Genbanken einzelner, mit *Mbo* I hydrolysiertes Cosmide transfiziert worden waren, führte zu keinem Ergebnis. Die Parasiten überlebten eine Kultivierung bei 37°C für 5 Tage nicht.

Die Sequenzanalyse der Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und -PbMixD1 wird nachfolgend beschrieben.

3.6.2 Sequenzanalyse der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5

Eine Restriktionsanalyse der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 ergab, dass beide Inserts eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Eco* RI besitzen. Durch Verdau mit *Eco* RI entstehen, wie in dem in Abbildung 12A (Bahn 3 und 9) dargestellten Agarose-Gel zu sehen ist, neben einem Vektor-Fragment (5386 bp) ein großes und ein kleines *Eco* RI-Fragment. Eines dieser Fragmente enthält dabei Anteile des *Bam* HI/*Sal* I-Fragmentes (Abbildung 10). Zur Vorbereitung der Sequenzanalyse (Abb. 12B) wurden die *Eco* RI-Fragmente der Plasmide in den mit *Eco* RI linearisierten und dephosphorylierten Vektor pBluescript II KS+ (pBS) subkloniert. Die entstandenen Konstrukte habe ich als pBS/D1G1, pBSD1K4 bzw. pBSA5G8 und pBSA5K2 bezeichnet. Durch *Nested Deletion*-Abbau mit der Exonuklease III wurden von jedem Plasmid eine Reihe partiell deletierter Subklone hergestellt. Zum Schutz der Vektor-Sequenzen wurden die Plasmide zunächst mit Enzymen linearisiert, die zur Bildung eines 3'-Überhangs führen und somit keinen Angriffspunkt für die Exonuklease III darstellen. Die Enzyme *Kpn* I (pBSD1G1 und -K4) und *Sac* I (pBSD1G1, pBSA5G8 und -K2) waren dafür geeignet, da sie entweder gar nicht in den entsprechenden *Eco* RI-Fragmenten schneiden bzw. *Sac* I nur im kleinen Fragment von pBGS9neoR/PbMixD1 eine Erkennungssequenz besitzt (Abbildung 12 A, Bahn 14). Durch einen weiteren Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RV (pBSD1G1), *Bam* HI (pBSD1G1, pBSA5G8), *Hind* III (pBSD1K4) bzw. *Eag* I (pBSA5K2) wurden 5'-Überhänge nahe des Inserts erzeugt und somit festgelegt, in welcher Richtung der Abbau des Inserts erfolgen sollte. Einzelsträngige Sequenzbereiche wurden im Anschluss an den Exonuklease III-Verdau durch S1-Nuklease abgebaut. Die Plasmid-DNA wurde mit T4-DNA-Ligase religiert. Nach gelelektrophoretischer Analyse der Exonuklease III-Reaktion wurde die religierte Plasmid-DNA geeigneter Ansätze in *E. coli* transformiert und die Transformanten hinsichtlich passender Subklone untersucht. Die Sequenzierung dieser Subklone erfolgte mit dem universellen Primer M13R (3'-Überhang durch *Kpn* I) bzw. M13F (3'-Überhang durch *Sac* I).

Abbildung 12B zeigt eine schematische Darstellung der Inserts der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5, sowie die Vorgehensweise bei der Herstellung der Subklone für die Sequenzierung. Durch Restriktionsanalyse der beiden

Abbildung 12 (nächste Seite): Die Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 - Vorbereitungen zur Sequenzanalyse

A: Die Abbildung zeigt ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel. 300 bis 400 ng der Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und pBGS9neoR/PbMixD1 wurden mit den über den Bahnen angegebenen Enzymen (*E.*=*Eco* RI) verdaut und neben der ungeschnittenen Plasmid-DNA (Bahn 2 und Bahn 8) in dem dargestellten 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Ein 1 kbp-Marker (M; Bahn 1 und 16) diente als DNA-Längenstandard, dessen Größen und Positionen an der linken Seite angegeben sind.

B: Die schematische Darstellung zeigt die Inserts der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 mit einem Teil des Vektors, sowie die Vorbereitung der Plasmide für die Sequenzanalyse. Die zwei *Eco* RI-Fragmente beider Plasmide wurden in den Vektor pBluescript KS+ (pBS) subkloniert. Es entstanden die Plasmide pBS/D1G1 und pBS/D1K4 bzw. die Plasmide pBS/A5K2 und pBS/A5G8, aus denen mit Hilfe der *Nested Deletion*-Methode partiell deletierte Subklone hergestellt wurden. Vor der Hydrolyse mit der Exonuklease III wurden die Plasmide mit den unter den Pfeilen angegebenen Restriktionsendonukleasen behandelt. Die Pfeile geben die Richtung des Exonuklease III-Verdau an. Die ausgewählten Subklone der Plasmide wurden mit den ebenfalls unter den Pfeilen aufgeführten Primern sequenziert.

Die gezeigten Anteile der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBS sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Sequenzen ergab, wurde die parallel zu den beschriebenen Versuchen durchgeführte konkurrierende Selektion rekombinanter *L. major* [pcos]-Stämme im Säugetierwirt (3.4) abgeschlossen. Die Ergebnisse haben den bereits geäußerten Verdacht, dass das Cosmid pcos11.2 *L. major* möglicherweise nicht vorrangig einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen vermittelt, sondern eher einen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten hat (3.3, 3.4), bestärkt. In Anbetracht dessen, dass nach der Temperatur-Selektion der mit den Plasmid-Genbanken transfizierten Leishmanien 70 % der reisolierten Plasmide pcos11.2-Anteile aufwiesen, stellte sich die Frage, ob bei dieser Selektion ein möglicher Wachstumseffekt eine Rolle spielte. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche zum Wachstumsverhalten der rekombinanten Leishmanien sollten eine Antwort auf diese Frage ermöglichen.

Auf die vollständige Zusammensetzung der Inserts von pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 wird in Abschnitt 3.6.4 eingegangen.

3.6.3 Der Einfluss des Cosmids pcos11.2 auf das Wachstum von Leishmanien

Das Cosmid pcos11.2 gehört zu den vier dominierenden Cosmiden, die aus den überlebenden Leishmanien nach der konkurrierenden Temperatur-Selektion eines Gemischs von *L. major* [pcos]-Stämmen isoliert wurden. Im Gegensatz zu den anderen drei Stämmen verringerte sich jedoch der Anteil des *L. m* [pcos11.2]-Stamms mit zunehmender Dauer der Temperatur-Selektion. Außerdem war das Cosmid pcos11.2 um so häufiger vertreten, je öfter die Parasiten für die Isolierung von verwertbarer Cosmid-DNA amplifiziert werden mussten (3.3).

Das Cosmid pcos11.2 vermittelt *L. major* anscheinend keinen Selektionsvorteil im Säugetierwirt. Allerdings wird der Einfluss des Cosmids auf das Wachstum von Promastigoten durch die Tatsache unterstrichen, dass das parallel als *in vitro*-Kontrolle kultivierte Gemisch der Stämme nach 10,5 Wochen ausschließlich den Stamm *L. m* [pcos11.2] enthielt und zwar unabhängig von einem Antibiotika-Selektionsdruck (3.4).

Erste Versuche zum Wachstumsverhalten des *L. m* [pcos11.2]-Stamms wurden mit logarithmischen Promastigoten durchgeführt (nicht dargestellt). Die Wachstumsraten der Kontrollstämme und des *L. m* [pcos11.2]-Stamms wichen allerdings kaum voneinander ab. Aufgrunddessen wurde vermutet, dass das Cosmid pcos11.2 den Übergang von der stationären zur logarithmischen Wachstumsphase beeinflusst.

3.6.3.1 Proliferation der *Leishmania*-Stämme *L. m.* [pcos11.2] und *L. d.* [pcos11.2]

Die Proliferation des *L. major*-Stamms *L. m.* [pcos11.2] sollte mit dem *L. major*-Wildtyp und *L. m.* [pcos8] verglichen werden. Zellen der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase wurden auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in modifiziertem M199-Medium eingestellt und bei 25°C inkubiert. Die Zelldichte der Kulturen wurde täglich bestimmt. Um herauszufinden, ob zusätzliche Kopien der pcos11.2-Sequenzen das Wachstumsverhalten von *L. donovani* beeinflussen, wurden die entsprechenden *L. donovani*-Stämme ebenfalls in den Versuch miteinbezogen.

Ausgehend von logarithmisch wachsenden Promastigoten der verschiedenen Stämme, zeigten sich, wie bei früheren Versuchen, keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 13,

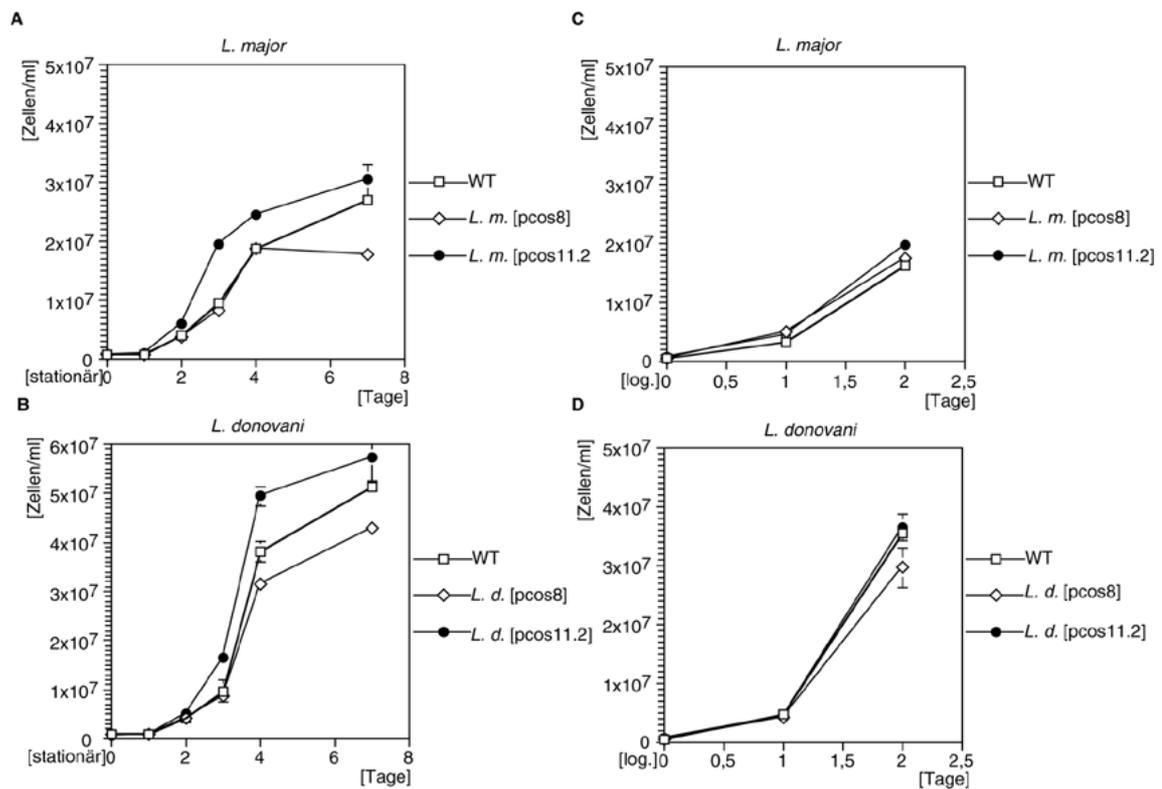


Abbildung 13: Proliferation der *Leishmania*-Stämme *L. m. [pcos11.2]* und *L. d. pcos11.2*

Für einen Vergleich der Proliferation der aufgeführten *L. major* (A, C) und *L. donovani*-Stämme (B, D) wurden Promastigote der stationären (A, B) und der logarithmischen (C, D) Wachstumsphase mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in modifiziertes M199-Medium eingesät und die Zellzahl täglich mit Hilfe eines Zellzählers (CASY1-Cell Counter&Analyzer) bestimmt.

C,D). Nach einem Tag hatte sich die Zelldichte sowohl der *L. major*- als auch der *L. donovani*-Stämme auf das sieben- bis achtfache erhöht. Während die *L. donovani*-Stämme (Abbildung 13 D) diese hohe Wachstumsrate beibehielten, verringerte sich die Wachstumsrate der *L. major*-Stämme. Die Zelldichte stieg um ca. das vierfache.

Mit den stationären Zellen (Abbildung 13, A,B) wurden nicht so hohe Wachstumsraten erreicht. Einen Tag nach dem Einsäen der Zellen erhöhte sich die Zelldichte nur geringfügig. Jedoch war bereits hier die Wachstumsrate von *L. m. [pcos11.2]* etwas höher als die der Kontroll-Stämme (Abbildung 13 A). Der Unterschied war zwischen dem zweiten und dritten Tag am deutlichsten. Die Zelldichte von *L. m. [pcos11.2]* stieg auf das 3,3 fache und war im Vergleich zum Wildtyp (2,4-facher Anstieg) und zu *L. m. [pcos8]* (2,2-facher Anstieg) doppelt bzw. mehr als doppelt so hoch. Abgesehen von den höheren Wachstumsraten war der Wachstumsverlauf von *L. d. [pcos11.2]* ähnlich. Der Unterschied zu den Kontrollstämmen, der bei *L. m. [pcos11.2]* bereits nach zwei Tagen deutlich hervortrat, war bei *L. d. [pcos11.2]* nach zwei Tagen noch nicht sehr ausgeprägt. Nach drei Tagen erreichte die Zelldichte von *L. d. [pcos11.2]* einen nahezu doppelten Wert im Vergleich zum Wildtyp und zu *L. d. [pcos8]* (Abbildung 13 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass es *L. major* durch das Cosmid pcos11.2 ermöglicht wird, schneller aus der stationären in die logarithmische Wachstumsphase überzugehen. Dies erklärt das ausschließliche Vorhandensein des Stamms *L. m. [pcos11.2]* in der *in vitro*-Kontrolle (3.4) nach 10,5 Wochen. Die Mischkultur wurde abwechselnd nach drei und vier

Tagen verdünnt, also mindestens einmal in der Woche, wenn das Verhältnis zu den anderen Stämmen am größten war. Die anderen Stämme des Ansatzes wurden somit im Verlauf der Kultivierung ausverdünnt.

Auch auf *L. donovani* übt das Cosmid pcos11.2 eine Wachstums-beschleunigende Wirkung aus, wenn die rekombinanten Parasiten sich zuvor in der stationären Phase befanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt Gendosis-abhängig ist.

3.6.3.2 Stabilität der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 in *L. major* bei fehlender Antibiotika-Selektion

Das Cosmid pcos11.2 hat sich in *L. major* auch ohne Antibiotika-Selektion als stabil erwiesen. Möglicherweise enthalten die pcos11.2-Anteile der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 die Gene, die für das Wachstum von *L. major*-Promastigoten von Vorteil sind.

Um zu untersuchen, ob diese Plasmide auch ohne einen Antibiotika-Selektionsdruck in *L. major* erhalten bleiben, wurden die Stämme *L. m.* [PbMixD1] und *L. m.* [PbMixA5], sowie die Kontroll-Stämme, ca. 10 Wochen in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin bei 25°C kultiviert. Mit Hilfe einer *limiting dilution*-Analyse, wobei die serielle Verdünnung jeweils eines Aliquots der Zellkulturen in modifiziertem M199-Medium sowohl ohne als auch mit Geneticin erfolgte, wurde der Anteil resistenter Parasiten bestimmt. Die Auswertung der *limiting dilution*-Analyse ist in Abbildung 14 dargestellt. Beide Plasmide sind, wie auch das Cosmid pcos11.2, in den Parasiten vollständig erhalten geblieben, während insbesondere die *L. major*-Stämme

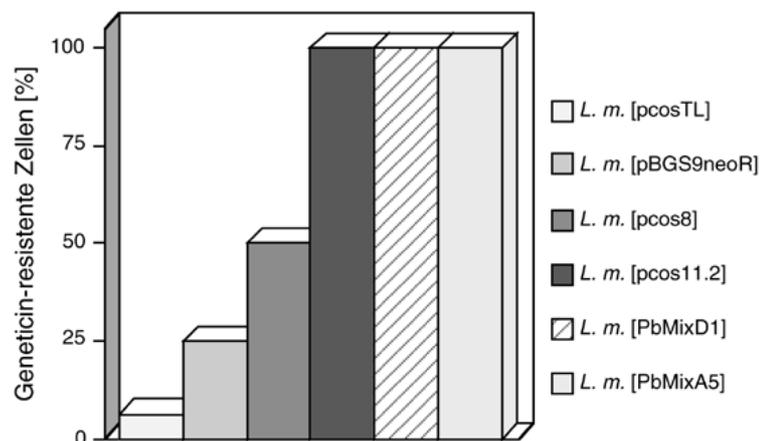


Abbildung 14: Analyse der Stabilität der Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und pBGS9neoR/PbMixD1 in *L. major*

Die graphische Darstellung zeigt die Auswertung einer *limiting dilution*-Analyse. Die *L. major*-Stämme *L. m.* [PbMixD1] und *L. m.* [PbMixA5] wurden ca. 10 Wochen in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin bei 25 °C kultiviert und während dieser Zeit zweimal wöchentlich 1:20 verdünnt. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen, in denen die episomale DNA erhalten geblieben ist, wurde die Zelldichte der Kulturen auf $1,66 \times 10^3$ Zellen/ml eingestellt und jeweils ein Aliquot der Kulturen in modifiziertem M199-Medium ohne Geneticin bzw. mit Geneticin in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt und anschließend drei Wochen bei 25°C inkubiert. Die Anzahl überlebender Parasiten wurde bestimmt und aus den Daten der prozentuale Anteil rekombinanter Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen berechnet. Der *L. major*-Stamm *L. m.* [pcos11.2] diente als Positiv-Kontrolle, während die Stämme *L. m.* [pcosTL] und *L. m.* [pBGS9neoR] als Negativ-Kontrollen eingesetzt wurden.

mit den Vektor-Plasmiden (*L. m.* [pcosTL] und *L. m.* [pBGS9neoR]) einen erheblichen Anteil der Plasmide verloren haben.

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 tatsächlich die pcos11.2-Sequenzen enthalten, die für *L. major* in der Flüssigkultur einen starken Selektionsvorteil darstellen.

3.6.3.3 Selektion von *L. major*[PbMix] und *L. major*[Pb11.2] bei 25°C

Der *L. major*-Stamm *L. m.* [pcos11.2] hat sich in einer Mischkultur gegenüber anderen Stämmen durchgesetzt. Dementsprechend sollte es möglich sein, rekombinante Leishmanien, die mit einer Plasmid-Genbank des Cosmids pcos11.2 transfiziert wurden, in analoger Weise zu selektieren. Die nachfolgend aus den Parasiten isolierten Plasmide enthalten dann voraussichtlich die für den Wachstumseffekt verantwortlichen Sequenzen.

L. major wurde mit der Cosmid pcos11.2-Plasmid-Genbank (*L. major* [Pb11.2]) bzw. mit der Plasmid-Genbank, die aus dem Gemisch der vier Cosmide pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 (*L. major* [PbMix]) hergestellt wurde, transfiziert. Die rekombinanten Parasiten

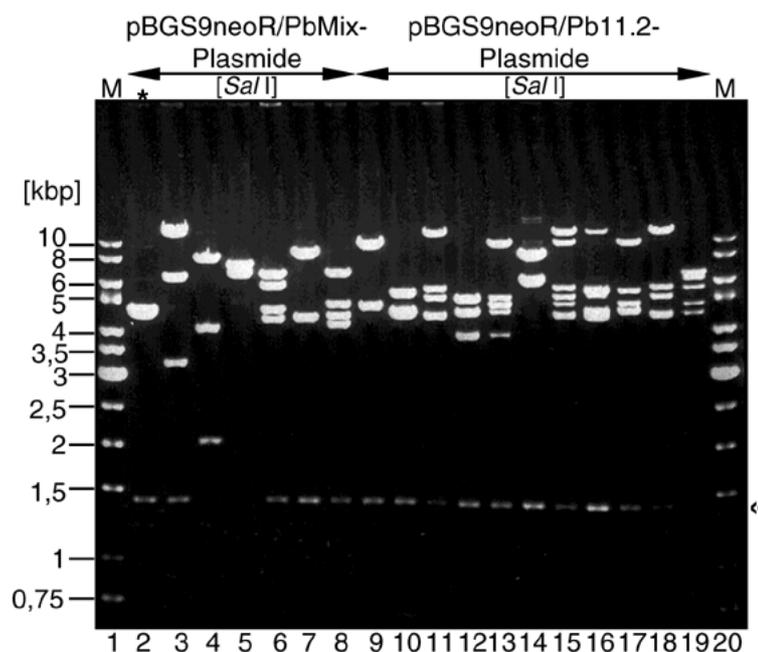


Abbildung 15: Aus Leishmanien reisolierte pBGS9neoR-Plasmide nach einer ca. 12-wöchigen Kultivierung bei 25°C

Abgebildet ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel. Mit pBGS9neoR/PbMix-Plasmid-Genbank-DNA oder mit pBGS9neoR/Pb11.2-Plasmid-Genbank-DNA transfizierte Leishmanien wurden ca. 12 Wochen bei 25°C kultiviert und im Verlauf dieser Zeit zweimal wöchentlich 1:20 verdünnt. Aus den Parasiten wurde nachfolgend die episodale DNA reisoliert und die Verteilung unterschiedlicher Plasmide untersucht. Das dargestellte 0,7 %igen Agarose-Gel zeigt die Auftrennung einer Auswahl der isolierten Plasmide nach einem *Sal*I-Verdau von jeweils 1 µl Plasmid-DNA einer Mini-Präparation. Als DNA-Längenstandard (M, Bahn 1 und Bahn 20) wurde ein 1 kbp-Marker eingesetzt, dessen Größen und Positionen an der linken Seite angegeben sind. Der Doppelpfeil an der rechten Seite kennzeichnet ein DNA-Fragment, das die meisten isolierten Plasmide nach einem *Sal*I-Verdau aufwiesen. Mit einem Stern (Bahn 2) ist ein Plasmid gekennzeichnet, das auch aus rekombinanten Leishmanien nach einer Selektion bei 37°C isoliert wurde und dem Plasmid pBGS9neoR/PbMixD1 entspricht.

wurden ca. 12 Wochen in modifiziertem M199-Medium jeweils mit und ohne Geneticin bei 25°C kultiviert und während dieser Zeit zweimal wöchentlich verdünnt. Aus den Zellen wurde nachfolgend die Plasmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Durch eine Restriktionsanalyse von 50 Transformanten pro Ansatz mit dem Enzym *Sal* I wurde die Verteilung der Plasmide bestimmt. Das in Abbildung 15 dargestellte Agarose-Gel zeigt eine Auswahl der isolierten Plasmide. Da die Plasmide nicht weiter analysiert wurden, möchte ich nicht im Einzelnen auf die Verteilung eingehen. Erwähnt sei jedoch, dass die gleichen Plasmide, die in den Ansätzen mit Geneticin am stärksten vertreten waren auch in den entsprechenden Ansätzen ohne Antibiotikum am häufigsten vorkamen. Auffällig ist, dass die meisten Plasmide nach einem *Sal* I-Verdau ein knapp 1500 bp großes Fragment aufweisen und Plasmide, denen dieses Fragment fehlt (Bahn 4 und 5) nur vereinzelt auftraten.

Auch die Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 besitzen dieses Fragment (nicht dargestellt bzw. Abb. 11, Bahn 2).

Das in Bahn 2 aufgetragene Plasmid (*) war in einem Ansatz zu 98% vertreten. Durch die Restriktionsanalyse mit anderen Enzymen wurde deutlich, dass dieses Plasmid pBGS9neoR/PbMixD1 entspricht (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Selektion bestätigen nochmals, dass pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 die Sequenzen enthalten, die *L. m.* [pcos11.2] ermöglichen, schneller aus der stationären in die logarithmische Wachstumsphase zu gelangen. Außerdem erscheint es wahrscheinlich, dass ein für den Wachstumseffekt verantwortliches Gen in der Nähe des konservierten *Sal* I-Fragments zu suchen ist.

3.6.3.3.1 Sequenzanalyse des 1442 bp großen *Sal* I-Fragments

Für die Sequenzanalyse wurde das *Sal* I-Fragment aus pcos11.2 und auch aus pBGS9neoR/PbMixD1 in den mit *Sal* I linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektor pBluescript KS(+) subkloniert. Das Fragment wurde daraufhin mit den Primern M13F und M13R von beiden Seiten sequenziert. Ein Sequenzvergleich bestätigte, dass es sich um gleiche Sequenzen handelt. Die Sequenz des Fragments wurde mit Hilfe von Sequenzier-Oligonukleotiden, die nahe der Enden der bekannten Sequenzen hybridisierten, vervollständigt. Zudem wurden in entsprechender Weise die dem Fragment im Cosmid pcos11.2 bzw. in pBGS9neoR/PbMixD1 benachbarten Sequenzen ermittelt.

Zusammen mit den im Rahmen der Sequenzanalyse der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 erhaltenen Sequenzen, aus denen zunächst keine überzeugenden offenen Leserahmen abgeleitet werden konnten, war es möglich ein Contig zu bilden, das einen 950 bp umfassenden offenen Leserahmen enthält, welcher für ein hypothetisches Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 33485 Da kodiert. Allerdings handelt es sich um ein unbekanntes Protein, das damals keine Homologien zu den in den Datenbanken aufgeführten Proteinen zeigte und auch nach neueren Vergleichen nur eine signifikante Übereinstimmung mit dem entsprechenden hypothetischen Protein aus *L. major* besitzt.

3.6.4 Die Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5: Temperatur-Toleranz und/oder Wachstumseffekt?

Die vollständige Zusammensetzung der Inserts von pBGS9neoR/PbMixD1 und

pBGS9neoR/PbMixA5 ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Sie konnte nach dem Abschluss der Sequenzierung der Cosmide (3.9) anhand der Sequenzen, die aus der Sequenzanalyse der Plasmide und des *Sau* I-Fragments resultierten, abgeleitet werden.

Der pcos11.2-Anteil von pBGS9neoR/PbMixD1 enthält neben dem unter 3.6.3.3.1 erwähnten offenen Leserahmen (2) einen weiteren 773 bp großen offenen Leserahmen (1), der für ein putatives Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 28835 Da kodiert.

Das entsprechende *Sau* 3AI-Fragment in pBGS9neoR/PbMixA5 liegt in umgekehrter Orientierung vor und ist etwas kleiner. Der ORF1 aus diesem Bereich ist daher nicht vollständig auf dem Fragment enthalten.

Beiden Plasmiden ist der ORF2 gemeinsam. Es ist wahrscheinlich, dass das hypothetische 33485 Da-Protein für den von pcos11.2 vermittelten Wachstumseffekt verantwortlich ist. Weitere Versuche sind zur Bestätigung dieser Hypothese erforderlich, die jedoch aufgrund eines fehlenden thematischen Zusammenhangs nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

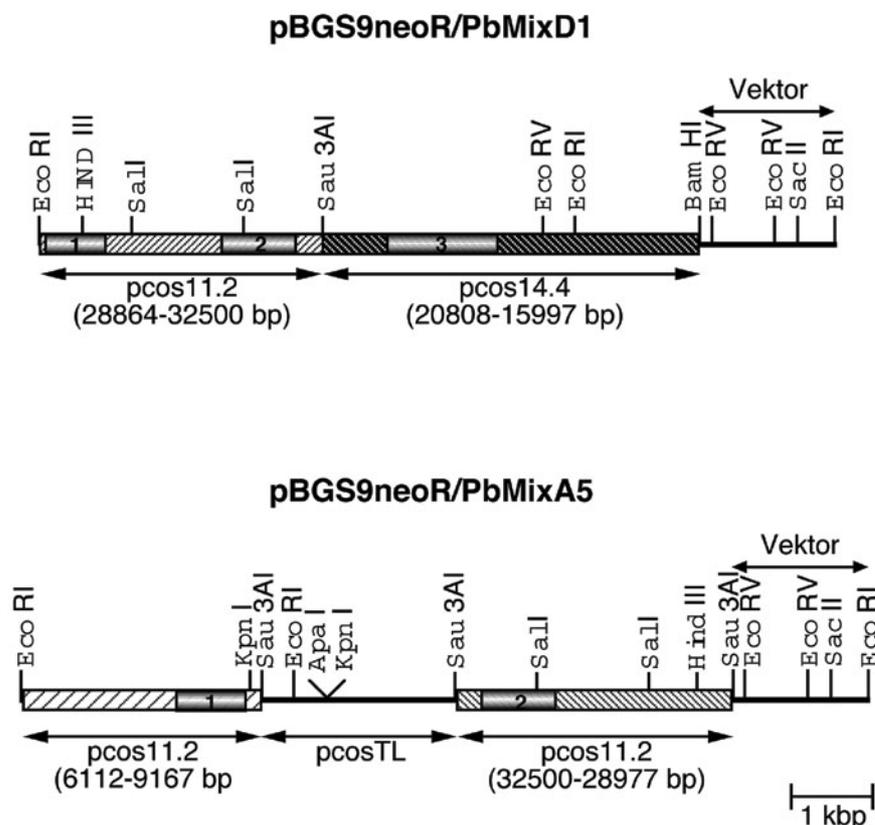


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Inserts der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5

Dargestellt ist die Zusammensetzung der Inserts der Plasmide pBGS9neoR/PbMixD1 und pBGS9neoR/PbMixA5 aus den *Sau* 3AI-Fragmenten der angegebenen Cosmide bzw. des Cosmid-Vektors pcosTL. Die Positionen, die diese Fragmente in den Cosmiden einnehmen sind aufgeführt. Putative ORF sind grau unterlegt und nummeriert.

pBGS9neoR/PbMixD1

1 (pcos11.2): 28933-29706 bp/28835 Da

2 (pcos11.2): 31207-32157 bp/33485 Da

3 (pcos14.4): 18557-19978 bp/52046 Da

pBGS9neoR/PbMixA5

1 (pcos11.2): 8084-8971 bp/33249 Da

2 (pcos11.2): 31207-32157 bp/33485 Da

Das Cosmid pcos11.2 wurde im Verlauf einer Temperatur-Selektion isoliert. Auch *L. major*-Promastigote, die mit pBGS9neoR/PbMixD1 bzw. pBGS9neoR/PbMixA5 transfiziert waren, gingen aus einer Temperatur-Selektion hervor und überlebten immerhin 8 Tage bei ca. 37°C. Es müssen also auf dem Cosmid bzw. auf den Plasmiden auch Sequenzen vorhanden sein, die den Leishmanien ermöglichen nicht-permissiven Temperaturen zu widerstehen. Das Insert des Plasmids pBGS9neoR/PbMixA5 setzt sich neben einem Fragment aus dem Cosmid-Vektor pcosTL nur aus pcos11.2-Sequenzen zusammen. Neben dem bereits erwähnten Fragment, das auch in pBGS9neoR/PbMixD1 enthalten ist, sind Sequenzen vorhanden, die im pcos11.2-Insert am entgegengesetzten Ende liegen und einen offenen Leserahmen (1; 887 bp) aufweisen, der für ein hypothetisches Protein von 33249 Da kodiert. Das aus dem Cosmid pcos14.4 stammende Fragment des pBGS9neoR/PbMixD1-Inserts enthält ebenfalls einen offenen Leserahmen (3; 1421 bp), der für ein hypothetisches Protein von 52046 Da kodiert. Denkbar ist, dass diese Proteine Temperatur-Toleranz-vermittelnde Eigenschaften besitzen, jedoch wurde dies nicht weiter untersucht. Die Cosmide pcos11.2 und pcos14.4 wurden aus rekombinanten Leishmanien nach einer Mauspassage (3.4) nicht bzw. nur vereinzelt reisoliert und scheinen den Parasiten im Säugetierwirt keinen Selektionsvorteil zu vermitteln. Ein Zusammenhang von Temperatur-Toleranz und Tropismus ist daher bezüglich dieser Proteine kaum vorstellbar.

Im Weiteren wurden die Cosmide pcos8 und pcos13.12 näher analysiert, die beide nach der konkurrierenden Selektion der *L. major* [pcos-Stämme] im Säugetierwirt in den aus der Milz reisolierten Leishmanien vorrangig vertreten waren. Während jedoch pcos8 *L. major* anscheinend keinen stark ausgeprägten Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verleiht, gehörte *L. major* [pcos13.12] auch nach der konkurrierenden Temperatur-Selektion *in vitro* zu den vier dominierenden Stämmen.

Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist, mit Hilfe einer Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8 die für den Selektionsvorteil im Säugetierwirt verantwortlichen Sequenzen einzugrenzen (3.8). Da die Auswertung dieses Versuchs durch die Kenntnis der Sequenz des Cosmids erheblich erleichtert wird, wurde parallel mit der Sequenzierung von pcos8 begonnen (3.9).

3.8 Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8

Die Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8 wurde mit dem GPS™-1 System (*Genome Priming System*, New England Biolabs) durchgeführt, das auf dem bakteriellen Transposon Tn7 basiert. Tn7 ist mit 14 kb ein relativ langes Transposon, das die Transpositions-Gene *tns ABCDE*, Antibiotika-Resistenz-Gene, sowie die für die Transposition wichtigen *cis*-aktiven Sequenzen an den Enden des Transposons, umfasst (Craig, 1996). Das GPS™-1 System verwendet ein Donor-Plasmid (pGPS2), das ein 1375 bp großes mobiles Element mit den linken (ca. 150 bp) und rechten (ca. 100 bp) Seitensequenzen von Tn7 und einem Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*, Chloramphenicol-Transacetylase) enthält. TnsA+B katalysieren die für die Transposition erforderlichen Rekombinationsereignisse und bilden somit die Tn7-Transposase, deren Aktivität durch die Proteine TnsC, TnsD und TnsE, sowie durch die Ziel-DNA moduliert wird. TnsC ist ein ATP-abhängiges, unspezifisches DNA-Bindungsprotein, das allerdings nicht fähig ist, alleine die Transposition zu aktivieren (Craig, 1996). Jedoch wird bei der *in vitro*-Transposition mit dem GPS™-1 System eine TnsC-Mutante (TnsC*) eingesetzt, welche die TnsA+B-Transposase auch in Abwesenheit von

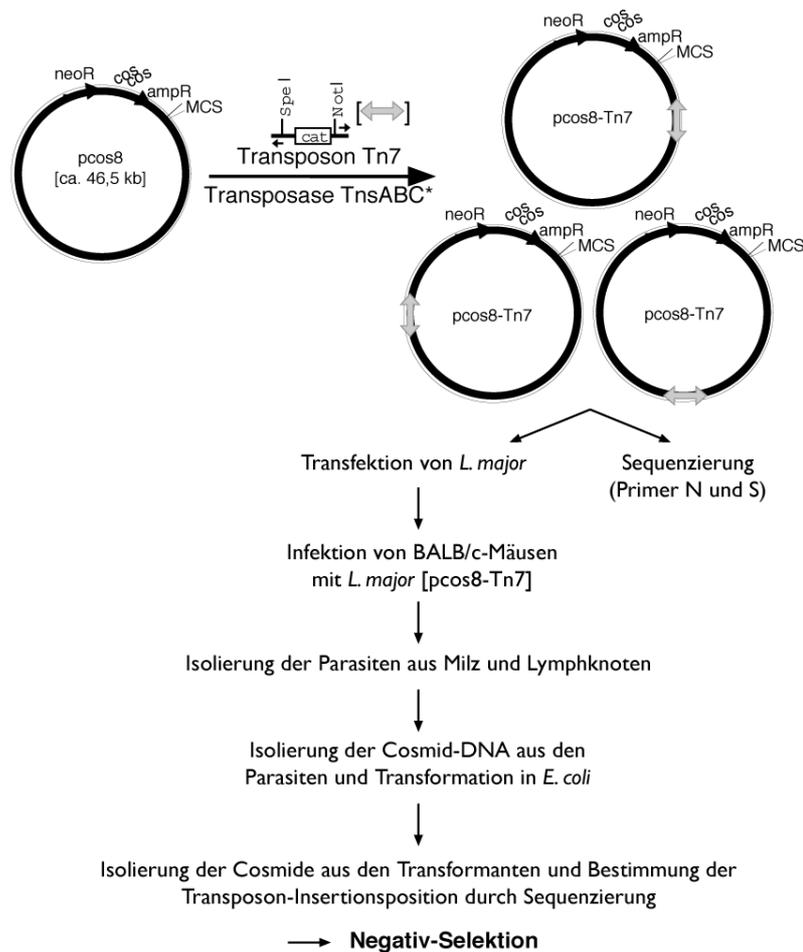


Abbildung 17: Transposon-Mutagenese des Cosmids pcos8

Schematische Darstellung der Herstellung von pcos8-Derivaten mit Tn7-Insertionen, die einerseits für die Sequenzierung genutzt werden sollten und für eine Negativ-Selektion zur Eingrenzung der pcos8-Sequenzen, die *L. major* einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt vermitteln. Die Pfeile am Transposon symbolisieren die Bindungsstellen der Sequenzier-Oligonukleotide S bzw. N.

TnsD oder TnsE, und somit unabhängig von der Sequenz der Ziel-DNA, aktivieren kann (Stellwagen *et al.*, 1997a).

Um eine Population von pcos8-Derivaten mit Transposon-Insertionen herzustellen, wurde das Cosmid, wie unter 2.2.19 beschrieben, mit dem Transposon-Donor-Plasmid pGPS2 und den Proteinen TnsABC* inkubiert. Die Gegenwart eines Transposons in einem Ziel-DNA-Molekül verhindert die Integration zusätzlicher Transposons (Stellwagen *et al.*, 1997b), so dass, wie in Abbildung 17 schematisch dargestellt ist, die resultierenden pcos8-Tn7-Cosmide jeweils nur ein Transposon enthalten dürften.

Einerseits sollten die pcos8-Tn7-Cosmide für die Sequenzanalyse von pcos8 genutzt werden (3.9). Das Transposon besitzt an den Enden Bindungsstellen für die Primer S bzw. N, so dass eine Sequenzierung der Cosmid-DNA im Bereich der Integrationsposition des Transposons möglich ist. Geht man von einer zufälligen Verteilung der Transposon-Insertionen aus, wäre es somit möglich einen großen Bereich der Cosmid-Sequenz zu erfassen.

Andererseits sollten die pcos8-Tn7-Derivate im Rahmen einer Negativ-Selektion zur Eingrenzung der für den Selektionsvorteil im Säugetierwirt verantwortlichen Sequenzen

eingesetzt werden. Durch die Integration eines Transposons in die kodierenden oder für die Expression wichtigen Bereiche eines Gens kann dieses inaktiviert werden. Dementsprechend wäre im Verlauf einer Mauspassage eine Selektion solcher Parasiten zu erwarten, die Transposons in Bereichen aufweisen, die keinen Selektionsvorteil im Säugetierwirt vermitteln, so dass ein Rückschluss auf essentielle Gene möglich sein sollte.

Nach der *in vitro*-Transposition wurde die DNA durch Elektroporation in *E. coli* transformiert, um eine möglichst hohe Anzahl an Transformanden zu erhalten. Ein Gemisch von ca. 5000 Transformanden diente zur Isolierung der pcos8-Tn7-DNA, mit der *L. major*-Promastigote transfiziert wurden. Mit den rekombinanten Leishmanien wurden BALB/c-Mäuse infiziert. Spätestens 10 Wochen nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, Lymphknoten und Milzen entnommen und die Organ-Homogenisate zur Amplifikation von Promastigoten in modifiziertem M199-Medium mit Geneticin aufgenommen. Die aus den Parasiten reisolierte pcos8-Tn7-DNA wurde in *E. coli* transformiert und die pcos8-Derivate der Transformanden mit den Primern N und S sequenziert, um die jeweilige Position des Transposons in pcos8 zu bestimmen.

Die Sequenzanalyse von pcos8 mit Hilfe der pcos8-Tn7-Cosmide lieferte nur einen begrenzten Teil an Sequenz-Informationen. Die Integration der Transposons in das Cosmid-Insert schien relativ gleichmäßig erfolgt zu sein. Die Analyse der 5 bp umfassenden Sequenz der Insertions-Position, die im Verlauf der Integration des Transposons dupliziert wird (Craig *et al.*, 1996), ließ keine Neigung zu einer bestimmten Ziel-Sequenz erkennen. Der Anteil der Cosmide mit einer Transposon-Insertion innerhalb des Vektors lag jedoch bei 38%, was in Anbetracht dessen, dass der Vektor ca. 1/5 der gesamten Sequenz ausmacht, überdurchschnittlich hoch ist.

Die nach der Mauspassage aus den Leishmanien der Lymphknoten und insbesondere der Milzen isolierten pcos8-Tn7-Cosmide, die zur Bestimmung der Transposon-Position sequenziert wurden, wiesen hauptsächlich Transposon-Insertionen innerhalb des Vektors und innerhalb repetitiver Sequenzen ohne kodierende Bereiche auf.

Die pcos8-Sequenzen, die den Parasiten im Säugetierwirt einen Selektionsvorteil vermitteln, ließen sich somit anhand dieser Methode nicht effektiv eingrenzen. Nach Abschluss der Sequenzanalyse der Cosmide, wurden letztendlich nach der Subklonierung der offenen Leserahmen aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12 vergleichende Untersuchungen durchgeführt, um zu ermitteln, welche Gene für *L. major* bei hohen Temperaturen bzw. im Säugetierwirt von Vorteil sind (3.10).

3.9 Sequenzanalyse der Cosmide pcos8, pcos11.3, pcos13.12, pcos14.4 und pcos11.2

Die Sequenzanalyse der Cosmide wurde mit pcos8 begonnen, wobei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen.

Das Cosmid wurde nach der Entfernung der Vektor-Sequenzen durch einen *Eco* RV/*Xba* I-Doppelverdau zunächst einem vollständigen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Taq* I unterzogen. Die resultierenden Fragmente waren nicht größer als 2000 bp und der Hauptteil der Fragmente lag zwischen 250 und 750 bp. Die Fragmente wurden in den mit *Bsp* DI linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektor pBluescript KS(+) subkloniert. Die Inserts der Plasmide zufällig ausgewählter Klone wurden mit den Primern M13F und M13R sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Datenbank-Vergleiche hinsichtlich bestehender Homologien zu bekannten Proteinen analysiert. Die Ergebnisse wiesen auf das Vorhandensein von offenen Leserahmen in pcos8 hin, die für zwei bekannte Proteine (Delta-Adaptin und eine RNA-Helicase mit einem DEAD-Motiv) kodieren.

Mit Hilfe des GPS™-1 Systems (*Genome Priming System*, New England Biolabs) wurden, wie bereits erwähnt (3.8), im Verlauf einer *in vitro*-Transpositions-Reaktion pcos8-Derivate mit Transposon-Insertionen hergestellt. Nach der Elektroporation wurden die pcos8-Tn7-Cosmide der Transformanten mit den Primern S und N, die am linken bzw. rechten Ende des Transposons binden, sequenziert. Aufgrund der häufigen Integration der Transposons in den Vektoranteil des Cosmids (3.8), konnte mit dieser Methode nicht die gesamte Sequenz des Inserts erfasst werden. Es war jedoch möglich aus überlappenden Sequenzen Contigs zu bilden, in die nun teilweise auch die Sequenzen der nicht überlappenden *Taq* I-Fragmente eingefügt werden konnten. Anhand von Primern, die an den Enden der jeweiligen Contigs binden, wurden die Sequenzen in beide Richtungen fortlaufend erweitert. Außerdem wurden die an den Vektor grenzenden Sequenzen des Cosmid-Inserts mit Hilfe der Primer M13R und CH1 bzw. CH2 ermittelt und diese Sequenzen in entsprechender Weise erweitert. Auf diese Weise wurde die vollständige Sequenz der für die Proteine Delta-Adaptin und RNA-Helicase (DEAD-Motiv) kodierenden offenen Leserahmen erhalten, sowie ein Teil eines offenen Leserahmens, der für eine mutmaßliche DSP (*Dual Specificity Phosphatase*) kodiert.

Die Sequenzierung des Cosmids pcos8, sowie der Cosmide pcos11.3, pcos13.12, pcos14.4 und pcos11.2 wurde letztendlich am Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) in Jena unter der Leitung von Dr. M. Schilhabel abgeschlossen.

Die Cosmid-Sequenzen wurden nach möglichen offenen Leserahmen durchsucht. Seit kurzem ist bekannt, dass die Gene auf den bisher sequenzierten *Leishmania* Chromosomen in großen polycistronische Einheiten (*cluster*) organisiert sind, wobei viele Gene nebeneinander auf dem gleichen DNA-Strang liegen (Myler *et al.*, 1999; Myler *et al.*, 2000). Daher konnte sich die Suche auf drei Leseraster beschränken und es wurden entsprechend nur offene Leserahmen akzeptiert, welche die gleiche Orientierung aufweisen, wie solche, die für putative Proteine kodieren, die Homologien zu bekannten Proteinen in den Datenbanken aufweisen.

Abbildung 18 zeigt die schematische Darstellung der Cosmid-Inserts und einen Ausschnitt der Ergebnisse der Datenbankrecherche, die mit den aus den offenen Leserahmen abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen erzielt wurden.

Die Sequenz des pcos8-Inserts ist nicht vollständig. Aufgrund von repetitiven Sequenzen, insbesondere im Bereich des dritten offenen Leserahmens und am Ende des zweiten Contigs, war es nicht möglich mehr Informationen zu erhalten. Hinsichtlich der Orientierung des Inserts ist zwar eindeutig, dass der Anfang des 9793 bp-Contigs an die multiple Klonierungsstelle des Cosmid-Vektors pcosTL grenzt, jedoch ist der Übergang des Inserts in den Vektor-Anteil jenseits der *Bam* HI-Schnittstelle unklar. Die ersten 1093 bp des zweiten Contigs, die auch den 605 bp umfassenden offenen Leserahmen 3 enthalten, stimmen mit den letzten 1093 bp des ersten Contigs überein. Andererseits reichen die Sequenzen einiger pcos8-Tn7-Cosmide in den Anfangsbereich des zweiten Contigs und in den 3' von der *Bam* HI-Schnittstelle gelegenen Vektor-Anteil. Wenn in dem Bereich tatsächlich das Ende des pcos8-Inserts lokalisiert sein sollte, muss das zweite Contig in umgekehrter Richtung orientiert sein, und eine zusätzliche Kopie der RNA-Helicase läge in einer anderen polycistronischen Einheit, oder die angegebene Orientierung des Contigs ist richtig, aber der gesamte Bereich liegt zusätzlich als

invertierte Sequenzwiederholung vor, wobei diese in *pcos8* nur das 3' Ende des ORF 3 enthält. Dafür spräche, dass das 3' Ende des zweiten Contigs tatsächlich eine 615 bp große invertierte Sequenzwiederholung aufweist, die mit intergenischen Sequenzen beginnt und mit 384 bp des 3' Endes vom ORF 5 endet.

Die Sequenz der anderen Cosmid-Inserts liegt vollständig (*pcos11.3*, *pcos14.4*, *pcos11.2*)

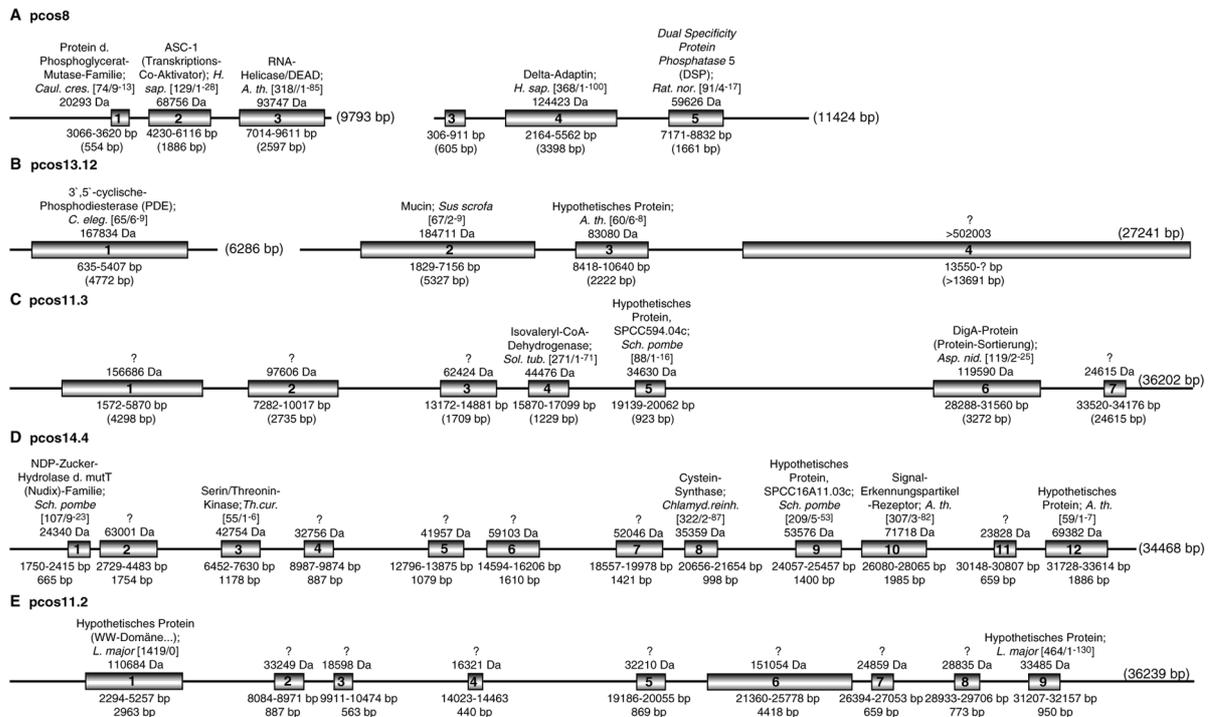


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Inserts der Cosmide *pcos8*, *pcos13.12*, *pcos11.3*, *pcos14.4* und *pcos11.2*

Die Inserts der Cosmide *pcos8* (A), *pcos13.12* (B), *pcos11.3* (C), *pcos14.4* (D) und *pcos11.2* (E) sind schematisch dargestellt. Am 5'-Ende befindet sich jeweils der Übergang zur multiplen Klonierungsstelle des Cosmid-Vektors *pcosTL*, während sich an das 3'-Ende die Vektor-Sequenzen jenseits der *Bam* HI-Schnittstelle (Neomycin-Phosphotransferase-Gen flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Trypanosoma cruzi*) anschließen (Ausnahme *pcos8*: siehe Text). Die Größe der Inserts bzw. der Insert-Anteile sind rechts in bp angegeben. Putative offene Leserahmen wurden durch Kästchen symbolisiert. Größe und Positionen der offenen Leserahmen im Insert, sowie das errechnete Molekulargewicht der abgeleiteten Aminosäuresequenz sind in bp bzw. in Da angegeben. Die bei der Datenbank-Recherche mit Hilfe des BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Programms des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ermittelten Proteine, die Homologien zu den putativen Proteinen aufweisen sind über den offenen Leserahmen aufgeführt. Die Werte innerhalb der eckigen Klammern geben dabei das Ausmaß [*score (bits)*] der Sequenz-Übereinstimmung an und die Wahrscheinlichkeit (*Expectation value*), mit der in der Datenbank eine nicht-verwandte oder zufällige Sequenz vorhanden ist, die eine ähnliche oder bessere Übereinstimmung mit der zu untersuchenden Sequenz aufweist. Ein hoher *score value* und ein kleiner *E. value* weisen auf eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit hin (Peri, S. et al. 2001). Die von den mit einem Fragezeichen gekennzeichneten offenen Leserahmen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten entweder keine Homologie zu Proteinen aus der Datenbank (*pcos11.3*: ORF 1, 2, 7; *pcos14.4*: ORF 2, 5, 11; *pcos11.2*: ORF 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) oder die Übereinstimmung wiesen einen *score (bits)* unter 50 und einen *E value* über 10^{-6} auf.

(*A. th.*=*Arabidopsis thaliana*; *Asp. nid.*=*Aspergillus nidulans*; *C. eleg.*=*Caenorhabditis elegans*; *Caul. cres.*=*Caulobacter crescentus*; *Chlamyd. reinh.*=*Chlamydomonas reinhardtii*; *H. sap.*=*Homo sapiens*; *Rat. nor.*=*Rattus norvegicus*; *Sch. pombe*=*Schizosaccharomyces pombe*; *Sol. tub.*=*Solanum tuberosum*; *Th. cur.*=*Thermomonospora curvata*)

bzw. fast vollständig (pcos13.12) vor. Das pcos13.12-Insert umfasst nicht das Ende des vierten offenen Leserahmens. Eine Vielzahl der insbesondere auf den Cosmiden pcos11.3, pcos 14.4 und pcos11.2 kodierten putativen Proteine weisen keine oder nur geringfügige Homologien zu bekannten Proteinen in der Datenbank auf.

Mit ca. 62 bis 63% ist das *Leishmania*-Genom und insbesondere die Protein-kodierenden Sequenzen relativ G/C-reich. Eine Ausnahme bilden die kodierenden Sequenzen der rDNA-Einheit, die bei *L. major* Friedlin nur einen G/C-Gehalt von 50,6% aufweisen (Alvarez et al., 1994; Martinez-Calvillo et al., 2001). Bezüglich des Cosmids pcos11.2 fiel der geringe G/C-Gehalt der Sequenz von 53,3% auf. Nur drei der angegebenen ORF (3, 6, 9) haben einen GC-Gehalt von 63% bis 64%. Mit 56,2% und 57,5% ist der G/C-Gehalt der ORF1- und ORF2-Sequenz noch relativ hoch, jedoch liegt der G/C-Gehalt der anderen ORF nur bei ca. 50 bis 51% und es muss in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise nicht alle angegebenen ORF tatsächlich auch Protein-kodierende Sequenzen sind.

3.10 Bestimmung der Gene die *L. major* [pcos13.12] und *L. major* [pcos8] einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen und/oder im Säugetierwirt verleihen

Es war nicht möglich, die für einen Selektionsvorteil verantwortlichen Cosmid-Sequenzen mit Hilfe von Plasmid-Genbanken der Cosmide oder durch Transposon-Mutagenese einzugrenzen. Daher sollten die Gene des Cosmids pcos8 bzw. des Cosmids pcos13.12 einer vergleichenden Analyse unterzogen werden. Nach Erhalt der Cosmid-Sequenzen wurden die offenen Leserahmen in den Vektor pIR(mcs2-) subkloniert, der eine Überexpression in *Leishmania* erlaubt. Parallel wurden die offenen Leserahmen zur rekombinanten Expression in den bakteriellen Expressionsvektor pJC45 subkloniert (3.12).

3.10.1 Subklonierung der offenen Leserahmen in den Vektor pIR(mcs2-) und Transfektion der pIR/P- und pIR/A-Konstrukte in *L. major*

Der Vektor pIR(mcs2-), der in Abbildung 19 schematisch dargestellt ist, ermöglicht eine stadienspezifische Expression subklonierter Gene in Leishmanien. Der Vektor enthält flankierende Sequenzen des Promastigoten-spezifischen Lipophosphoglykan 1 (*LPG 1*)-Gens und des Cystein-Proteinase 2 (*CYS2*)-Gens, das in Amastigoten exprimiert wird. Die Insertion eines Gens in die 5' von den flankierenden Sequenzen des *LPG 1*-Gens positionierte multiple Klonierungsstelle erlaubt somit die Expression des Gens in Promastigoten, während ein in die *Sma* I-Restriktionsschnittstelle inseriertes Gen bevorzugt in Amastigoten exprimiert wird.

Durch Linearisierung von pIR(mcs2-) bzw. von rekombinanten pIR-Konstrukten mit der Restriktionsendonuklease *Swa* I werden die für die Vermehrung und Selektion in *E. coli* erforderlichen Sequenzen entfernt. Das lineare Konstrukt besitzt am 3'- und 5'-Ende Sequenzen des ribosomalen RNA-Genlocus aus *L. major*, der für die 18 S-rRNA kodiert (L.m. SSU, *small subunit*). Über diese Sequenzen wird durch homologe Rekombination eine Integration der Konstrukte in das *Leishmania*-Genom erzielt. Die Transkription der rDNA-Einheiten steht unter der Kontrolle des rRNA-Promotors, an den die RNA-Polymerase I bindet. Der rRNA-Promotor weist eine hohe Transkriptionsaktivität auf. Der Anteil der ribosomalen RNA an der gesamten *steady state*-RNA beträgt ca. 80%. Sowohl im Rahmen von transienten Transfektionsexperimenten zur Untersuchung des rRNA-Promotors verschiedener

Die Plasmide habe ich als pIR/**P**-ASC 1, pIR/**P**-Helicase, pIR/**P**-Adaptin und pIR/**P**-DSP (ORF 2, 3, 4, 5 aus pcos8), bzw. als pIR/**P**-PDE, pIR/**P**-Mucin und pIR/**P**-ORF3 (ORF 1, 2, 3 aus pcos13.12) bezeichnet. Andererseits wurden Konstrukte hergestellt, die zur Überexpression der offenen Leserahmen in **A**mastigoten dienen sollten. Diese Plasmide wurden in gleicher Weise bezeichnet, jedoch erhielten sie als Präfix pIR/**A**-.

Um die linearen Konstrukte für die Transfektion zu erhalten, wurden der Vektor und die Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Swa* I linearisiert. Die Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus Agarose-Gel-Matrix aufgereinigt. Im Gegensatz zur episomalen Transfektion, die mit 50 µg DNA erfolgt, werden für eine Integration von Fragmenten in das Genom nur geringe DNA-Mengen benötigt. Zu hohe DNA-Konzentrationen bewirken eine verstärkte nicht-homologe Integration (Cruz und Beverley, 1990). *L. major*-Promastigote wurden mit jeweils ca. 2 µg der Fragmente transfiziert. Die Selektion rekombinanter Parasiten erfolgte in modifiziertem M199-Medium mit 150 µg/ml Nourseothricin.

Mit den *L. major* (pIR/**P**)-Stämmen wurden Versuche zur Temperatur-Toleranz durchgeführt (3.10.2). Die *L. major* (pIR/**A**)-Stämme wurden einer konkurrierenden Selektion in BALB/c-Mäusen unterzogen (3.10.3).

3.10.2 Thermotoleranz der *L. major* (pIR/**P**)-Stämme

Um zu ermitteln, welcher offene Leserahmen der Cosmide pcos8 bzw. pcos13.12 für einen Selektionsvorteil der rekombinanten *L. major*-Stämme bei hohen Temperaturen verantwortlich ist, wurde die Überlebensfähigkeit der *L. major* (pIR/**P**)-Stämme bei 37°C untersucht.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde die Proliferation überlebender Zellen nach mehrtägiger Kultivierung bei 37°C zunächst qualitativ verfolgt. Dabei zeigten sich allerdings bezüglich der die ORF des Cosmids pcos8 überexprimierenden Stämme keine Unterschiede im Vergleich zum Kontrollstamm *L. m.* (pIR)

Die mit den *L. major*-Stämmen *L. m.* (pIR/**P**-ORF3), *L. m.* (pIR/**P**-Mucin), und *L. m.* (pIR/**P**-PDE) durchgeführten Vorversuche deuteten dagegen auf Unterschiede hin, die durch eine *limiting dilution*-Analyse quantifizierbar schienen.

In einige Versuche wurden auch die Stämme *L. m.* (pIR/**P**-L.m.ORF3) und *L. m.* (pIR/**P**-L.m.PDE) einbezogen, welche die offenen Leserahmen überexprimieren, die für die homologen Proteine aus *L. major* kodieren (2.1.8).

Das Wachstum der verschiedenen Stämme wurde ca. eine Woche durch tägliches Verdünnen der Kulturen synchronisiert. Für den Versuch wurden die Ansätze auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 5 Tage bei 37°C kultiviert. Die Anzahl der überlebenden Parasiten wurde, wie bereits erwähnt, durch eine *limiting dilution*-Analyse bestimmt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 20 zu sehen. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde jeweils als Vielfaches der Zellzahl des Kontrollstamms *L. m.* (pIR) angegeben.

Trotz der stark schwankenden Werte ist es offensichtlich, dass der Stamm *L. m.* (pIR/**P**-ORF3) sich in jedem Fall durch eine deutlich bessere Überlebensfähigkeit gegenüber dem Kontrollstamm auszeichnet. Ausgehend vom Median der Ergebnisse schneidet dieser Stamm auch im Vergleich zu allen anderen Stämmen am besten ab. Die Überexpression der Phosphodiesterase scheint ebenfalls einen tendenziell positiven Einfluss auf das Überleben der Parasiten auszuüben. Im Gegensatz zum ORF3 sind dabei keine ausgeprägten

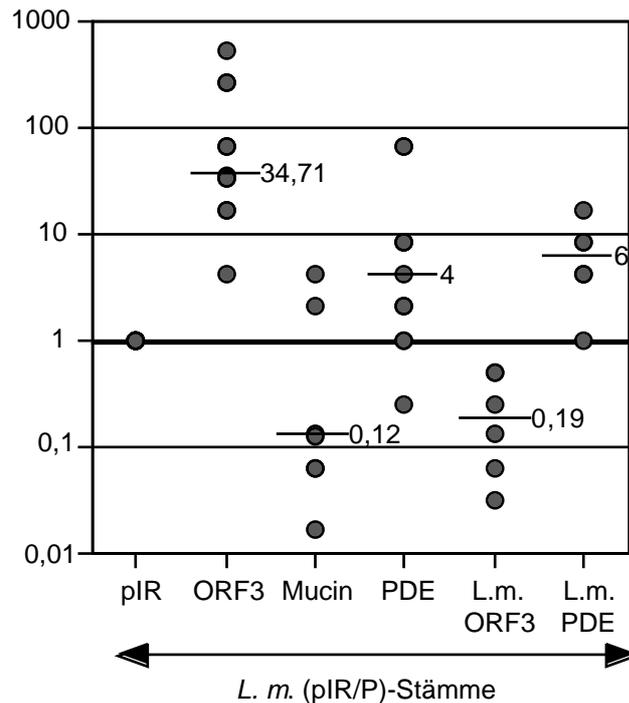


Abbildung 20: Vergleich der Thermotoleranz der *L. major* (pIR/P)-Stämme

Die *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/P-PDE), *L. m.* (pIR/P-Mucin), *L. m.* (pIR/P-ORF3), *L. m.* (pIR/P-L.m.ORF3) und *L. m.* (pIR/P-L.m.PDE) sowie der Kontrollstamm *L. m.* (pIR) wurden über ca. eine Woche durch tägliches Verdünnen synchronisiert. Die Kulturen wurden auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml in modifiziertem M199-Medium eingestellt und 5 Tage bei 37°C kultiviert. Die Bestimmung der Anzahl der überlebenden Zellen erfolgte anschließend durch eine *limiting dilution*-Analyse. Dabei wurde jeweils ein Aliquot der verschiedenen Ansätze in Mikrotiterplatten seriell verdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden ca. 3 Wochen bei 25°C kultiviert. Die Anzahl der überlebenden Parasiten wurde ermittelt.

Die graphische Darstellung gibt die Anzahl der überlebenden Zellen der verschiedenen Stämme als Vielfaches von der Zellzahl des Kontrollstamms an, die gleich 1 gesetzt wurde. Aufgrund der stark schwankenden Werte wurde kein Mittelwert gebildet. Stattdessen wurden die Ergebnisse der Einzelansätze mehrerer Versuche aufgeführt und der Median gekennzeichnet.

L. m. (pIR): 1

L. m. (pIR/P-ORF3): 32; 16; 3,99; 64; 64; 16; 32; 512; 256; **34,71**; 256

L. m. (pIR/P-Mucin): 0,062; 0,062; **0,12**; 4; 2; 0,016; 0,013

L. m. (pIR/P-PDE): 8; **4**; 1; 64; 64; 0,25; 2; 8; 8; 1; 2

L. m. (pIR/P-L.m.ORF3): 0,062; 0,5; 0,5; 0,13; 0,031; 0,25 (Median: **0,19**)

L. m. (pIR/P-L.m.PDE): 8; 4; 16; 4; 1; 8 (Median: **6**)

Unterschiede zwischen *L. donovani*-PDE und *L. major*-PDE festzustellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Thermotoleranz-vermittelnden Eigenschaften des Cosmids pcos13.12 im Wesentlichen auf den *L. donovani*-ORF3 zurückzuführen sind. Das homologe *L. major*-Protein besitzt dagegen keine entsprechende Funktion und eine Überexpression scheint eher einen nachteiligen Effekt zu haben.

3.10.3 Konkurrierende Selektion der *L. major* (pIR/A)-Stämme in der BALB/c-Maus

Die Gene aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12, welche *L. major* möglicherweise einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt verleihen, sollten durch eine konkurrierende Selektion der

rekombinanten *L. major* (pIR/A)-Stämme in der BALB/c-Maus ermittelt werden.

In den ersten Versuch (Abb. 21B) wurden die *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-ASC I), *L. m.* (pIR/A-Helicase), *L. m.* (pIR/A-Adaptin), *L. m.* (pIR/A-DSP) und *L. m.* (pIR/A-PDE) einbezogen, sowie der Kontrollstamm *L. m.* (pIR), der nur das Vektor-Fragment ohne ein inseriertes Gen im rRNA-Genlocus aufweist.

Der zweite Versuch (Abb. 21C) umfasste neben dem Kontrollstamm nur die Stämme, welche die offenen Leserahmen des Cosmids pcos13.12 überexprimieren: *L. m.* (pIR/A-PDE), *L. m.* (pIR/A-Mucin) und *L. m.* (pIR/A-ORF3).

Vier (Abb. 21B) bzw. drei (Abb. 21C) BALB/c-Mäuse wurden mit einem Gemisch der Stämme infiziert. Nach ca. 9 Wochen wurden die Tiere getötet. Die entnommenen Milzen und Lymphknoten wurden homogenisiert, in modifiziertem M199-Medium aufgenommen und bis zur deutlichen Proliferation von Promastigoten bei 25°C kultiviert. Um Einzelklone zu erhalten,

Abbildung 21 (nächste Seite): Konkurrierende Selektion der *L. major* (pIR/A)-Stämme im Säugetierwirt zur Bestimmung der für den Selektionsvorteil verantwortlichen Gene

A: Dargestellt ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel. Es zeigt die Auftrennung einiger PCR-Ansätze, die im Rahmen des unter B beschriebenen Versuchs angefertigt wurden. In die PCR-Reaktionen wurden 200 ng Plasmid-DNA (Bahn 2-6) oder 2 µl aus *Leishmania*-Einzelklonen isolierte genomische DNA (Bahn 7-19) und die Primer 3`pIR, 5`DSP, 5`ASC I, 5`Helicase, 5`Adaptin und 5`PDE eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wurden unter 2.2.11 beschrieben.

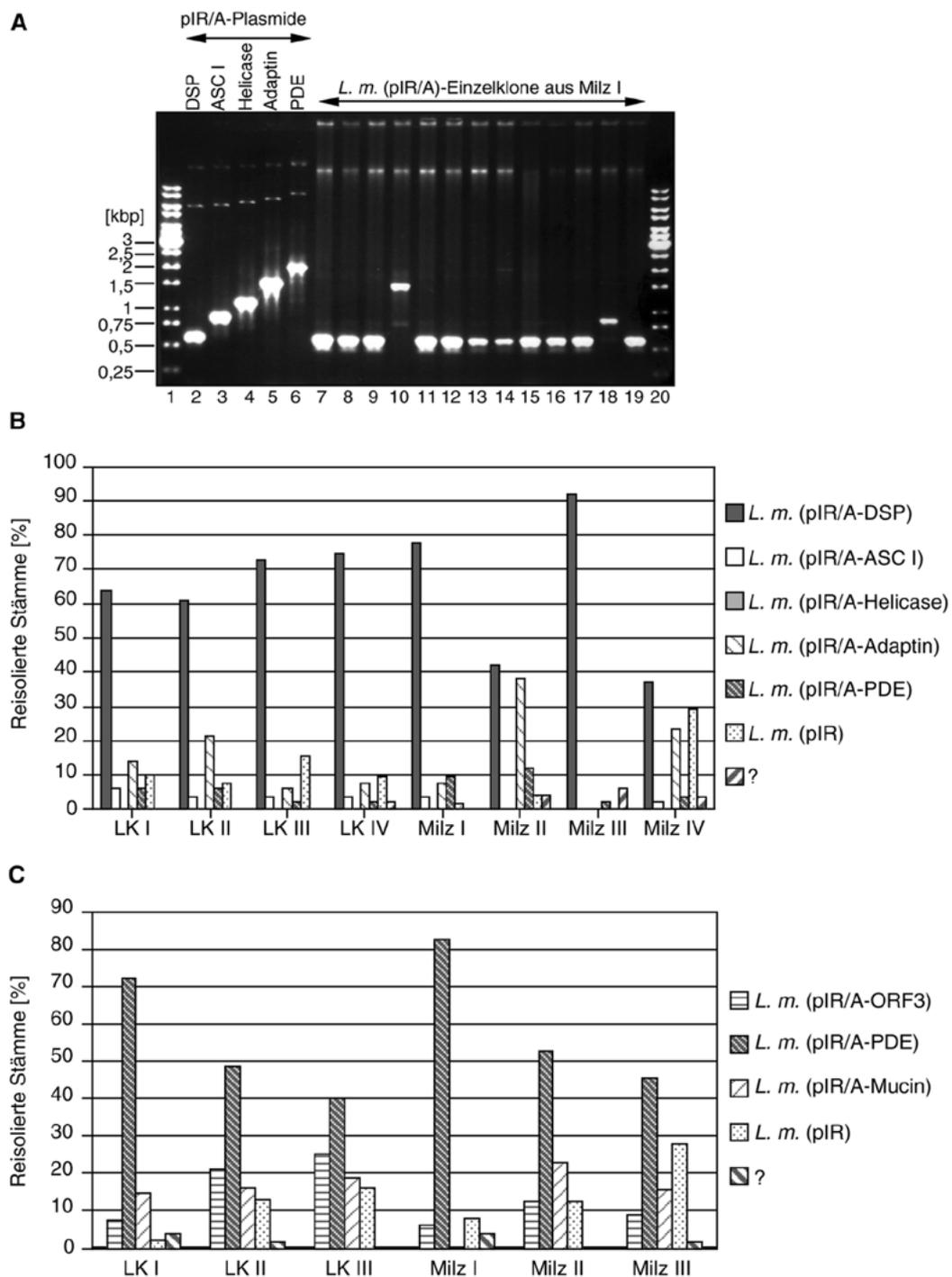
Es wurden 5 µl (Bahn 2-6) bzw. 15 µl (Bahn 7-19) der PCR-Ansätze aufgetragen.

Als DNA-Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker (Bahn 1 und 20), dessen Größen und Positionen an der linken Seite angegeben sind.

B: Vier BALB/c-Mäuse wurden mit je 5×10^7 stationären Zellen eines Gemischs, bestehend aus gleichen Anteilen der *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-ASC I), *L. m.* (pIR/A-Helicase), *L. m.* (pIR/A-Adaptin), *L. m.* (pIR/A-DSP), *L. m.* (pIR/A-PDE), sowie des Kontrollstamms *L. m.* (pIR), infiziert, wobei die Parasiten in den hinteren rechten Fußballen inokuliert wurden. Nach ca. 9 Wochen wurden die Tiere getötet. Milzen und Lymphknoten wurden homogenisiert, in modifiziertem M199-Medium ohne Nourseothricin aufgenommen und bei 25°C kultiviert. Nachdem eine deutliche Proliferation von Promastigoten zu verzeichnen war, wurden die Parasiten der verschiedenen Ansätze zur Generierung von Einzelklonen verdünnt und zunächst in Mikrotiterplatten eingesät. Nach Amplifikation der Klone wurde die genomische DNA aus jeweils $1-2 \times 10^8$ Parasiten isoliert. 50 Einzelklone je Ansatz wurden untersucht. Die Zuordnung der Einzelklone zu den Stämmen erfolgte durch eine PCR-Analyse (2.2.11) der genomischen DNA. In die PCR-Reaktion wurde dabei neben dem innerhalb der Vektorsequenzen bindenden 3`-Primer ein 5`Primer-Gemisch eingesetzt, das die für die verschiedenen offenen Leserahmen spezifischen Primer umfasst. Dadurch wurden Stamm-spezifische Fragmente amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Reaktionen war somit die Zuordnung eines Einzelklons zu einem Stamm anhand der Größe des erhaltenen Fragments möglich. Bei einem nicht eindeutigen Ergebnis bzw. wenn kein Fragment amplifiziert wurde, was ein Hinweis auf den Kontrollstamm war, da der entsprechende 5`Primer nicht im Primer-Gemisch enthalten war, erfolgte zur Überprüfung eine PCR-Analyse mit den Einzel-Primerpaaren. Die graphische Darstellung gibt die prozentualen Anteile der verschiedenen Stämme an den jeweils 50 Einzelklonen der aus den Organen reisolierten Parasiten wieder. Mit einem Fragezeichen ist der Anteil der Einzelklone, die nicht zu identifizieren waren, gekennzeichnet.

C: Stationäre Zellen der die offenen Leserahmen des Cosmids pcos13.12 überexprimierenden *L. major*-Stämme, *L. m.* (pIR/A-PDE), *L. m.* (pIR/A-Mucin), *L. m.* (pIR/A-ORF3) und der Kontrollstamm *L. m.* (pIR) wurden zu gleichen Anteilen gemischt. 3 BALB/c-Mäuse wurden mit jeweils 5×10^7 Zellen des Gemischs, die in den rechten hinteren Fußballen injiziert wurden, infiziert. Nach 9 Wochen wurden die Tiere getötet und die aus den entnommenen Milzen und Lymphknoten reisolierten Parasiten wie unter B beschrieben analysiert.

Der prozentuale Anteil der vier Stämme an den jeweils 50 Einzelklonen der aus den Organen reisolierten Parasiten ist graphisch dargestellt. Einzelklone, die keinem Stamm zugeordnet werden konnten, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.



wurden die Ansätze nachfolgend verdünnt. Der Anteil der verschiedenen Stämme an den reisolierten Parasiten wurde durch die Analyse von 50 Einzelklonen je Organ bestimmt. Aus den amplifizierten Klonen wurde die genomische DNA isoliert und in eine PCR-Reaktion mit einem innerhalb der Vektorsequenzen bindenden 3'-Primer, sowie einem 5'-Primer-Gemisch eingesetzt, das die für die verschiedenen offenen Leserahmen spezifischen Primer umfasst. Dadurch wurden Stamm-spezifische Fragmente amplifiziert. Mit der genomischen DNA des Kontrollstamms war eine Amplifikation nicht möglich, da das Primer-Gemisch den Vektor-spezifischen 5'-Primer nicht enthielt. Die PCR-Reaktion wurde in diesem Fall, und auch bei nicht eindeutigen Ergebnissen, mit den Einzel-Primerpaaren wiederholt. Die PCR-Ansätze wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und die Einzelklone konnten anhand der Größe der

Fragmente den verschiedenen Stämmen zugeordnet werden. Als Beispiel ist in Abbildung 21A ein im Rahmen des ersten Versuchs angefertigtes Agarose-Gel dargestellt. Die Bahnen 2 bis 6 zeigen die Kontroll-Ansätze. In die PCR-Reaktion wurde in diesem Fall die DNA der pIR/A-Plasmide eingesetzt. Die ORF-spezifischen Fragmente sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe deutlich voneinander zu unterscheiden. In den Bahnen 7 bis 19 wurden PCR-Ansätze aufgetragen, die mit der genomischen DNA aus einigen Einzelklonen der aus einer Milz reisolierten Parasiten durchgeführt wurde. Es wird deutlich, dass die untersuchten Einzelklone anhand der Bande, die auf Höhe von knapp 600 bp (Fragment: 573 bp) läuft, überwiegend dem Stamm *L. m.* (pIR/A-DSP) zuzuordnen sind. Dies spiegelt auch das Gesamtergebnis des Versuchs wieder, wie der graphischen Darstellung der prozentualen Anteile der verschiedenen Stämme an den Einzelklonen (Abb. 21 B) zu entnehmen ist. Der Stamm *L. m.* (pIR/A-DSP) war im Vergleich zu den anderen Stämmen in allen untersuchten Ansätzen wesentlich stärker vertreten. Bezüglich der aus Milz II und Milz IV reisolierten Parasiten waren die Unterschiede zwar nicht so groß, jedoch war der prozentuale Anteil von *L. m.* (pIR/A-DSP) auch hier am höchsten.

Der Stamm *L. m.* (pIR/A-Helicase) war in den analysierten Einzelklonen nicht einmal vertreten, während alle anderen Stämme und auch der Kontrollstamm, wenn auch teilweise nur vereinzelt, gefunden wurden. Eine Überexpression dieser RNA-Helicase ist möglicherweise für die Parasiten im Säugetierwirt eher ein Nachteil.

Abbildung 21C zeigt das Ergebnis des Versuchs, der mit den Stämmen durchgeführt wurde, welche die offenen Leserahmen des Cosmids pcos13.12 überexprimieren. Es ist offensichtlich, dass der Stamm *L. m.* (pIR/A-PDE) an den Einzelklonen aller Ansätze den höchsten Anteil aufweist.

Den Ergebnissen der beiden Versuche zufolge, ist es naheliegend, dass der *L. major* durch die Cosmide pcos8 und pcos13.12 im Säugetierwirt vermittelte Selektionsvorteil, auf die offenen Leserahmen, die für die mutmaßliche DSP (*dual specificity phosphatase*) bzw. für die PDE (Phosphodiesterase) kodieren, zurückzuführen ist. Der die PDE aus pcos13.12 überexprimierende Stamm *L. m.* (pIR/A-PDE) war ebenfalls in den ersten Versuch (21B) miteinbezogen worden. Der Anteil dieses Stamms an den Einzelklonen der verschiedenen Ansätze war allerdings mit durchschnittlich 6,8 % relativ gering. Demnach scheint der durch die DSP vermittelte Effekt wesentlich stärker zu sein.

Außerdem kann unter Einbezug der unter 3.10.2 beschriebenen Ergebnisse wiederum kein Zusammenhang zwischen Temperatur-Toleranz und Tropismus hergestellt werden. Der den ORF3 überexprimierende *L. major*-Stamm erwies sich zwar im Vergleich zum Kontrollstamm und zu den anderen Stämmen bei hohen Temperaturen als deutlich resistenter, scheint jedoch für die Selektion im Säugetierwirt keinen Vorteil zu erbringen.

3.11 Untersuchung der Zahl der Genkopien von *DSP* und *PDE*

Um einen Hinweis auf die Zahl der Genkopien von *DSP* und *PDE* im *L. donovani*-Genom zu erhalten, habe ich genomische DNA aus *L. donovani* einer Restriktionsanalyse unterzogen. Nach dem Verdau der genomischen DNA mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung, wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und die Southern-Blots mit einer DIG-markierten *DSP*-Sonde (Abb. 22A) bzw. mit einer DIG-markierten *PDE*-Sonde (Abb. 22B) hybridisiert. Bei dem Vorliegen von nur einer

	DSP (1661 bp)			PDE (4772 bp)	
Enzym	Fragment [bp]	ORF-Anteil [bp]	Enzym	Fragment [bp]	ORF-Anteil [bp]
<i>Bgl</i> II	>7766 2149	595 1066	<i>Bsp</i> HI	>5346 >922 (-)	4729 43
<i>Bsp</i> HI	6180 2553 (-)	1486 175	<i>Nco</i> I	>2484 957 480 (-) >2365	1849 957 480 1486
<i>Hind</i> II	980 1108	846 815	<i>Nru</i> I	>1750 >4536	1115 3657
<i>Pst</i> I	2616 2073*	898 763	<i>Sac</i> I	>694 (-) >5592	59 4713
<i>Pvu</i> II	3240* 883*	1415 246	<i>Sal</i> I	>3827 229 (-) 1841	3192 229 1351
<i>Sac</i> I	3937 >3536	717 944	<i>Sma</i> I	>3248 >3038	2613 2159
<i>Sal</i> I	2339 >3409*	844 817	<i>Sph</i> I	>6274	4772
<i>Sca</i> I	>7741 2582*	570 1091	<i>Xho</i> I	>2243 2799 153 (-) >1061 (-)	1608 2799 153 212
<i>Sph</i> I	>4251	1659			

Tabelle 4: Voraussichtliches Ergebnis einer Southern-Blot-Analyse

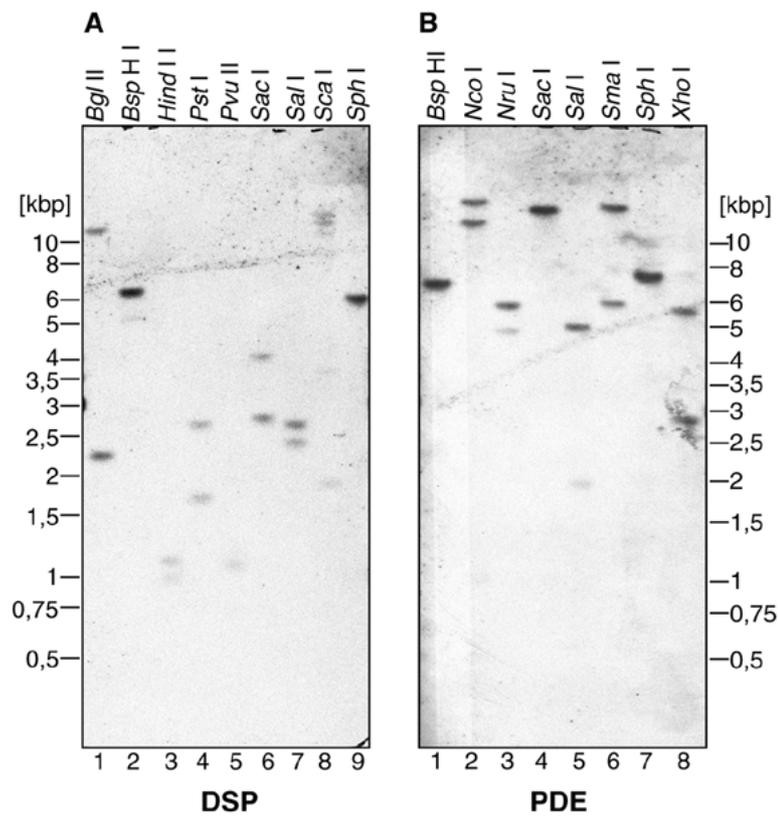
Ausgehend von den *pcos8*-Sequenzen (11424 bp-Contig; Abb.C) und den *pcos13.12*-Sequenzen (6286 bp-Contig; Abb. 22D) sind bei einer Restriktions- und Southern-Blot-Analyse genomischer *L. donovani*-DNA unter Verwendung von *DSP*- bzw. *PDE*-spezifischen Gensonden die aufgelisteten Fragmente zu erwarten, vorausgesetzt, dass die Gene nicht in mehreren Kopien vorliegen. Angegeben ist außerdem der Anteil der offenen Leserahmen (ORF) an den Fragmenten.

Mit einem Strich gekennzeichnete Fragmente waren im Southern-Blot, wahrscheinlich aufgrund eines zu geringen ORF-Anteils, nicht nachzuweisen. Fragmente, die mit einem Stern markiert sind, konnten im Southern-Blot nicht Banden der entsprechenden Größe zugeordnet werden.

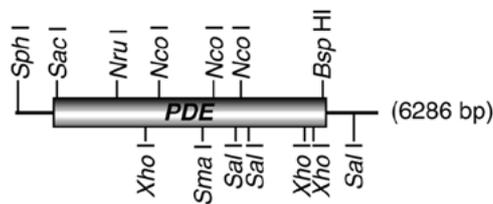
Kopie der jeweiligen Gene sind, abgeleitet von den aus der Sequenz-Analyse hervorgegangenen Cosmid-Sequenzen, die in der Tabelle 4 aufgelisteten Fragmente zu erwarten.

In Abbildung 22A und B ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse zu sehen. Fragmente mit einem zu geringen Anteil der jeweiligen offenen Leserahmen (< 500 bp) konnten nicht nachgewiesen werden. Das Bandenmuster des Chemiluminogramms des Southern-Blots, der mit der *PDE*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde (B), zeigt, dass bei allen eingesetzten Enzymen die in Tabelle 4 angegebenen Fragmente resultierten. Das Fehlen zusätzlicher Banden spricht dafür, daß das *PDE*-Gen im haploiden *L. donovani*-Genom als Einzelgen vorliegt.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse unter Verwendung der *DSP*-spezifischen Gensonde ist nicht ganz eindeutig. Die Anzahl der nachgewiesenen Fragmente entspricht zwar mit Ausnahme des *Pvu* II- und des *Sca* I-Verdaus den Erwartungen, jedoch weisen einige Fragmente abweichende Größen auf. Dies läßt sich nur dadurch erklären, dass die *pcos8*-Sequenz des 11424 bp-Contigs, insbesondere 3' vom *DSP*-ORF, anscheinend nicht korrekt ist. Wie bereits erwähnt (3.9) liegen in diesem Bereich repetitive Sequenzen. Abgesehen vom *Sca* I-Verdau, sind aber in keinem Fall mehr als die erwarteten Banden zu sehen, so daß man davon ausgehen kann, dass auch das *DSP*-Gen nur einmal im haploiden *L. donovani*-Genom vertreten ist.



D PDE (635-5407 bp)



C DSP (7171-8832 bp)

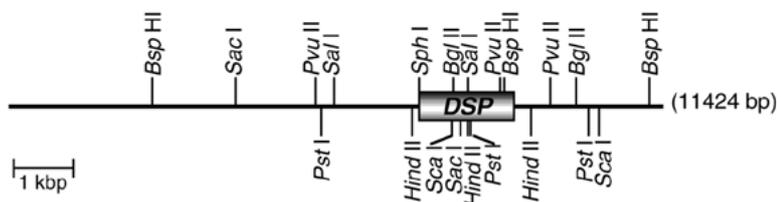


Abbildung 22 (vorherige Seite): Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Genkopien von DSP und PDE

A, B: Dargestellt sind zwei Chemiluminogramme einer Southern-Blot-Analyse. Jeweils 5 µg genomische *L. donovani*-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen behandelt und in einem 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten DSP- (A) bzw. PDE-spezifischen Gensonde (B) hybridisiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA erfolgte mit einem anti-DIG-Antikörper, der mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für das Enzym wurde in die Chemilumineszenzreaktion CSPD eingesetzt und ein Röntgenfilm ca. 1,5 (A) bzw. 18 Stunden (B) exponiert.

C: Schematische Darstellung des 6286 bp großen Contigs des pcos13.12-Inserts mit dem für die PDE kodierenden ORF. Die Positionen der Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen sind markiert.

D: Abgebildet ist das 11424 bp-Contig des pcos8-Inserts, das den ORF enthält, der für die DSP kodiert. Die für die Untersuchung der Genkopien relevanten Restriktionsschnittstellen sind in der schematischen Darstellung gekennzeichnet.

3.12 Rekombinante Expression der offenen Leserahmen aus pcos8 und pcos13.12 zur Antigen-Gewinnung für die Herstellung von Antikörpern

Parallel zur Ermittlung der Gene, die *L. major* einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen und/oder im Säugetierwirt verleihen (3.10), sollten durch die Herstellung spezifischer Antikörper die Voraussetzungen für eine weitere Charakterisierung der entsprechenden Genprodukte auf Proteinebene geschaffen werden. Die offenen Leserahmen der Cosmide pcos8 und pcos13.12 wurden daher in den Expressionsvektor pJC45 subkloniert und in *E. coli* unter Nutzung des T7-RNA-Polymerase-Systems (Studier und Moffat, 1986; Studier *et al.*, 1990) exprimiert. Mit den rekombinant überexprimierten und aufgereinigten Proteinen wurden anschließend legereife Hühner immunisiert.

3.12.1 Subklonierung der offenen Leserahmen in den Expressionsvektor pJC45

Der für die Expression in *E. coli* verwendete Vektor pJC45 ist in Abbildung 23 schematisch dargestellt. In die multiple Klonierungsstelle eingefügte Gene werden mit 20 Aminosäuren, inklusive 10 Histidin-Resten, deren kodierende Sequenzen 5' von der *Nde* I-Restriktionsschnittstelle positioniert sind, coexprimiert. Die N-terminale Addition der Histidine ermöglicht eine Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine über Metall-Chelat-Chromatographie.

Die offenen Leserahmen aus pcos8 und pcos13.12 wurden in einer PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den 5'Primer eine *Nde* I-Schnittstelle (CATATG) eingeführt, in der das Start-Codon des ORF integriert ist. Mit Hilfe des 3'-Primers wurde im Bereich des Stop-Codons eine weitere Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease eingeführt, die für die Subklonierung des jeweiligen ORF geeignet war. Die amplifizierten, mit den Restriktionsendonukleasen behandelten und nachfolgend aufgereinigten Fragmente wurden in den entsprechend vorbereiteten Vektor pJC45 ligiert.

Die aus der Subklonierung hervorgegangenen Plasmide habe ich als pJC45/ASC I, pJC45/Helicase, pJC45/Adaptin, pJC45/DSP, pJC45/PDE, pJC45/Mucin und pJC45/ORF 3 bezeichnet (2.1.8).

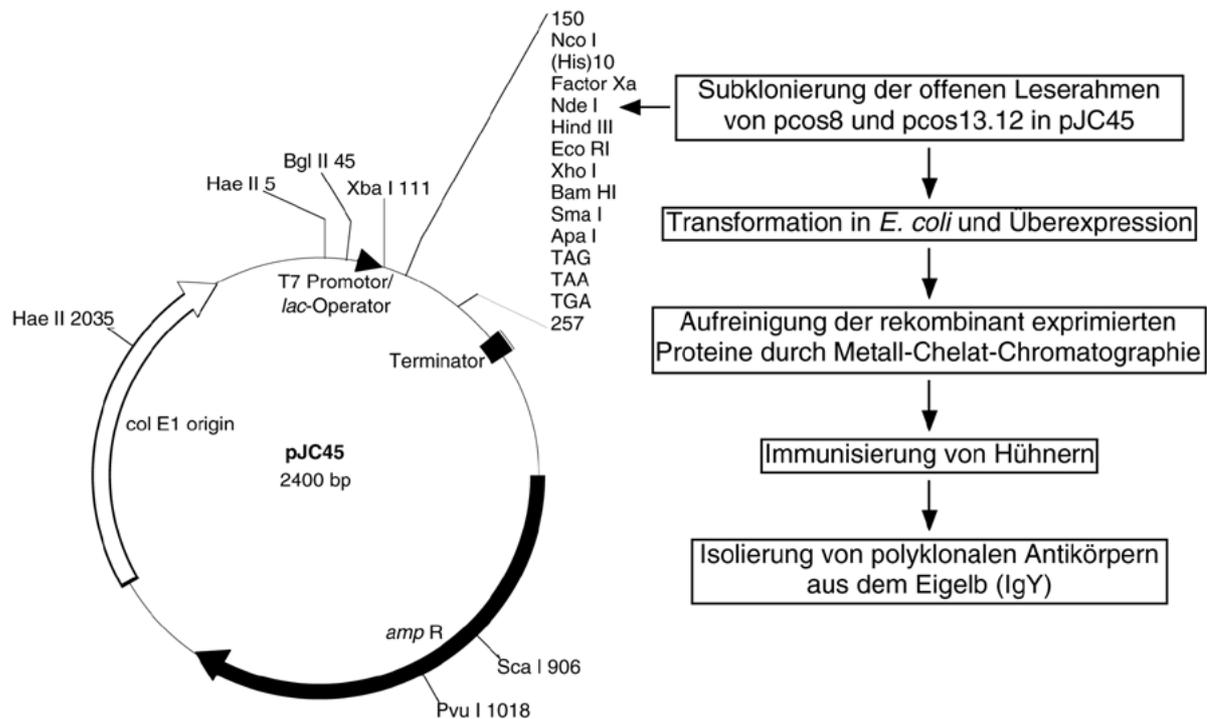


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Vektors pJC45

Die Abbildung zeigt die Plasmidkarte des Expressionsvektors pJC45.

Die ORF aus den Cosmiden pcos8 und pcos13.12 wurden zwischen die *Nde* I- und einer weiteren für die Subklonierung der jeweiligen ORF günstigen Restriktionsschnittstelle inseriert. Die Transkription der Gene wird durch einen T7/*lac*-Promotor kontrolliert. Da die rekombinant exprimierten Proteine am aminoterminalen Ende zusätzlich 20 Aminosäuren mit 10 Histidin-Resten erhalten, ist eine Aufreinigung durch Metall-Chelat-Chromatographie möglich.

Um Antikörper zu gewinnen, wurden Legehennen mit den aufgereinigten Proteinen immunisiert.

3.12.2 Rekombinante Expression der subklonierten Gene und Aufreinigung der überexprimierten Proteine

Das auf der T7-RNA-Polymerase basierende Expressionssystem gewährleistet eine effiziente Transkription der unter der Kontrolle des T7-Promotors stehenden Gene. Die T7-RNA-Polymerase, die durch eine sehr ausgeprägte Promotor-Spezifität gekennzeichnet ist, weist eine fünffach höhere Elongationsrate als die *E. coli* RNA-Polymerase auf. Es können große Mengen der zu exprimierenden Proteine erzielt werden.

Der Vektor pJC45, der als Negativ-Kontrolle diente, und die aus der Subklonierung hervorgegangenen Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)[pAP/*lac*^o] transformiert, in dessen Genom das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors integriert ist.

Einzelklone der verschiedenen Ansätze wurden angezogen, und die Expression der T7-RNA-Polymerase und somit auch die Expression der in pJC45 unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors stehenden Gene wurde wie unter 2.2.24 beschrieben durch die Zugabe von IPTG induziert. Den Bakterienkulturen vor und 1,5 h nach IPTG-Zugabe entnommene Proben wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau oder Silber-Färbung analysiert (Abb. 24).

Während das Proteinmuster der Vektor-Kontrollansätze (Abb. 24E, F, G: Bahn 2 und 3) vor und nach Induktion nicht zu unterscheiden ist, stellen sich die den rekombinanten Proteinen entsprechenden Banden nach der Induktion (+) im Vergleich zu den Proben vor Induktion (-) wesentlich stärker dar (Abb. 24A: Bahn 3, B: Bahn 3, C: Bahn 2, D: Bahn 3, E: Bahn 5, F: Bahn 5 und 7, G: Bahn 5). Die Genprodukte der klonierten Sequenzen konnten also deutlich überexprimiert werden.

Das errechnete Molekulargewicht der von den verschiedenen ORF abgeleiteten Aminosäuresequenzen beträgt für ASC I (24A) ca. 69 kDa, für Helicase (24B) ca. 94 kDa, für Adaptin (24C) ca. 124 kDa, für DSP (24D) ca. 60 kDa, für PDE (24E) ca. 168 kDa, für Mucin (24F) ca. 185 kDa und für ORF3 (24 G) ca. 83kDa. Die rekombinanten Proteine haben aufgrund der zusätzlichen 20 Aminosäuren ein um ca. 2 kDa höheres Molekulargewicht. Nach dem Laufverhalten der überexprimierten Proteine in der SDS-PAGE zu schließen, liegt das apparente Molekulargewicht allerdings teilweise noch höher. Mit ca. 90 kDa kommt rORF3 den Erwartungen am nächsten.

Insbesondere am Beispiel des mit dem Plasmid pJC45/PDE transformierten *E. coli*-Stamms (E) ist zu sehen, dass die Expression in den uninduzierten Kulturen nicht vollständig unterdrückt wurde. In der uninduzierten Kultur (E: Bahn 4) ist eine Bande auf der Höhe des rekombinanten Proteins zu erkennen. Die Kontrollkulturen (E: Bahn 2, 3) weisen dagegen in diesem Größenbereich keine Banden auf.

Bezüglich des mit pJC45/ASC I (A: Bahn 3) transformierten *E. coli*-Stamms ist bereits anhand der den Bakterienkulturen entnommenen Proben zu erkennen, dass nach Induktion nicht nur das vollständige Genprodukt, sondern auch ein Protein mit geringerer Masse (ca. 40 kDa) verstärkt exprimiert wurde. Möglicherweise wurde die Translation bevorzugt an einer bestimmten Position abgebrochen. Auch von rORF3 ist, wenn auch weniger deutlich, in der Probe nach Induktion (G: Bahn 5) ein kleineres, ca. 50 kDa großes Produkt zu sehen.

Mit Ausnahme des rMucins wurden alle rekombinanten Proteine im präparativen Maßstab exprimiert. Zur Isolierung der rekombinanten Proteine wurden die Bakterien durch Ultraschall aufgeschlossen, die löslichen Bestandteile des Lysats (Abb. 24, Lysat/Ü) abgetrennt und die Zelleinschlusskörper in einem Puffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert (Abb. 24, Lysat/S-Urea). Wie aus den in Abbildung 24 dargestellten SDS-Polyacrylamid-Gelen hervorgeht, wurde der Hauptteil der rekombinanten Proteine in den Zelleinschlusskörpern gefunden (Abb. 24, Lysat/-Urea oder Extrakt) und konnte in den meisten Fällen durch die Behandlung mit Harnstoff extrahiert werden. Bezüglich rPDE war dies jedoch nicht möglich. Weder durch Harnstoff (Abb. 24E, Bahn 8), noch durch Guanidiniumhydrochlorid ließ sich dieses Protein effektiv aus den Zelleinschlusskörpern herauslösen.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte, wie bereits erwähnt, durch Metall-Chelat-Chromatographie. Die Extrakte wurden auf eine Säule mit Nickelsulfat aktivierter Matrix aufgetragen und die Bindung der rekombinanten Proteine an das Säulenmaterial erfolgte durch Komplexierung der am N-terminalen Ende angefügten Histidinreste mit den Nickelionen. Durch Wasch- bzw. Elutionspuffer mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen wurden zunächst unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gelöst und schließlich die rekombinanten Proteine eluiert.

Die Bindungskapazität der Säulen wurde offensichtlich überschritten, da im Durchlauf (Abb. 24, n. geb. Extrakt) überwiegend noch große Mengen der rekombinanten Proteine vorhanden

waren. Die aus der Behandlung der Zelleinschlusskörper mit Harnstoff hervorgegangenen Extrakte enthielten anscheinend nur einen geringen Anteil an Verunreinigungen, wie an den Proben zu erkennen ist, die den Waschpuffern nach dem Durchlauf durch die Säule entnommen wurden sind (5 mM-, 20 mM-, 60mM Imidazol). Diese wiesen nur geringe Proteinmengen auf.

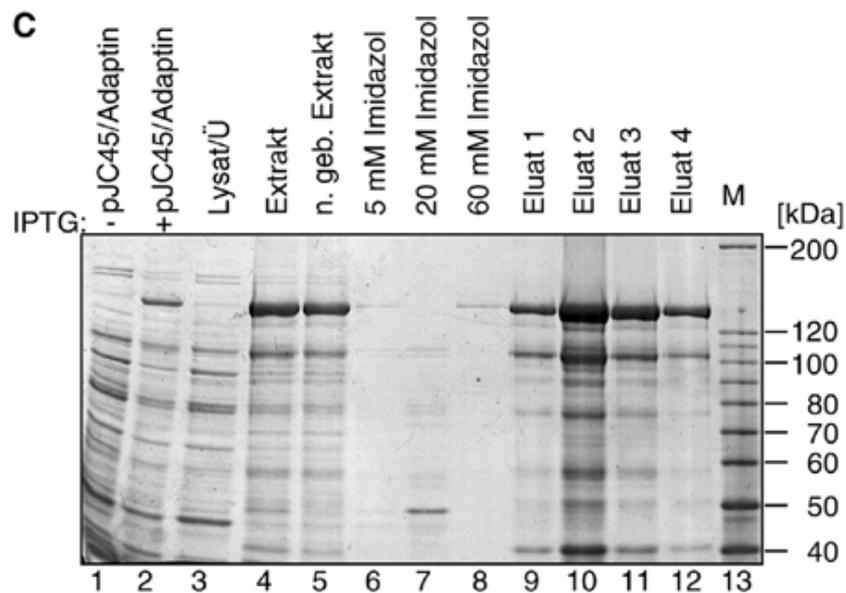
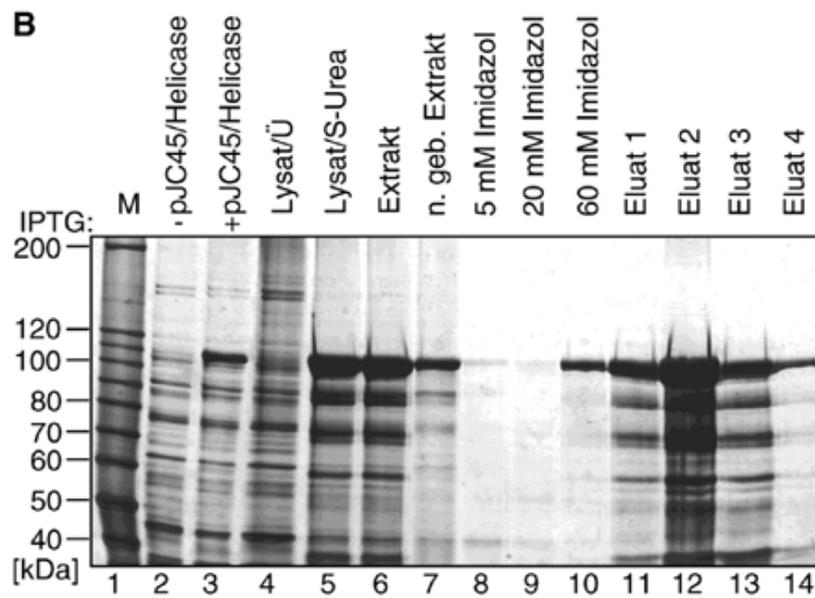
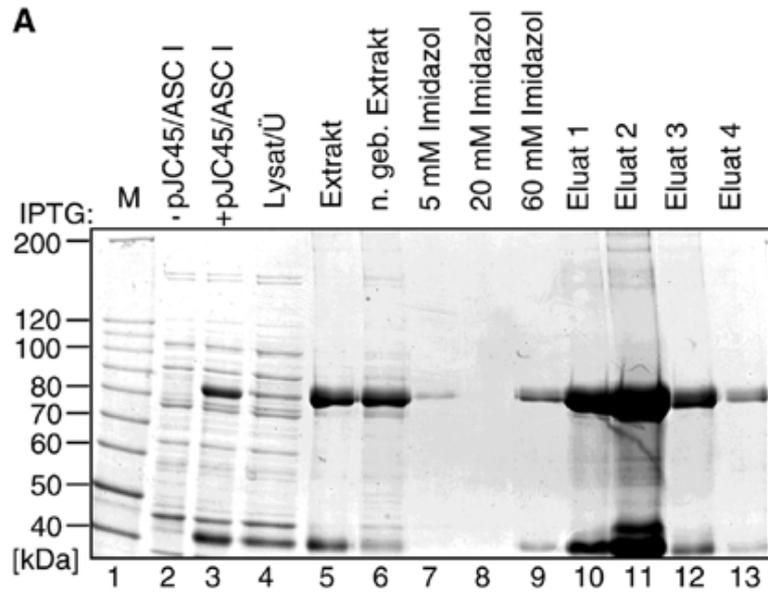
In den Eluaten fallen neben der jeweiligen Hauptbande des Genprodukts die zahlreichen Banden in den niedrigeren Molekulargewichtsbereichen auf. Diese sind wahrscheinlich auf Abbauprodukte und, wie bereits bezüglich rASC I und rORF3 erwähnt, auf unvollständige Translationsprodukte zurückzuführen.

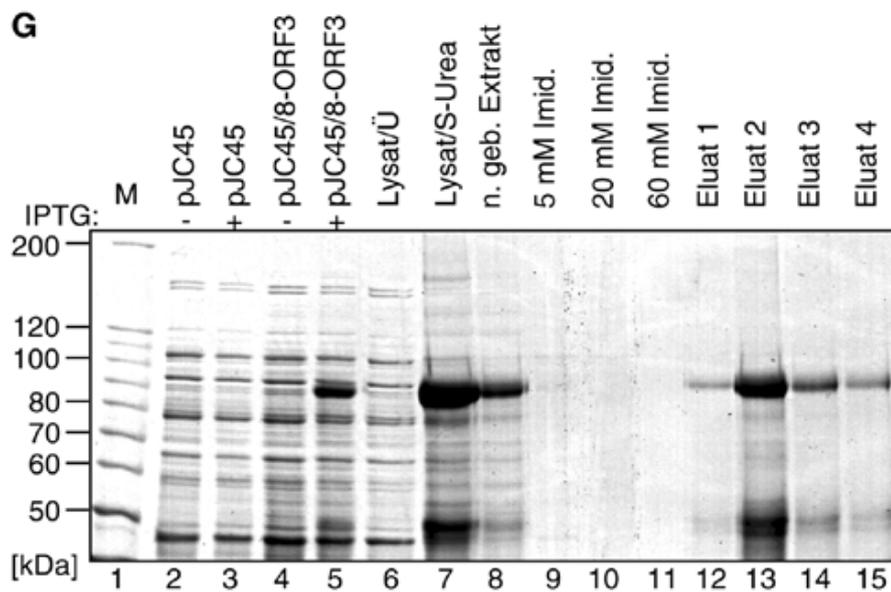
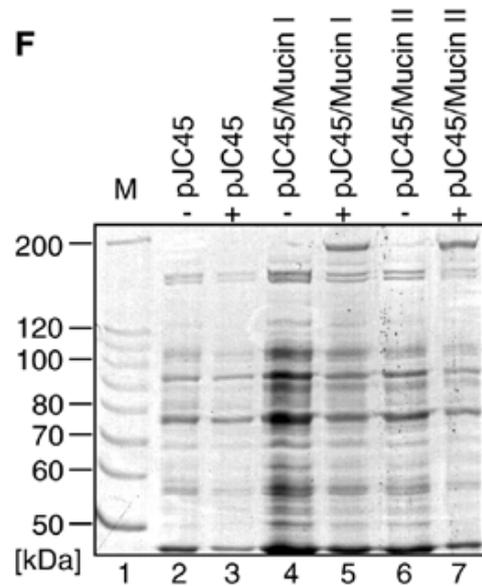
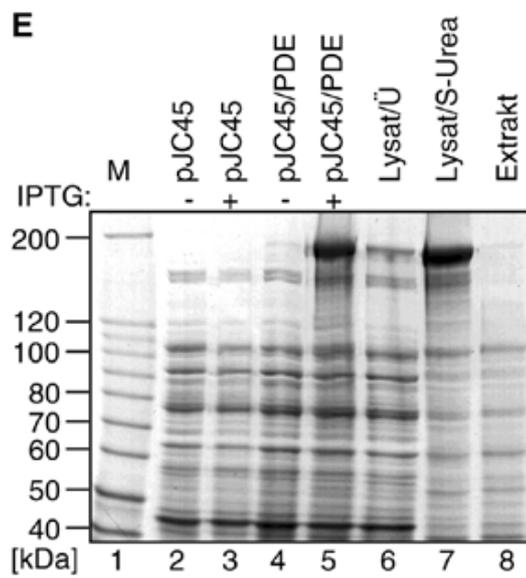
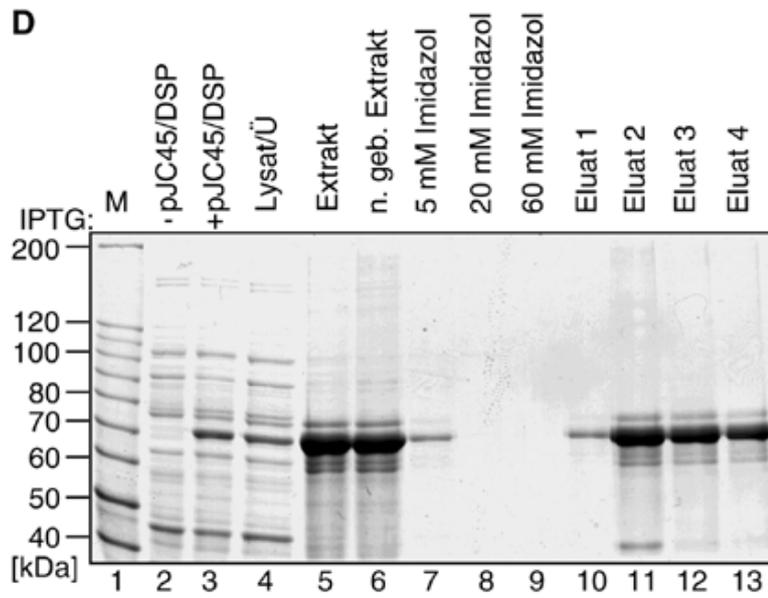
Die rDSP-Eluate (Abb. 24 D, Bahn 10-13) weisen auch eine schwache Bande auf, die einem Protein entspricht, das ein höheres Molekulargewicht aufweist, als das überwiegende Genprodukt. Möglicherweise erfolgte in diesem Fall die Termination der Translation nicht effektiv.

Abbildung 24 (folgende Seiten): Überexpression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms BL21(DE3)[pAP/ad^o] wurden mit den Plasmiden pJC45/ASC I (**A**), pJC45/Helicase (**B**), pJC45/Adaptin (**C**), pJC45/DSP (**D**), pJC45/PDE (**E**), pJC45/Mucin (**F**), pJC45/ORF 3 (**G**) und pJC45 (Kontrolle) transformiert. Mindestens 400 ml (*E. coli* mit pJC45 und *E. coli* mit pJC45/Mucin: 10 ml) Ampicillin- und Kanamycin-haltiges CG-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und bei 37°C kultiviert. Nach dem Erreichen einer OD_{600nm} von 0,06-0,3 wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG die Expression der rekombinanten Proteine induziert und die Kulturen weitere 1,5 h bei 37°C inkubiert. Vor Induktion und 1,5 h nach der IPTG-Zugabe wurden den Kulturen 1 ml-Proben entnommen und die Bakterien in 50 µl SDS-Probenpuffer, bzw. in einem der OD_{600nm} nach Induktion entsprechendem größeren Volumen resuspendiert und bei 95°C solubilisiert.

Die Bakterien wurden sedimentiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden die Zelleinschlusskörper von den löslichen Proteinen im Überstand (**Lysat/Ü**) getrennt. Durch die Behandlung der resuspendierten Zelleinschlusskörper mit 8 M Harnstoff (**Lysat/S-Urea**) wurden die rekombinanten Proteine extrahiert. Unlösliche Bestandteile wurden nach Zentrifugation der Suspension vom **Extrakt** getrennt. Zur Aufreinigung wurde der Extrakt auf eine Säule mit Nickelsulfat aktivierter Matrix aufgetragen und der Durchlauf (**nicht gebundener Extrakt**) aufgefangen. Nach drei Waschschrritten mit Imidazol-haltigen Puffern (**5 mM, 20 mM, 60 mM Imidazol**) wurden die Proteine bei einer Imidazol-Konzentration von 250 mM in vier Fraktionen eluiert (**Eluat 1, 2, 3, 4**). Von den Lysat-Fraktionen, dem Extrakt, den verschiedenen Durchläufen und den Eluaten wurde jeweils ein Aliquot mit einem Volumen SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95°C behandelt. Jeweils 20 µl der verschiedenen Proben wurden in den dargestellten SDS-Polyacrylamid-Gelen (Trenngel: 7,5 %) aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung oder Silberfärbung (B) sichtbar gemacht. Als Marker (**M**) diente eine 10 kDa-Protein-Leiter.





3.12.3 Nachweis von rekombinant exprimierten Proteinen und *Leishmania*-Proteinen mit den hergestellten Antikörpern

Noch bevor die Ergebnisse der unter 3.10 beschriebenen Versuche vorlagen, wurden zur Immunisierung von Legehennen die aufgereinigten rekombinanten Proteine rAdaptin, rORF3, rHelicase und rDSP verwendet. Die Aufreinigung der Immunglobuline aus dem Eigelb (IgY) erfolgte durch fraktionierende Polyethylenglykol-Fällung (Polson *et al.*, 1980; Polson *et al.*, 1985) (2.2.26).

Die Reaktion der Antikörper gegen die rekombinant exprimierten Proteine und gegen *Leishmania*-Gesamt-Protein wurde untersucht. Die Abbildung 25 zeigt Immunblot-Analysen, die mit den verschiedenen Antikörpern durchgeführt wurden. Alle Antikörper reagierten spezifisch mit den jeweiligen, rekombinant exprimierten Antigenen (Abb. 25A, Bahn 5; 25B, Bahn 5; 25C, Bahn 1; 25F, Bahn 1).

Der gegen Adaptin gerichtete Antikörper erkennt in Lysaten der Adaptin-überexprimierenden *Leishmania*-Stämme (Abb. 25A: Bahn 1-4) ein Protein, das im SDS-PA-Gel auf Höhe des vollständigen rekombinanten Genprodukts läuft. Diese Reaktion scheint spezifisch zu sein, da der Blot, der mit den vor der Immunisierung isolierten Antikörpern behandelt wurde (Prä-Immun) in dem Bereich keine Banden aufweist. Die Prä-Immun-Antikörper reagieren jedoch mit einer Vielzahl von anderen *Leishmania*-Proteinen. Die spezifische Reaktion des anti-Adaptin-Antikörpers im Vergleich zum Hintergrund ist zu schwach und eine weitere Verdünnung des Antikörpers zur Reduktion des Hintergrunds wäre nicht sinnvoll.

Die anti-ORF3-Antikörper sind nicht verwertbar. Das rekombinante Protein lässt sich zwar spezifisch nachweisen (Abb. 25, Bahn 5), jedoch ist ein dem ORF 3 entsprechendes *Leishmania*-Protein aufgrund der verwirrenden Vielzahl der Banden nicht eindeutig zuzuordnen.

Für die Analyse der Prä-Immun-Antikörper vor der Immunisierung wurden *L. major*- und *L. donovani*-Wildtyp-Lysate eingesetzt, wobei es nur zu einer schwachen Reaktion mit einem ca. 150 kDa-Protein kam (nicht dargestellt), das auch bei Verwendung der *L. major* [pcos13.12]-Lysate zu sehen ist (Abb. 25, Prä-Immun: Bahn 3 und 4). Die vielen kleineren Proteine, die mit dem anti-ORF3-Antikörper reagieren, werden von den Prä-Immun-Antikörpern nur vereinzelt erkannt. Auffällig ist dagegen die Reaktion der Prä-Immun-Antikörper mit vielen Proteinen des *L. major*-Stamms *L. m.* (pIR/P-ORF3) (Abb. 25, Prä-Immun: Bahn 1 und 2), in dessen rRNA-Genlocus der ORF3 aus dem Cosmid pcos13.12 integriert ist. Es scheint, als ob das rekombinante Protein rORF3 selbst als Adjuvant wirkt und die Produktion der mit den *Leishmania*-Proteinen reagierenden Prä-Immun-Antikörper stimuliert.

Die anti-Helicase-Antikörper reagieren spezifisch, sowohl mit dem rekombinanten Protein, als auch mit einem auf gleicher Höhe laufenden ca. 105 kDa-Protein des *L. m.* [pcos8]-Lysats (Abb. 25C: Bahn 1 bzw. 4). Abbildung 25D zeigt, dass das entsprechende Protein im *L. major*-Wildtyp bei einem Einsatz von 2×10^6 lysierten Zellen nicht nachzuweisen ist (Bahn 1, 2). Im Vergleich dazu wird das Protein in *L. m.* [pcos8] deutlich überexprimiert (Bahn 3, 4) und die Expression ist noch wesentlich stärker in den Parasiten, in denen der für die RNA-Helicase kodierende offene Leserahmen in den rRNA-Genlocus integriert ist (Bahn 5, 6). Durch den Einsatz von 2×10^7 lysierten Zellen des *L. donovani*-Wildtyp-Stamms konnte im Immun-Blot ein entsprechendes Protein schwach sichtbar gemacht werden (Abb. 25E: Bahn 3, 4, 5). Diese Proteinmenge reichte allerdings immer noch nicht für einen Nachweis in *L. major* aus. In

L. donovani konnte das Protein sowohl im Promastigoten-Lysat (E: Bahn 3), als auch im Lysat axenischer Amastigoten (Abb. 25E: Bahn 5) sichtbar gemacht werden, während im Lysat hitzebehandelter Parasiten die dem Protein entsprechende Bande eine wesentlich geringere Intensität aufweist (Abb. 25E: Bahn 4). Im Vergleich zum *L. m. [pcos8]*-Stamm (Abb. 25, E: Bahn 6), von dem nur 3×10^6 lysierte Zellen aufgetragen wurden, wird deutlich, wie schwach die Expression der mutmaßlichen RNA-Helicase im *L. major*- und im *L. donovani*-Wildtyp ist.

Die Qualität des anti-Helicase-Antikörpers war ausreichend für den Nachweis der intrazellulären Lokalisation des Proteins durch Immun-Elektronenmikroskopie, die freundlicherweise von M. Krömer durchgeführt wurde. Abbildung 26 zeigt, dass die mutmaßliche RNA-Helicase in *L. donovani*-Promastigoten im Kern, und zwar im Bereich der Kernhülle lokalisiert ist. Dies trifft ebenfalls für axenische und echte Amastigote zu (nicht dargestellt). Im Immun-Blot gelang es trotz des Einsatzes großer Proteinmengen nicht, das Protein in *L. major*-Lysaten sichtbar zu machen, was möglicherweise auch darauf zurückgeführt werden kann, dass der Farbnachweis durch NBT und X-Phosphat für den Nachweis von sehr schwach exprimierten Proteinen nicht empfindlich genug ist. Durch die Immun-Elektronenmikroskopie gelang es dennoch die mutmaßliche RNA-Helicase auch in *L. major* nachzuweisen, wo sie, wie in *L. donovani*, sowohl in Promastigoten als auch in Amastigoten in der Kernhülle lokalisiert ist (nicht dargestellt).

Die anti-DSP-Antikörper reagieren ebenfalls stark mit dem rekombinanten Protein, dessen vollständiges Genprodukt ein apparentes Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufweist (Abb. 25F: Bahn 1). Im Immun-Blot sind auf der Höhe von 70 kDa in den Bahnen mit den Lysaten der *Leishmania*-Stämme, welche die DSP aus *L. donovani* überexprimieren, allerdings zwei Banden zu erkennen. Die Expression der entsprechenden Proteine ist in *L. m. [pcos8]* (Abb. 25G: Bahn 7) offensichtlich wesentlich geringer, als im *L. donovani*-Stamm, der den für die DSP kodierenden ORF im rRNA-Genlocus trägt (Abb. 25G: Bahn 1). Im Lysat des *L. major*-Stamms *L. m. (pIR/A-L.m.DSP)* (Abb. 25G: Bahn 2), der die DSP aus *L. major* überexprimiert, erkennen die anti-DSP-Antikörper jedoch nur ein knapp 70 kDa großes Protein. In Lysaten der *L. donovani*- und *L. major*-Wildtyp-Stämme war ein Protein im Bereich von 70 kDa auch bei Einsatz hoher Zellzahlen 2×10^7 nicht nachweisbar (Abb. 25G: Bahn 3 und 4 bzw. 5 und 6). Die Antikörper reagieren dagegen mit einigen kleineren und auch größeren *Leishmania*-Proteinen, die nicht von den Prä-Immun-Antikörpern erkannt werden. Anscheinend ist die mutmaßliche DSP ein Protein, das in *Leishmania* nur sehr schwach exprimiert wird, so dass die hergestellten anti-DSP-Antikörper nur für Untersuchungen an überexprimierenden Stämmen einsetzbar sind.

Abbildung 25 (folgende Seiten): Nachweis von Proteinen durch die aus der Immunisierung von Legehennen mit rAdaptin (A), rORF3 (B), rHelicase (C, D, E) und rDSP (F, G) hervorgegangenen polyklonalen Antikörper (IgY)

A: Logarithmisch wachsende Zellen der über den Bahnen angegebenen *L. major*-Stämme wurden bei 25°C kultiviert oder ca. 24 h bei 37°C inkubiert, anschließend sedimentiert und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Jeweils 3×10^6 solubilisierte Zellen, sowie 5 μ l rAdaptin in SDS-Probenpuffer wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und nachfolgend im Rahmen einer Western-Blot-Analyse auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proteine wurden entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht (rechts) oder mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Für den immunologischen Nachweis wurden die Membranabschnitte mit Antikörpern gegen Adaptin (anti-Adaptin-IgY, links) bzw. mit Antikörpern, die vor der Immunisierung des entsprechenden Huhns (Prä-Immun, mittlerer Abschnitt) gewonnen wurden, behandelt. An die Antikörper wurde nachfolgend ein anti-Huhn-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat gekoppelt. In die Farbreaktion wurden NBT und X-Phosphat als Substrat für das Enzym eingesetzt. Als Marker diente eine 10 kDa-Protein-Leiter. Die Positionen und die molekulare Masse der Markerproteine sind rechts angegeben. Der Pfeil links markiert die dem Adaptin entsprechende Bande.

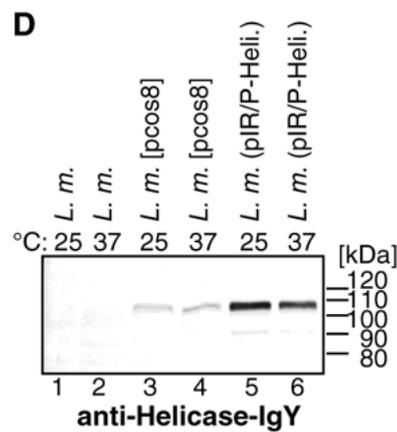
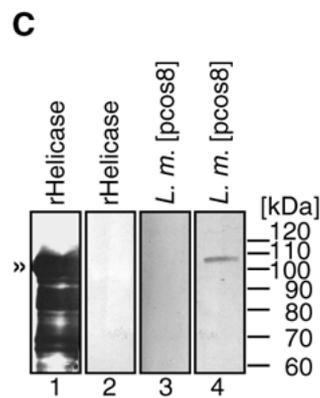
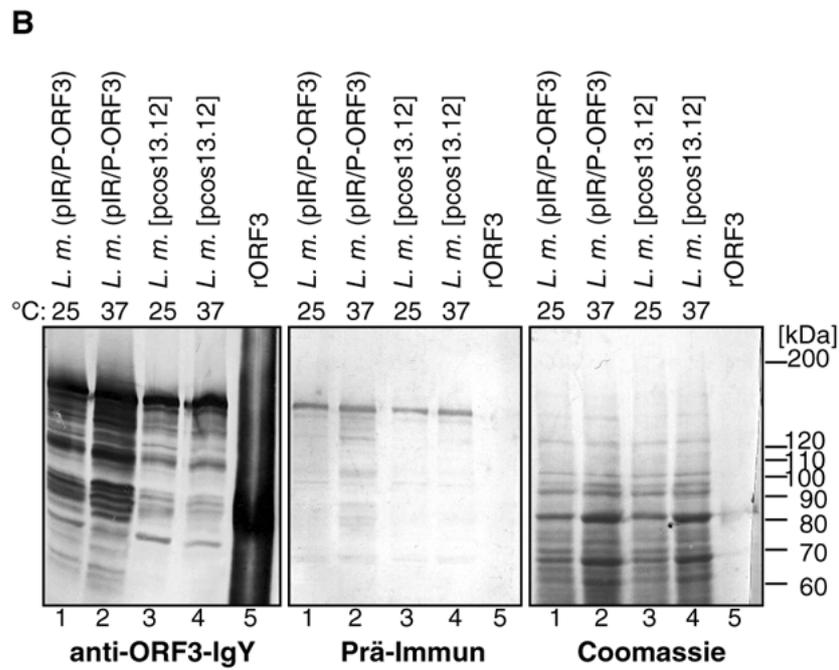
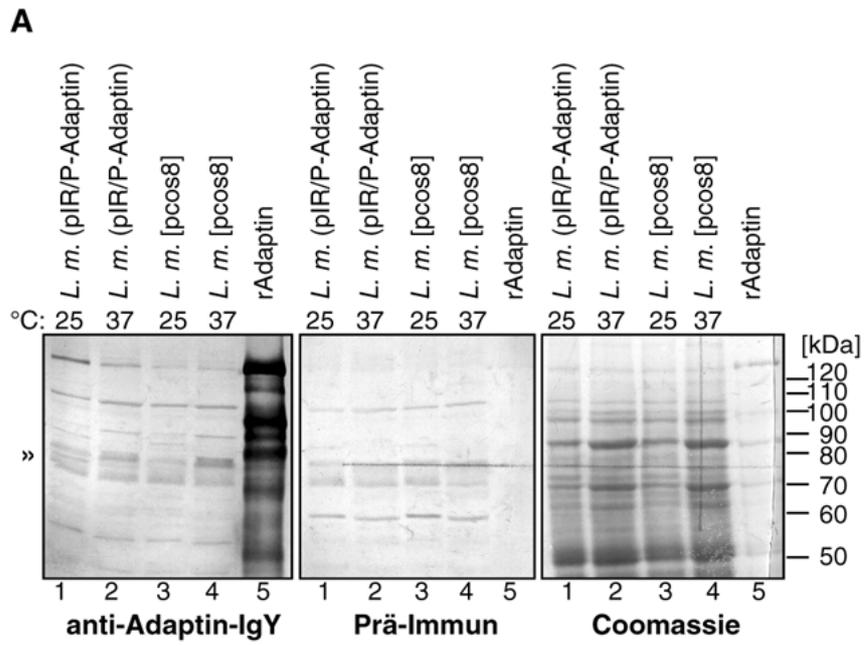
B: Der Versuch wurde wie unter A beschrieben durchgeführt, jedoch mit den über den Bahnen angegebenen *L. major*-Stämmen. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern gegen ORF3 und den entsprechenden Antikörpern, die vor der Immunisierung isoliert wurden. Von rORF3 wurden 3 μ l aufgetragen.

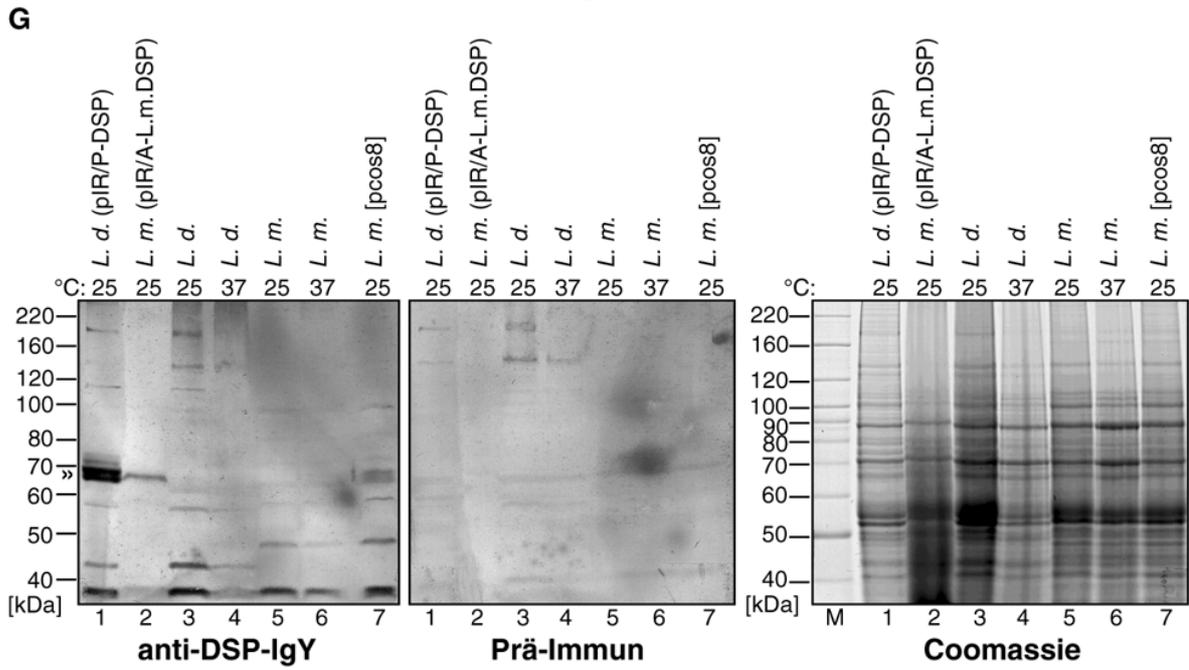
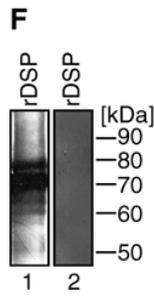
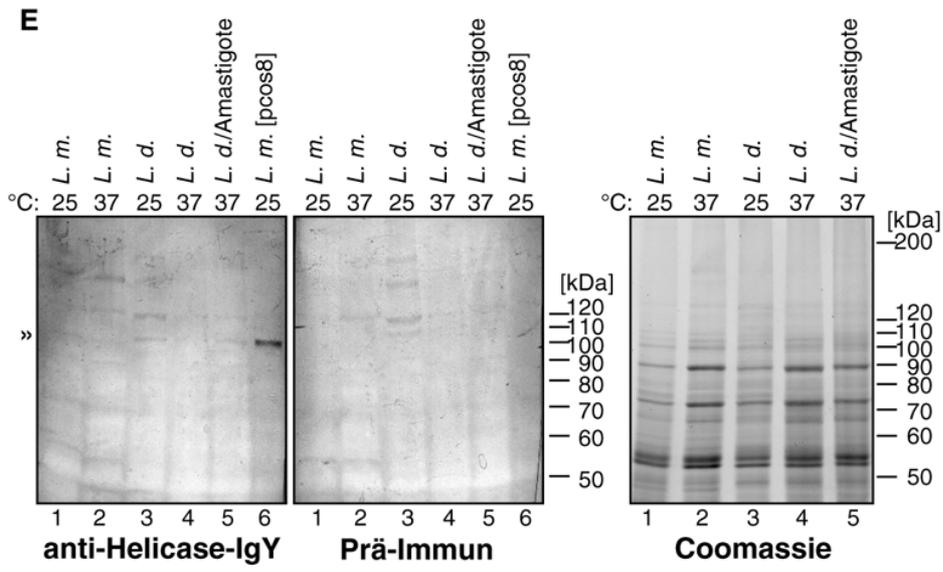
C: 5 μ l rHelicase in SDS-Probenpuffer (Bahn 1, 2) bzw. 3×10^6 in SDS-Probenpuffer solubilisierte Promastigote des *L. major*-Stamms *L. m. [pcos8]* (Bahn 3, 4) wurden wie unter A beschrieben aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Für den Nachweis wurden anti-Helicase-Antikörper (Bahn 1, 4) und die vor Immunisierung isolierten Antikörper (Bahn 2, 4) eingesetzt.

D: Dargestellt ist ein immunologischer Nachweis unter Verwendung des anti-Helicase-Antikörpers. Die Durchführung erfolgte wie unter A beschrieben, jedoch wurde das 2×10^6 Zellen entsprechende Gesamtprotein der über den Bahnen angegebenen *L. major*-Stämme aufgetragen.

E: Der Stamm *L. m. [pcos8]* und der *L. major*-Wildtyp wurden, wie über den Bahnen angegeben, bei 25°C oder 37°C kultiviert. Der *L. donovani*-Wildtyp wurde einer Stadiendifferenzierung unterzogen. Promastigote Zellen wurden bei 25°C in M199-Medium (pH 7,0) kultiviert und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in saurem M199-Medium (pH 5,5) aufgenommen und weitere 5 Tage bei 37°C kultiviert. Für den Versuch wurden amastigote Stadien, die 3 Tage in saurem Medium bei 37°C gehalten wurden, eingesetzt. 3×10^6 in SDS-Probenpuffer solubilisierte Zellen wurden in dem rechts abgebildeten mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. 2×10^7 bzw. 3×10^6 (*L. m. [pcos8]*) in SDS-Probenpuffer lysierte Zellen wurden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel, wie unter A beschrieben, einer Immun-Blot-Analyse unterzogen, wobei der anti-Helicase-Antikörper und die entsprechenden vor Immunisierung isolierten Antikörper verwendet wurden.

F/G: 3 μ l rDSP (F) oder 2×10^7 in SDS-Probenpuffer lysierte Zellen der über den Bahnen angegebenen *Leishmania*-Stämme (G) wurden wie unter A beschrieben in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Entweder wurden die Proteine auf eine Membran transferiert (F und G, linker und mittlerer Abschnitt), die nachfolgend mit anti-DSP-Antikörpern (F: Bahn 1, G: links) bzw. mit vor der Immunisierung isolierten Antikörpern (F: Bahn 2, G: mittlerer Abschnitt) behandelt wurden, oder durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau (G, rechts) sichtbar gemacht.





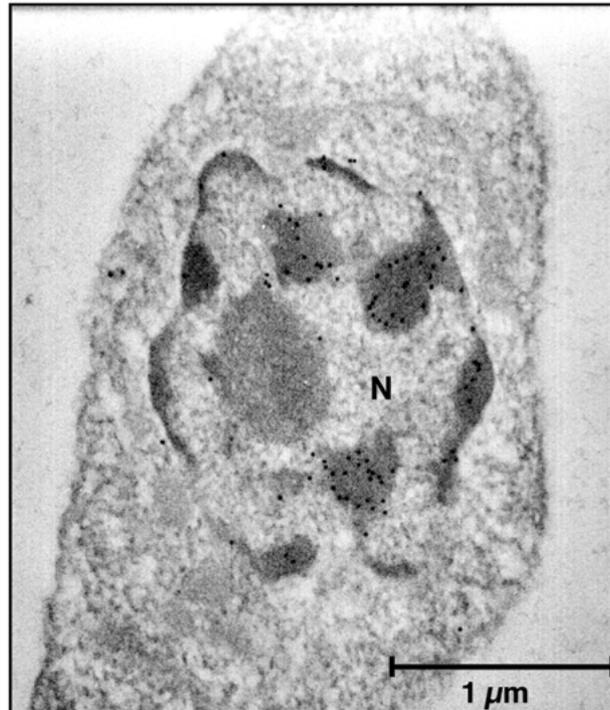


Abbildung 26: Intrazelluläre Lokalisation der RNA-Helicase durch Immun-Elektronenmikroskopie

Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen. Ultradünnschnitte von in L. R. White eingebetteten promastigoten *L. donovani*-Zellen wurden mit anti-Helicase-Antikörpern inkubiert. Zum Nachweis der Antikörper-Bindung wurden die Schnitte nachfolgend mit Kaninchen-anti-Huhn-IgG und Protein A-Gold (10 nm) behandelt.

3.13 Infektiösität der *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-DSP) und *L. m.* (pIR/A-PDE)

Die konkurrierende Selektion der *L. major* (pIR/A)-Stämme (3.10.3) in der BALB/c-Maus ergab, dass der *L. major* durch die Cosmide pcos8 bzw. pcos13.12 vermittelte Selektionsvorteil möglicherweise auf die mutmaßliche DSP bzw. PDE zurückzuführen ist, wobei der durch die DSP erzielte Effekt wesentlich stärker zu sein scheint. In einem ersten Versuch zur Überprüfung der Ergebnisse sollten die Infektiösität der Stämme und die Parasitenlast in Milz und Lymphknoten der infizierten Mäuse miteinander verglichen werden. Jeweils fünf BALB/c-Mäuse wurden mit den Stämmen *L. m.* (pIR/A-DSP), *L. m.* (pIR/A-PDE) oder *L. m.* (pIR) als Kontrolle infiziert. In den Versuch wurde außerdem der Stamm *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) einbezogen, der mit einem pIR-Konstrukt, welches das PDE-Homolog aus *L. major* (2.1.8) enthält, infiziert worden war.

Der Infektionsverlauf wurde durch regelmäßige Messung der Fußballendicke verfolgt und ist in Abbildung 27A dargestellt. Die Entwicklung der Läsionen bei den mit *L. m.* (pIR/A-DSP) und *L. m.* (pIR) infizierten Mäusen unterscheidet sich kaum. Nach ca. zwei Wochen war eine leichte Schwellung messbar, die im weiteren Verlauf stetig zunahm. Mit der Ausnahme, dass die jeweils gemessene Fußballendicke der mit *L. m.* (pIR/A-PDE) infizierten Mäuse etwas niedriger war, konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Läsionsentwicklung beobachtet werden. Bei den mit *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) infizierten Mäusen war jedoch die Zeit bis zur Entwicklung einer deutlichen Läsion um 1,5 bis 2 Wochen verzögert. Nach 24 Tagen

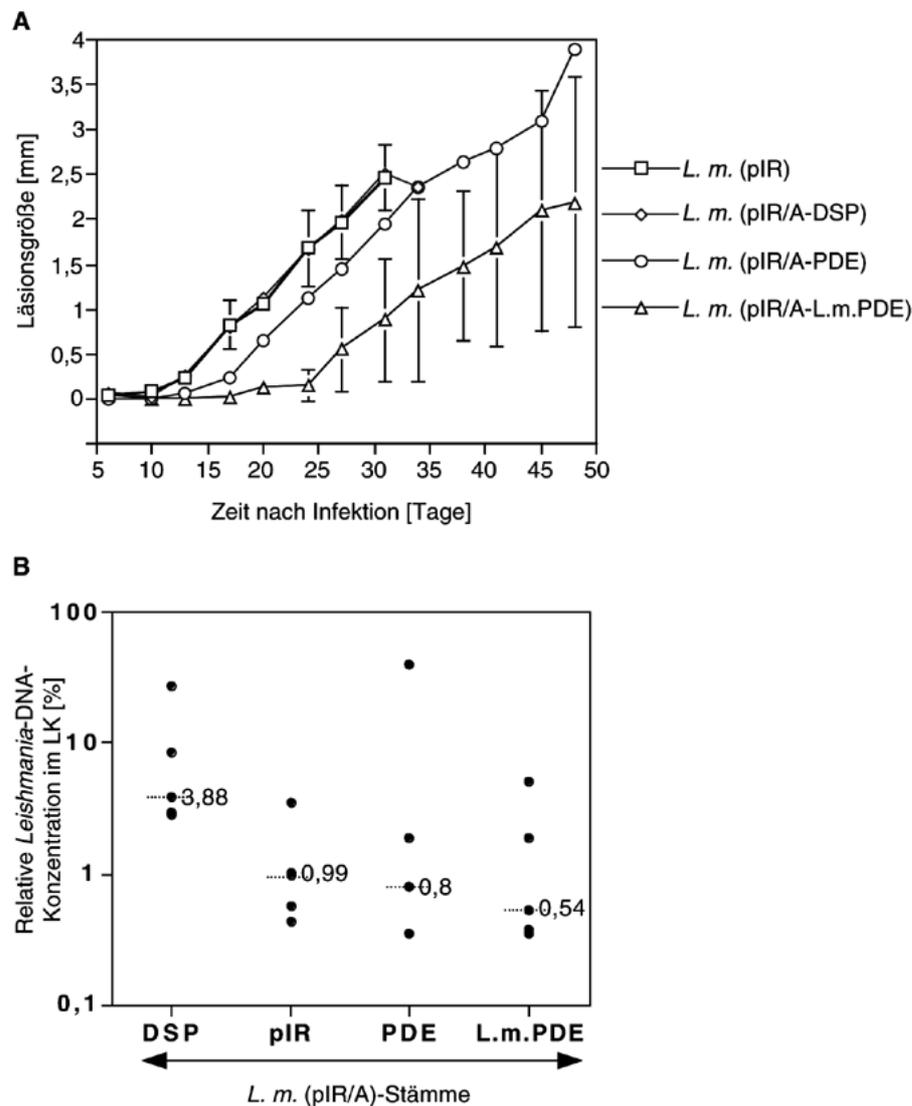


Abbildung 27: Infektiösität der *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-DSP) und *L. m.* (pIR/A-PDE)

A: Je 5 BALB/c-Mäuse wurden mit den *L. major*-Stämmen *L. m.* (pIR), *L. m.* (pIR/A-DSP), *L. m.* (pIR/A-PDE) bzw. *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) infiziert. Es wurden jeweils 5×10^7 Zellen für die Infektion eingesetzt. Der Infektionsverlauf wurde durch Messung der Fußballendicke zweimal wöchentlich dokumentiert. Angegeben sind Mittelwerte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur bei den Infektionsverläufen der mit dem Kontrollstamm *L. m.* (pIR) und mit dem Stamm *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) infizierten Mäuse die Standardabweichungen dargestellt.

B: Die Mäuse wurden nach 60 Tagen getötet und Milzen und Lymphknoten entnommen. Aus jeweils 1/4 Milz und einem halben Lymphknoten wurde die genomische DNA isoliert und ein Aliquot der Proben in eine *real-time*-PCR eingesetzt, um die Parasitenlast zu bestimmen. Für die relative Quantifizierung zum Vergleich der Parasitenlast der mit den unterschiedlichen Stämmen infizierten Mäuse wurde jeweils eine Reaktion mit Oligonukleotiden zur Amplifikation eines *Leishmania*-DNA-spezifischen Fragments und eine Reaktion zur Amplifikation eines Maus-DNA-spezifischen Fragments durchgeführt. Aus den Resultaten wurde ein Quotient gebildet und die Parasitenlast des Organs somit als Anteil der *Leishmania*-DNA an der Maus-DNA ausgedrückt. Dargestellt sind die mit der genomischen DNA aus den Lymphknoten erzielten Ergebnisse. Der Median ist angegeben.

vergrößerten sich dann die Läsionen bei drei Mäusen in gleicher Weise, wie bei den Mäusen, die mit dem Kontroll-Stamm infiziert worden waren, während dies bei einer Maus erst nach weiteren 10 Tagen der Fall war und eine Maus über den Versuchszeitraum nur geringfügige Läsionen entwickelte. Aufgrund dessen ergaben sich große Standardabweichungen bei den späteren Messungen. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass sich nach der Infektion herausgestellt hat, dass innerhalb der Mauszucht eine Infektion mit Hepatitis-Viren aufgetreten ist. Die für den Versuch verwendeten Mäuse wurden dahingehend untersucht. Mit Ausnahme der mit *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) infizierten Mäuse lag bei allen Tieren eine Virus-Infektion vor. Dennoch war der beobachtete Infektionsverlauf im Vergleich zu früheren Versuchen nicht progressiver.

Nach 60 Tagen wurden die Mäuse getötet und Milzen und Lymphknoten entnommen. Aus einem Teil der Organe wurde nach Homogenisierung und Lyse der Zellen die genomische DNA isoliert und zur Bestimmung der Parasitenlast eingesetzt, die in diesem Fall durch *real-time*-PCR (2.2.12) erfolgte. Es handelte sich dabei um eine relative Quantifizierung, bei der jede Probe hinsichtlich ihres relativen *Leishmania*-DNA- und Maus-DNA-Gehalts untersucht und aus den erhaltenen Resultaten ein Quotient gebildet wurde, der ein Maß für die Parasitenlast des Organs darstellt.

Durchführung und Auswertung der *real-time*-PCR wurden freundlicherweise von A. Schulz und S. Graefe (Medizinische Zentral Diagnostik, BNI) übernommen.

Die mit der genomischen DNA aus den Lymphknoten-Proben erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 27B dargestellt. Insgesamt gesehen scheint die Parasitenlast in den Lymphknoten der mit *L. m.* (pIR/A-DSP) infizierten Mäuse am höchsten zu sein. Ausgehend vom Median der teilweise relativ stark schwankenden Werte, ist die Parasitenlast um ca. das Vierfache höher, als bei den Mäusen, die mit dem Kontrollstamm infiziert worden waren. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen, die nicht aus dem Verlauf der Läsionsentwicklung ersichtlich waren, haben sich als nicht zufällig erwiesen (U-Test: Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 2,5\%$). Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Dicke der Fußballen, als Maß für den Grad der Infektion, mit der Parasitenlast korreliert, und zwar auch in der Leber, der Milz und den Lymphknoten (Hill, 1986). Nach den geschilderten Ergebnissen scheint dies nicht unbedingt der Fall zu sein. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass Unterschiede bereits an der Läsionsentwicklung erkennbar gewesen wären, wenn für die Infektion eine geringere Parasitenzahl eingesetzt worden wäre.

Die durch die *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-PDE) und *L. m.* (pIR/A-L.m.PDE) hervorgerufene Parasitenlast scheint sich nicht sehr von der des Kontrollstamms zu unterscheiden. Daraus zu schließen, dass die *L. donovani*-PDE keinen Effekt hat, wäre angesichts der stark schwankenden Einzelwerte, insbesondere im Hinblick auf den Lymphknoten aus Maus 2 mit dem höchsten der ermittelten Werte, verfrüht. Da keine gesamten Organe für die Isolierung der genomischen DNA verwendet worden waren, können Schwankungen aufgrund einer ungleichen Verteilung der Parasiten innerhalb der Organe nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des Versuchs sind daher mit Vorsicht zu interpretieren und bedürfen einer Überprüfung. Jedoch lieferte der Versuch zumindestens einen Hinweis darauf, dass durch Überexpression der *L. donovani*-DSP möglicherweise die Proliferation von *L. major* im Säugetierwirt gefördert wird. Eine Aussage hinsichtlich einer verstärkten Viszeralisierung ist nicht möglich, da die Quantifizierung der *Leishmania*-DNA mit der genomischen DNA aus den Milz-Proben nicht erfolgreich war.

4. Diskussion

Im Verlauf ihres digenetischen Lebenszyklus werden alle *Leishmania*-Spezies mit drastischen Umweltänderungen konfrontiert. Promastigote Stadien proliferieren im Verdauungstrakt des Überträger-Insekts bei Temperaturen von ca. 25°C in einem basischen Milieu. Werden die Parasiten in die Haut eines Säugetierwirts übertragen, erfahren sie einen unmittelbaren und extremen Temperaturanstieg, der eine Induktion von Thermotoleranz zeitlich nicht ermöglicht. Aufgrund eines offensichtlich hohen Maßes an basaler Thermotoleranz sind Leishmanien jedoch in der Lage, den ca. 10°C höheren Temperaturen zu widerstehen. In den Makrophagen, im sauren Milieu des Phagolysosoms, differenzieren die Parasiten in die amastigote Form und vermehren sich. Die Amastigoten viszeralisierender *Leishmania*-Spezies breiten sich weiter im Säugetierwirt aus. Sie befallen Makrophagen, insbesondere der Milz, Leber und des Knochenmarks, wo sie Temperaturen von bis zu 40°C ausgesetzt sind.

Untersuchungen zur Thermotoleranz von *in vitro* kultivierten Amastigoten und Promastigoten zeigten, dass der permissive Temperatur-Bereich dermatroper *Leishmania*-Spezies nicht über die bei ca. 35°C liegenden Temperaturen ihres Zielorgans im Säugetierwirt, der Haut, hinausgeht. Viszeralisierende *Leishmania*-Spezies dagegen tolerieren auch *in vitro* die in den inneren Organen vorherrschenden höheren Temperaturen (Berman und Neva, 1981; Biegel *et al.*, 1983; Sachs *et al.*, 1983; Callahan *et al.*, 1996). Diese Korrelation zwischen der Temperatur-Toleranz verschiedener *Leishmania*-Spezies und ihrem jeweiligen Tropismus im Säugetierwirt könnte einen ursächlichen Zusammenhang widerspiegeln. Bislang ist jedoch noch unklar, ob die Thermotoleranz viszeralisierender *Leishmania*-Spezies tatsächlich für die Ausbreitung der Parasiten in den inneren Organen mitverantwortlich ist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methode der funktionellen genetischen Komplementation angewandt, um Determinanten erhöhter Thermotoleranz aus *L. donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniase zu identifizieren und zu isolieren, sowie deren Einfluss auf den Tropismus des Temperatur-empfindlicheren Erregers der kutanen Leishmaniase, *L. major*, zu untersuchen.

4.1 Genetische Komplementation erlaubt die Identifizierung und Isolierung von Genen nach ihrer Funktion

Die Anwendung reverser genetischer Methoden ist auf bereits identifizierte Gene beschränkt. Die Auswahl von Kandidatengenen für die Funktionsanalyse in Zusammenhang mit einem zu untersuchenden Phänomen, wie beispielsweise Thermotoleranz, kann aufgrund der Homologie zu Genen bekannter Funktion aus anderen Organismen erfolgen. Da aber keinesfalls sicher ist, dass ein ausgewähltes Gen auch im untersuchten Organismus eine äquivalente Funktion erfüllt, stellt diese Vorgehensweise ein Risiko dar. So ist zwar die Thermotoleranz-vermittelnde Funktion von Mitgliedern der HSP100-Familie in unterschiedlichen Organismen wie Prokaryonten, Hefe und Pflanzen hoch konserviert (Schirmer *et al.*, 1996), für *L. donovani* trifft dies jedoch nicht zu. Die Deletion des für HSP100 kodierenden *ClpB*-Gens wirkte sich nicht beeinträchtigend auf die Thermotoleranz der mutanten Parasiten aus, und auch in *L. major* hat HSP100 nur einen geringfügigen Einfluss auf die Thermotoleranz (Hübel *et al.*, 1997; Krobtsch *et al.*, 1999).

Selbst bei Proteinen mit ausgeprägter Homologie kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um wahre Orthologe handelt. So bedarf es beispielsweise nur weniger

Änderungen des aktiven Zentrums eines Enzyms, um dessen Substratspezifität zu verändern. Umgekehrt kann eine zu starke Divergenz der Sequenzen dazu führen, dass Homologe nicht als solche in Betracht gezogen werden (Moxon *et al.*, 2002). Eine Vorauswahl basierend auf der Ähnlichkeit zu bekannten Homologen birgt somit auch die Gefahr in sich, dass entscheidende Determinanten des interessierenden Phänomens nicht erfasst werden, weil Faktoren außer Acht gelassen werden, von denen man nicht annimmt, dass sie involviert sein könnten oder auch weil es sich um noch unbekannte Faktoren handelt.

Durch genetische Komplementation ist dagegen eine unvoreingenommene Identifizierung und Isolierung von Genen, die an einem bestimmten zellulären Prozess beteiligt sind, möglich. Die Methode hat den großen Vorteil, dass sie sich ausschließlich auf den Phänotyp stützt und bezüglich Art und Beschaffenheit der Gene nichts vorausgesetzt wird. Dadurch ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhaltenen Gene tatsächlich an dem untersuchten Prozess beteiligt sind (Beverley und Turco, 1995; 1998; Beverley *et al.*, 2002). Ausgehend von Mutanten oder natürlich vorkommenden Varianten, die einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich veränderten Phänotyp hinsichtlich des untersuchten Phänomens aufweisen, können die zugrunde liegenden molekularen Determinanten durch Einschleusung einer Genbank aus dem Wildtyp-Genom in den Organismus und Selektion auf den Wildtyp-Phänotyp identifiziert werden.

Es ist möglich, für Komplementationsstudien sowohl genomische- als auch cDNA-Bibliotheken einzusetzen. Jedoch muss bei Verwendung einer cDNA-Bibliothek damit gerechnet werden, dass Gene, die in der Zelle nur auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden, mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit in der Bibliothek repräsentiert sind. Außerdem sind große Gene möglicherweise nicht als vollständige Kopien in der Bibliothek enthalten. Handelt es sich möglicherweise um Entwicklungs-regulierte oder Gewebe-spezifisch exprimierte Gene oder um Gene, die nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen exprimiert werden, ist es erforderlich, dass die RNA für die Herstellung der cDNA auch aus den Zellen gewonnen wird, die solche Gene am stärksten exprimieren (Agnan *et al.*, 1997). Entsprechend wäre bei der Untersuchung von *Leishmania* zu bedenken, welche Entwicklungsstadien, prozyklische Promastigote, metazyklische Promastigote oder Amastigote, als Ausgangspunkt in Frage kämen. Hinsichtlich bestimmter Fragestellungen, so auch bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Thermotoleranz und Tropismus, ist es sicherlich nicht ausreichend, sich auf eine cDNA-Bank aus den relativ einfach *in vitro* kultivierbaren Promastigoten zu beschränken. Methoden zur Anreicherung und Isolierung von metazyklischen Promastigoten aus *in vitro* kultivierten Promastigoten-Populationen wurden beschrieben (Lira *et al.*, 1998; Späth und Beverley, 2001). Einige *Leishmania*-Spezies, u. a. auch *L. donovani*, sind ebenfalls einer *in vitro*-Differenzierung in die amastigote Form zugänglich (Pan, 1984; Pan und Pan, 1986; Doyle *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1991; Bates *et al.*, 1992; 1993; 1994; Joshi *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1993; Zilberstein und Shapira, 1994; Hodgkinson *et al.*, 1996; Saar *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2001). Jedoch konnten die Bedingungen für eine axenische Umwandlung dermatroper Spezies wie *L. major*, *L. tropica* oder *L. aethiopica* bislang nicht ermittelt werden. Amastigote lassen sich in diesen Fällen nur aus infizierten Versuchstieren gewinnen. Allerdings besteht dabei die Gefahr, dass die isolierten Parasiten mit Zellen des Wirtsgewebes kontaminiert sind.

Für die Herstellung genomischer DNA-Bibliotheken stehen *Leishmania*-*E. coli* shuttle-Vektoren wie cLHYG, cLNEO (Ryan *et al.*, 1993a) und pcosTL (Kelly *et al.*, 1994) zur Verfügung. Diese Cosmid-Vektoren besitzen eine hohe DNA-Kapazität von ca. 40 kb, wodurch bereits mit weniger als 1000 Cosmid-Klonen eine minimale Abdeckung des ca. $3,6 \times 10^7$ bp großen

Leishmania-Genoms (Wincker *et al.*, 1996) erreicht werden kann. Die Möglichkeit des Einsatzes großer DNA-Fragmente erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit, dass neben Gensequenzen auch die für die Genexpression und Replikation erforderlichen regulatorischen Sequenzen beinhaltet sind und möglicherweise ganze der in Kinetoplastiden häufig vorkommenden Gencluster mit mehreren tandemartig angeordneten Genkopien inseriert werden können.

Pedroso und Cruz (2002) haben Untersuchungen zur Transkription von Genen in großen Episomen durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob die Lage eines Gens auf einem Cosmid die Wirksamkeit der funktionellen Komplementation beeinflussen kann. Am Beispiel des *DHFRTS* (Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthase)-Gens haben sie gezeigt, dass eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps unabhängig von der Position und Orientierung des komplementierenden Gens innerhalb eines Cosmid-Inserts erreicht wird.

Abgesehen von der Notwendigkeit, große DNA-Mengen einzusetzen, lassen sich Leishmanien mit einer ausreichend hohen Effizienz transfizieren. Nach Elektroporation und Ausplattierung auf Agar-Platten können durchaus mehr als 1000 Kolonien pro Ansatz erhalten werden. Die Transfektionseffizienz variiert zwar u. a. in Abhängigkeit von der Spezies und den verwendeten DNA-Konstrukten, jedoch ist es auch bei Spezies mit geringerer Transfektionseffizienz kein Problem, die für eine mehrfache Abdeckung des Genoms erforderlichen unabhängigen Transfektanten zu erhalten, wenn die Anzahl der Transfektionsreaktionen entsprechend erhöht wird. Durch die Möglichkeit, das gesamte *Leishmania*-Genom zu durchmustern, ist eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der funktionellen genetischen Komplementation in *Leishmania* erfüllt (Kapler *et al.*, 1990; Coburn *et al.*, 1991; Ryan *et al.*, 1993).

Die Komplementations-Genetik hat sich mittlerweile als ein wertvolles Instrument für die Analyse der molekularen Grundlagen genetischer Merkmale in pathogenen Mikroorganismen wie *Leishmania* erwiesen. So wurden durch diese Methode mehrere Gene identifiziert und charakterisiert, die an der Biosynthese der Virulenz-Determinante LPG und zum Teil auch anderer Glykokonjugate beteiligt sind (Ryan *et al.*, 1993b; Descoteaux *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Descoteaux *et al.*, 1998; Beverley und Turco, 1998; Descoteaux *et al.*, 2002).

Die Anwendung der Methode u. a. mit dem Ziel einen Einblick in die Biogenese von Glycosomen zu erhalten führte zur Identifizierung eines Gens, das den Import glycosomaler Proteine beeinflusst (Flaspohler *et al.*, 1997).

Die funktionelle Komplementation wurde ebenfalls erfolgreich bei der Identifizierung mehrerer Nucleosid-Transporter-Gene eingesetzt (Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000).

Ausgegangen wurde bei den genannten Beispielen von Mutanten, die durch chemische Mutagenese erhalten wurden. Die Erzeugung von Mutationen in *Leishmania* ist jedoch nicht unproblematisch (Beverley und Turco, 1995; 1998). Zum einen liegen viele Gene in mehreren Kopien, sogenannten *tandem repeats*, vor und zum anderen handelt es sich bei *Leishmania* um einen diploiden asexuellen Organismus (Cruz *et al.*, 1993; Panton *et al.*, 1991; Tibayrenc *et al.*, 1990). Für die Inaktivierung eines Gens sind daher mindestens zwei unabhängige Ereignisse erforderlich oder die Unterbrechung eines Allels durch eine Mutation gefolgt von einem Mechanismus, der den Verlust der Heterozygotie bewirkt. Sogar nach schwerer Mutagenese treten Mutationen, die zu einem Verlust der Genfunktion führen, in *Leishmania* nur mit einer relativ geringen Häufigkeit von ca. 10^{-7} auf (Gueiros-Filho und Beverley, 1996).

Zellen, die einer chemischen Mutagenese unterzogen wurden, können zudem mehrere verschiedene Mutationen aufweisen, und dadurch die Analyse komplexer Phänomene wesentlich komplizieren (Clayton, 1999).

Diese Probleme stellen sich allerdings nicht bei einer Variante der Methode, die auf der Übertragung eines Phänotyps basiert und somit nicht unbedingt von der Herstellung und Selektion geeigneter Mutanten abhängt. Zur Isolierung von *Leishmania*-Genen, die eine Medikamenten-Resistenz vermitteln, wurde dieser Weg erfolgreich beschritten. Da episomale Vektoren, wie auch die genannten Cosmid-Vektoren, in der Zelle in zahlreichen Kopien vorliegen (Ryan *et al.*, 1993a; Kelly *et al.*, 1994), wird durch Transfektion einer Cosmid-Genbank auch die Kopienzahl putativer Resistenz-Gene erhöht und somit ein Mechanismus, der zur Entwicklung einer Medikamenten-Resistenz in *Leishmania* beiträgt, nämlich die Amplifikation bestimmter Genloci und die Überexpression der entsprechenden Genprodukte, erreicht. Neben einem Gen, das eine Methotrexat-Resistenz vermittelt und für einen hochaffinen Biopterin-Transporter kodiert (Kündig *et al.*, 1999), wurden in weiteren Studien viele verschiedene Wirkstoffe getestet und zahlreiche bekannte und bis dahin unbekannte Resistenz-Genloci identifiziert (Cotrim *et al.*, 1999).

Auch für die Identifizierung und Isolierung Thermotoleranz-vermittelnder Gene aus *L. donovani* wurde eine auf einem übertragenen Phänotyp basierende Strategie angewandt. Dabei wurde die unterschiedliche Temperatur-Toleranz von *L. major* und *L. donovani* als Selektionskriterium ausgenutzt. Als die Temperatur-empfindlichere Spezies wurde *L. major* mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert. Die rekombinanten Parasiten wurden nachfolgend einer Selektion bei für *L. major* nicht-permissiven Temperaturen unterzogen (Abb.2).

Die für die Transfektion von *L. major* eingesetzte, ca. 100.000 unabhängige Klone umfassende genomische *L. donovani* Cosmid-Genbank hatte ich bereits während meiner Diplomarbeit unter Verwendung des Cosmid-Vektors pcosTL (Kelly *et al.*, 1994, Abb.1) hergestellt und somit die Voraussetzung für einen solchen *screen* geschaffen.

Die durchschnittliche Insert-Größe der Cosmide beträgt ungefähr 38 kb. Diesen Wert zugrunde legend, wären bereits 947 Klone zur Repräsentation des *Leishmania*-Genoms ausreichend. Erfolgt die Berechnung auf der Grundlage der Poisson-Verteilung, wobei mit einbezogen wird, dass die inserierten DNA-Fragmente überlappende Gensequenzen aufweisen können, umfassen 4360 unabhängige Klone mit einer 99%igen Wahrscheinlichkeit das gesamte *Leishmania*-Genom.

Die Transfektion des *L. major*-Wildtyps mit dieser Cosmid-Genbank resultierte in durchschnittlich 672 +/- 298 Transfektanten pro Ansatz (3.1.2.1, Tabelle 1). Kapler *et al.* (1990) und Coburn *et al.* (1991) haben bei ihren Untersuchungen mit den von ihnen verwendeten Konstrukten zum Teil höhere Transfektionseffizienzen für *L. major* ermittelt. Pro Ansatz wurden durchschnittlich mehr als 1000 Transfektanden erhalten. Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden jedoch die Parasiten erst 24 Stunden nach der Elektroporation auf Antibiotika-haltige Agar-Platten ausplattiert. Die in dieser Zeit stattfindende Vermehrung der Zellen wirkt sich auf die letztlich erhaltene Kolonienzahl aus. Bei einer *limiting dilution*-Analyse, bei der die Parasiten direkt nach der Elektroporation seriell in Mikrotiterplatten verdünnt werden, hat das Wachstum der Zellen in der Erholungsphase dagegen keinen Einfluss auf das Ergebnis, so dass man davon ausgehen kann, dass eine vergleichbare reale Transfektionseffizienz erzielt wurde.

Insgesamt wurden 20 Transfektionen durchgeführt.

4.1.1 Cosmide aus einer genomischen *L. donovani*-DNA-Bibliothek verleihen *L. major* einen Selektionsvorteil bei höheren Temperaturen

Rekombinante *L. major*-Promastigote überlebten im Gegensatz zu den Parasiten des Kontrollansatzes eine bis zu sechstägige oder noch längere Selektion bei 37°C (3.1.2.2).

Bereits die Restriktionsanalyse der aus den überlebenden Leishmanien isolierten Cosmid-DNA deutete darauf hin, dass die Heterogenität der rekombinanten Zellen (3.1.2.1; Abb.3) durch die Temperatur-Selektion drastisch eingeschränkt wurde und nur Parasiten mit bestimmten Cosmiden aus der Selektion hervorgegangen sind (3.1.2.3; Abb.4). Das ist ein Hinweis darauf, dass den Parasiten nur durch bestimmte Cosmide ein Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen vermittelt wird. Die Restriktionsanalyse der Cosmid-DNA aus den nach der Transformation erhaltenen Bakterienklone zeigte, dass in den überlebenden Leishmanien der verschiedenen Ansätze tatsächlich jeweils nur 1 bis 2 unterschiedliche Cosmide vorhanden waren (3.1.2.3; Abb.5).

Neben drei Cosmiden (pcos8, pcos7.1, pcos7.2), die aus den Temperatur-Selektionen während meiner Diplomarbeit resultierten, konnten auf diese Weise 7 weitere Cosmide (pcos10.5, pcos11.2, pcos11.3, pcos12.1, pcos13.4, pcos13.12, pcos14.4) identifiziert werden.

Es scheint also durch die Einschleusung des *L. donovani*-Genoms in *L. major* möglich zu sein, auf die Temperatur-empfindlichere *Leishmania*-Spezies die Fähigkeit zu übertragen, nicht-permissive Temperaturen besser zu widerstehen als der Wildtyp und auf solche rekombinanten Parasiten zu selektieren, die dafür verantwortliche *L. donovani*-Gensequenzen enthalten.

Durch Kreuzhybridisierung (3.2, Abb.6) wurde gezeigt, dass die Cosmide keine überlappenden Sequenzen besitzen. Dies weist einerseits darauf hin, dass Thermotoleranz ein Merkmal ist, das durch viele Faktoren bestimmt wird und nicht einem einzigen Genort zugeschrieben werden kann, was im Grunde genommen auch erwartet wurde. Andererseits bedeutet die Isolierung von ausschließlich unterschiedlichen Cosmiden auch, dass der *screen* nicht vollständig war. Wenn von den oben erwähnten 4360 unabhängigen Klonen ausgegangen wird, die zur Repräsentation des *Leishmania*-Genoms erforderlich sind, wären bei der ermittelten durchschnittlichen Transfektionseffizienz 7 Transfektionen zur Übertragung des *L. donovani*-Genoms auf *L. major* notwendig. Auch wenn einige Transfektionen mit geringerer Effizienz erfolgten, wurde mit den erhaltenen Transfektanten das *Leishmania*-Genom theoretisch ein- bis zweifach abgedeckt. Jedoch beruht die Berechnung nach der Poisson-Verteilung auf der Annahme, dass sich alle Regionen eines Genoms mit gleicher Effizienz klonieren lassen, was aber in keinem der bisher analysierten Organismen der Fall ist (Lottspeich und Zorbas, 1998). Bei *Leishmania* kommt hinzu, dass aufgrund der relativ geringen Größe des Genoms und der großen Anzahl von Chromosomen (36 nach Wincker *et al.*, 1996) ungefähr 5% des Genoms in der Nähe von Telomeren lokalisiert sind. Solche Sequenzen können in Genbanken, für deren Konstruktion partiell verdaute genomische DNA verwendet wurde, unterrepräsentiert sein (Descoteaux *et al.*, 1994).

Für die Durchführung eines vollständigen *screen*s muss anscheinend mit einer weitaus höheren Klonzahl gerechnet werden.

Bei der Anwendung der funktionellen Komplementation zur Identifizierung von Genen, die an der Biosynthese der Virulenz-Determinante LPG beteiligt sind, gelang es stets mehrere Cosmide mit überlappenden Sequenzen zu isolieren. So wurden beispielsweise für die Identifizierung des für eine mutmaßliche β -Galactofuranosyl-Transferase kodierenden *LPG1*-Gens durch Komplementation der *L. donovani*-R2D2-Mutante insgesamt 32000 Transfektanten untersucht und 85 isolierte Cosmide charakterisiert, die sich in 9 unterschiedliche Cosmid-Typen mit überlappenden Sequenzen einteilen ließen (Ryan *et al.*, 1993b). Das *LPG2*-Gen, das für einen Golgi GDP-Mannose-Transporter kodiert, wurde durch Komplementation der C3PO-Mutante identifiziert. Dabei wurden 12000 Transfektanten untersucht und 4 Cosmide mit überlappenden Sequenzen erhalten (Descoteaux *et al.*, 1995). Ein wesentlicher Unterschied zu dem von mir durchgeführten *screen* besteht jedoch darin, dass die Kompensation des Defekts einer Mutante durch eine wesentlich geringere Anzahl an Genen erreicht werden kann, nämlich durch das dem Defekt zugrunde liegende Gen oder möglicherweise auch durch Gene, deren Überexpression eine Suppression des Defekts bewirken. Dagegen ist bei allgemeineren Fragestellungen, wie Thermotoleranz oder auch Virulenz, Tropismus, Differenzierung, die durch funktionelle Komplementation auf der Grundlage eines übertragenen Phänotyps untersucht werden, von vornherein eine Beteiligung vieler unterschiedlicher Genloci zu erwarten, die eine entsprechende Ausweitung eines *screen*s zur Erfassung der involvierten Komponenten notwendig machen. Auch bei der Aufklärung des LPG- Biosynthesewegs ist von der Beteiligung vieler Genloci auszugehen. Es wird vermutet, dass allein an der Biosynthese mindestens 25 Enzyme beteiligt sind. Wie bereits erwähnt besteht jedoch in diesem Fall die Schwierigkeit in der Selektion geeigneter Mutanten, die alle involvierten Komponenten abdecken und nicht unbedingt in der Komplementation der jeweiligen Mutanten (Beverley und Turco, 1998; Beverley *et al.* 2002). Die sehr hohe Anzahl der untersuchten Transfektanten bei der Komplementation der R2D2-Mutante ist wohl eher darauf zurückzuführen, dass *LPG1* das erste durch diese Methode identifizierte *Leishmania*-Gen war. Insbesondere bei stringenten Selektionsmethoden kann bereits eine wesentlich geringere Transfektanzahl ausreichend sein. Für die Identifizierung der Nucleosid-Transporter-Gene *LdNT1.1* und *LdNT1.2* haben Vasudevan *et al.* (1998) 2000 Transfektanten untersucht und dabei 5 positive Klone erhalten. Das Nucleosid-Transporter-Gen *LdNT2* ging aus einem *screen* hervor, der 6000 Transfektanten umfasste und zur Isolierung von zwei Cosmiden mit überlappenden Sequenzen führte (Carter *et al.*, 2000).

Die Durchführung eines vollständigen *screen*s, dessen Umfang nicht abzusehen war, wurde zugunsten einer näheren Untersuchung der im Verlauf der primären Temperatur-Selektionen isolierten 10 unterschiedlichen Cosmide zurückgestellt.

Die Überprüfung und der Vergleich dieser Cosmide hinsichtlich ihrer Fähigkeit auf *L. major* einen Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen zu übertragen, erfolgte durch eine konkurrierende Temperatur-Selektion der durch Transfektion des *L. major*-Wildtyps mit den jeweiligen Cosmiden erhaltenen definierten rekombinanten Stämme (3.3, Abb.7A). Die Bestimmung der Verteilung der aus den überlebenden Parasiten isolierten Cosmide zeigte, dass die Cosmide pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 deutlich dominierten (Abb.7B, Tabelle 2).

Die Cosmide pcos11.2 und pcos11.3 wurden bei der primären Temperatur-Selektion aus dem selben Ansatz isoliert. Während jedoch das Cosmid pcos11.3 in den aus der konkurrierenden Temperatur-Selektion hervorgegangenen Parasiten tendenziell um so häufiger vertreten war, je länger die Mischkultur bei 37°C inkubiert wurde, war hinsichtlich des Cosmids pcos11.2 eine

gegenläufige Tendenz zu verzeichnen. Daher wurde vermutet, dass im Gegensatz zu pcos11.3 das Cosmid pcos11.2 nicht vorrangig für einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verantwortlich ist, sondern eher einen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten hat (3.6.3, 4.1.1.2).

Nach den Ergebnissen der konkurrierenden Temperatur-Selektion zeichnen sich insbesondere die Cosmide pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 dadurch aus, dass sie *L. major* einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen vermitteln. Es kann jedoch keine quantitative Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die entsprechenden rekombinanten Stämme tatsächlich eine höhere Temperatur-Toleranz aufweisen als der Wildtyp bzw. der Vektor-Kontrollstamm.

Ein direkter Vergleich der rekombinanten Stämme und eine Quantifizierung des von den verschiedenen Cosmiden vermittelten Effekts durch Bestimmung der eine Temperatur-Selektion überlebenden Parasitenzahl mittels *limiting dilution*-Analyse ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse (3.3). Da sich bei einer *limiting dilution*-Analyse ausschließlich Unterschiede von mindestens 50% auf das Ergebnis auswirken, wurde vermutet, dass zwischen den rekombinanten Stämmen nicht solche stark ausgeprägten Unterschiede bestehen. Daher und auch im Hinblick auf die Schwierigkeit den entscheidenden Verdünnungsbereich aufgrund der Schwankungen zwischen den Versuchen grob zu ermitteln, um durch geringere Verdünnungsschritte in diesem Bereich auch weniger große Unterschiede ermitteln zu können, schien die Methode für einen Vergleich nicht geeignet zu sein. Eine Quantifizierung auch von geringen Unterschieden zwischen den Stämmen könnte möglicherweise durch Ausplattierung der selektierten Zellen auf Agarplatten erreicht werden. Die Schwierigkeit dieser Methode besteht allerdings darin, eine reproduzierbare Plattierungseffizienz zu erzielen.

Auch die Aufnahme von Wachstumskurven und das Auszählen überlebender Zellen am Mikroskop ist mit einer hohen Fehlerrate verbunden, wie die Untersuchungen zur Thermotoleranz der *L. major-ClpB*-Deletionsmutante zeigte. In diesem Fall gelang es aber dennoch, die im Vergleich zum Wildtyp verminderte Thermotoleranz der Mutante darzustellen (Hübel, 1996; Hübel *et al.*, 1997).

Es scheint nicht sehr wahrscheinlich zu sein, dass bei einem Merkmal wie Thermotoleranz, das offensichtlich von vielen Faktoren bestimmt wird, durch die Übertragung eines einzelnen Cosmids das Thermotoleranz-Niveau von *L. donovani* zu erreichen ist. Der durch die verschiedenen Cosmide vermittelte Effekt resultierte entsprechend nicht in einer Proliferation der rekombinanten *L. major*-Stämme bei 37°C.

Möglicherweise ließe sich durch eine Untersuchung, die nicht bei 37°C durchgeführt wird, sondern bei für *L. major* weniger extremen Temperaturen, die auch noch in einem gewissen Rahmen eine Proliferation zulassen, ein direkter Vergleich der verschiedenen rekombinanten *L. major*-Stämme und eine Quantifizierung der Unterschiede erreichen. Die Erfassung der Zellzahl ließe sich dann gut mit einem Zellcounter durchführen, was in Anbetracht der Anzahl der zu untersuchenden Stämme ein Vorteil wäre. Ein solcher *in vitro*-Test zur Untersuchung von Temperatur-Toleranz-Unterschieden wurde von Callahan *et al.*, (1996) beschrieben und basiert auf der Hemmung des Wachstums der Parasiten in der logarithmischen Phase bei drei unterschiedlichen Temperaturen (30°C, 32°C, 34°C). Parallel wurden die zu untersuchenden Stämme bei 25°C kultiviert. Sobald die Zellen dieser Kulturen die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurde auch die Zellzahl der entsprechenden bei den hohen

Temperaturen gehaltenen Kulturen bestimmt. Die Messwerte wurden hinsichtlich der initialen Parasitenkonzentration korrigiert und das Ergebnis als prozentualer Anteil des Wachstums der bei 25°C kultivierten Zellen ausgedrückt, wodurch ein Einfluss, der sich aus den unterschiedlichen Wachstumsraten verschiedener Stämme ergeben kann, ausgeschlossen wurde.

Diese Methode berücksichtigt somit ausschließlich den Aspekt der Fähigkeit zur Proliferation bei hohen Temperaturen. Eine Aussage über die Persistenz der Parasiten bei extremen Temperaturen ist dagegen nicht möglich.

4.1.1.1 Temperatur-Resistenz als Selektionskriterium

Die Methode der funktionellen Komplementation ist hinsichtlich jeden Merkmals anwendbar, das eine stringente Selektion erlaubt.

Auf Agglutination basierende Strategien führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu eindeutigen Ergebnissen, wie am Beispiel der Identifizierung von *L. donovani*-Genen, die an der Biosynthese des Oberflächenmoleküls LPG beteiligt sind, gezeigt wurde. LPG ist das einzige *Leishmania*-Oberflächenmolekül, das terminale β -Galactosyl-Reste aufweist, die von dem Lektin Ricin-Agglutinin erkannt werden. Durch die Bindung an Ricin-Agglutinin oder an einen gegen die subterminalen Disaccharid-Phosphat-Einheiten des LPGs gerichteten monoklonalen Antikörper gelang eine effektive Identifizierung rekombinanter Parasiten, deren LPG-Synthese aufgrund der Gegenwart von *L. donovani*-Wildtyp-Sequenzen wiederhergestellt wurde (Ryan *et al.*, 1993b; Descoteaux *et al.*, 1994; 1995; Beverley und Turco, 1995, 1998, Descoteaux *et al.*, 2002).

Auch Strategien, die auf der Resistenz oder Sensitivität der Parasiten hinsichtlich bestimmter toxischer Verbindungen beruhen, ermöglichen eine stringente Selektion.

Flaspohler *et al.* (1997) haben beispielsweise für die Selektion von Mutanten mit einem Defekt des glycosomalen Imports eine Phleomycin-Resistenz genutzt, die aus der fehlgeleiteten cytoplasmatischen Lokalisation glycosomaler Proteine resultiert. Dafür wurde ein *L. donovani*-Stamm mutagenisiert, der ein Fusionsprotein aus dem Bleomycin-Resistenz-Protein und Luciferase mit einem glycosomalen Signalpeptid exprimiert. Nach subzellulärer Fraktionierung der Phleomycin-resistenten Mutanten wurde die Luciferase-Aktivität lokalisiert, um die Mutanten zu überprüfen und das Ausmaß des Defekts zu bestimmen. Durch eine Phleomycin-Behandlung rekombinanter Klone, die aus der Transfektion der ausgewählten Mutante mit einer *L. donovani*-Cosmid-Genbank hervorgegangen waren, konnten wiederum Klone identifiziert werden, deren Phleomycin-Empfindlichkeit auf die Wiederherstellung des glycosomalen Imports schließen ließ.

Die *L. donovani*-Mutanten TUBA5 und FBD5, die nicht in der Lage sind Adenosin/Pyrimidin- bzw. Guanosen/Inosen-Nucleoside zu transportieren, wurden zur Identifizierung von Nucleosid-Transporter-Genen durch funktionelle Komplementation herangezogen. Die rekombinanten Klone wurden mit dem cytotoxischen Adenosin-Analogon Tubercidin (TUBA5) bzw. dem Inosen-Isomer Formycin B (FBD5) behandelt. Durch einen Vergleich mit den entsprechenden unbehandelten Klonen war es möglich Klone, die wieder zur Aufnahme von Nucleosiden fähig waren und daher einen sensitiven Phänotyp aufwiesen, zu identifizieren (Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000).

Auf rekombinante Parasiten mit einem resistenten Phänotyp wurde erfolgreich selektiert im Rahmen von Untersuchungen, die das Ziel hatten, durch die Behandlung der mit einer Cosmid-Genbank transfizierten *Leishmania*-Stämme mit verschiedenen Wirkstoffen Gene zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Entwicklung einer Medikamenten-Resistenz haben (Cotrim *et al.*, 1999; Kündig *et al.*, 1999).

Eine stringente Selektion erlaubte auch der Einsatz von Geldanamycin. Das Ansamycin-Antibiotikum führt zur Inaktivierung von HSP90 und bewirkt in *L. donovani*-Promastigoten einen Dosis-abhängigen Wachstumsarrest, der durch die Überexpression von HSP90 überwunden werden kann. Um zu untersuchen, ob der Geldanamycin-induzierte Wachstumsarrest auch durch Überexpression anderer Faktoren, vermieden werden kann, wurden *L. donovani*-Promastigote mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert und einer Geldanamycin-Selektion ausgesetzt. Die aus proliferierenden Transfektanten isolierten Geldanamycin-Resistenz-vermittelnden Cosmide enthielten jedoch ausnahmslos für HSP90 kodierende Sequenzen, was auf die Spezifität der Interaktion von Geldanamycin mit HSP90 hinweist (Wiesgigl und Clos, 2001). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass bei Verwendung einer Genbank mit inaktivierten HSP90-Genen bzw. mit HSP90-Genen, die nur unter bestimmten regulierbaren Bedingungen exprimiert werden, wie bei Nathan *et al.* (1999) zur Identifizierung von Faktoren des HSP90-Chaperonensystems beschrieben wurde, auch andere Komponenten hätten identifiziert werden können. Ein solcher *Leishmania*-Stamm konnte jedoch bislang nicht hergestellt werden.

Mit Temperatur-Resistenz als Selektionskriterium sind bei genetischen *screens* in *Leishmania* im Vergleich zu den genannten Beispielen anscheinend keine entsprechend eindeutigen Ergebnisse zu erzielen, zumindestens nicht in Zusammenhang mit einer Strategie, die auf einem übertragenen Phänotyp beruht.

Die jeweils in die primäre Temperatur-Selektion eingesetzten rekombinanten Zellen wurden durch die Kultivierung bei den hohen Temperaturen stark dezimiert. Mikroskopisch waren nach der Rückführung der Kulturen auf 25°C kaum lebende Zellen zu erkennen. Dass Leishmanien mit bestimmten Cosmiden im Gegensatz zu den Zellen des Kontrollansatzes sich von dem Hitzeschock erholten und wieder zur Proliferation fähig waren, kann, wie erwähnt, als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass den Parasiten durch diese Cosmide ein Selektionsvorteil vermittelt wurde. Jedoch haben die widersprüchlichen Resultate der sekundären Temperatur-Selektionen mit anschließender *limiting dilution*-Analyse, die zunächst zur Überprüfung des durch die Cosmide auf die Leishmanien übertragenen mutmaßlichen Selektionsvorteils durchgeführt wurden, gezeigt, dass der von den Cosmiden vermittelte Effekt nicht sehr ausgeprägt ist, und Unterschiede zwischen den definierten rekombinanten Stämmen auf diese Weise nicht darstellbar sind (3.3). Die Ergebnisse der konkurrierenden Temperatur-Selektion bestätigten zwar den durch die Cosmide pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 auf die Parasiten übertragenen Selektionsvorteil, ließen aber hinsichtlich anderer Cosmide, die aus der primären Temperatur-Selektion hervorgegangen waren, keine wesentlichen Unterschiede zum Kontrollstamm erkennen (3.3; Tabelle 2; Abb.7B). Möglich ist, dass bei den Ansätzen, aus denen zwei Cosmide isoliert wurden, ein Cosmid nur zufälligerweise mit dem Cosmid, das für den Effekt verantwortlich ist, assoziiert war. Einige Cosmide, wie u. a. pcos8, die nach den Ergebnissen der konkurrierenden Temperatur-Selektion anscheinend keinen Effekt haben, sind allerdings in den jeweiligen Ansätzen als einzige Cosmide identifiziert wurden. Ist es denkbar, dass das Überleben der entsprechenden

rekombinanten Parasiten eher auf Temperatur-Resistenz-Unterschiede einzelner Parasiten der für die Transfektion verwendeten Wildtyp-Population zurückzuführen ist und nicht in Zusammenhang mit den jeweiligen Cosmiden steht, die aus den Parasiten isoliert wurden?

Es ist bekannt, dass verschiedene Isolate einer *Leishmania*-Spezies sich in ihren Infektionsprofilen, ihrer Virulenz und auch in ihrer Temperatur-Empfindlichkeit nicht unbedingt gleichen (Callahan *et al.*, 1996; Sulahian *et al.*, 1997; Honoré *et al.*, 1998; Gangneux *et al.*, 2000; Kébaier *et al.*, 2001). Auch innerhalb der Parasiten-Population eines *Leishmania*-Stamms können Unterschiede bestehen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Virulenz individueller Parasiten eines *Leishmania*-Stamms deutlich variieren kann (Handman *et al.*, 1983; Segovia *et al.*, 1992; Garin *et al.*, 2001; Méndez *et al.*, 2001). Callahan *et al.*, (1996) haben mit der von ihnen verwendeten Methode jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Temperatur-Empfindlichkeit geklonter Parasiten eines *Leishmania*-Stamms und dem ursprünglichen Stamm festgestellt. Betrachtet man dagegen nicht die Proliferationsfähigkeit, sondern die Fähigkeit der Parasiten zur Persistenz bei hohen Temperaturen, sind Unterschiede auf klonaler Ebene nicht auszuschließen. Dies haben Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zur Temperatur-Resistenz individueller Parasiten ergeben. Diese Experimente wurden aufgrund des Auftretens eines Isolats des verwendeten *L. major*-Stamms, das sich nach einer Mauspassage durch eine relativ hohe Temperatur-Resistenz auszeichnete, durchgeführt. Dabei wurden Klone, die aus dem für die Temperatur-Selektionen eingesetzten *L. major*-Isolat stammten, untersucht. Es hatte sich bereits gezeigt, dass der *L. major*-Wildtyp länger als 4 Tage bei 37°C überleben kann. Entsprechend ergab die klonale Analyse, dass die meisten Parasiten (92,7%) eine viertägige Kultivierung bei 37°C überlebten. Auch nach fünf Tagen bei den hohen Temperaturen erholten sich immerhin noch 62,5% der Einzelklone. Eine sechstägige Behandlung bei 37°C überlebte jedoch kein Einzelklon (Choudhury, unveröffentlicht).

Da es allerdings relativ unwahrscheinlich ist, dass bei der Transfektion der Genbank bestimmte Cosmide ausschließlich von Parasiten mit niedriger bzw. mit hoher Temperatur-Resistenz aufgenommen werden, sondern diesbezüglich wohl eher eine Gleichverteilung besteht, dürften sich Temperatur-Resistenz-Unterschiede einzelner Wildtyp-Zellen nicht wesentlich auf die Temperatur-Selektion auswirken und sind somit für die Selektion bestimmter rekombinanter Parasiten bei hohen Temperaturen nicht unbedingt ausschlaggebend.

Die Verwendung eines besonders Temperatur-empfindlichen Wildtyp-Einzelklons anstelle einer gemischten Population könnte jedoch von Vorteil sein und eine genauere Eingrenzung der Bedingungen für die Temperatur-Selektion, sowie eine deutlichere Darstellung von Temperatur-Toleranz-Unterschieden ermöglichen.

Ansonsten ließen sich im Zusammenhang mit der Identifizierung Thermotoleranz-vermittelnder Gene möglicherweise doch eindeutiger Ergebnisse durch Selektionen erzielen, bei denen von Mutanten mit einem ausgeprägtem Temperatur-empfindlichen Phänotyp ausgegangen wird.

Mit dem Ziel Gene zu identifizieren, die eine verstärkte Viszeralisierung fördern, wurde in einem parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführten Ansatz der *L. major*-Wildtyp ebenfalls mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert und die rekombinanten Parasiten einer Selektion in der BALB/c-Maus unterzogen. Auch diese Selektions-Strategie hat sich als stringent erwiesen und ergab eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse (Mellenthin, unveröffentlicht). Um der Frage nachzugehen, inwieweit der Tropismus durch die

Thermotoleranz der Parasiten beeinflusst wird, bestünde entsprechend die Möglichkeit, die aus diesem *screen* resultierenden Gene hinsichtlich ihres Thermotoleranz-vermittelnden Potentials zu untersuchen.

4.1.1.2 Das Cosmid pcos11.2: Der Einfluss eines Wachstumseffekts auf die Temperatur-Selektion

Das unterschiedliche Wachstum individueller Klone kann sich sowohl bei der Herstellung der für die funktionelle Komplementation verwendeten Genbank, als auch auf der Ebene der mit der Cosmid-Genbank-DNA transfizierten Parasiten negativ auf die Vielfalt der ursprünglich in der Genbank repräsentierten Rekombinanten auswirken. Eine exzessive Amplifikation der Cosmid-Genbank in *E. coli* ist daher genauso zu vermeiden, wie zu häufiges Passagieren der mit der Genbank transfizierten rekombinanten *Leishmania*-Population. Entsprechend ist es ratsam, nach Transfektion der Parasiten und Selektion der Rekombinanten, den gewünschten *screen* schnellstmöglich durchzuführen (Descoteaux *et al.*, 1994). Durch Überprüfung der Qualität der aus den Bakterien präparierten Cosmid-DNA kann verhindert werden, dass für die Transfektion der Leishmanien DNA eingesetzt wird, bei der Anzeichen für das Vorliegen eines deutlich unterschiedlichen Wachstums der Bakterien festzustellen sind. Dies ist der Fall, wenn nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente außer den Vektor-spezifischen Banden und den nicht voneinander zu trennenden Banden, die von den heterogenen genomischen DNA-Fragmenten herrühren, zusätzliche definierte Banden zu erkennen sind, was ein Hinweis darauf ist, dass in der Über-Nacht-Kultur bestimmte Klone dominierten, bzw. dass nur eine begrenzte Anzahl an Rekombinanten repräsentiert sind (Descoteaux *et al.*, 1994; 3.1.2). In gleicher Weise kann die aus der rekombinanten *Leishmania*-Population reisolierte Cosmid-DNA analysiert werden, um einen Eindruck von der Heterogenität der rekombinanten Parasiten zu erhalten (3.1.2.1; Abb.3).

Die Temperatur-Selektionen wurden in Flüssigkultur durchgeführt. Auch in der anschließenden Erholungsphase, während der überlebende Zellen wieder zu proliferieren anfangen, lagen die Parasiten in Flüssigkultur vor. Nach Erreichen einer entsprechenden Zelldichte, erfolgte die Isolierung der Cosmide aus den Parasiten, an die sich die klonale Analyse anschloss. Am Beispiel des Cosmids pcos11.2 wurde deutlich, dass unter diesen Bedingungen auch in der Phase nach der Temperatur-Selektion die Gefahr besteht, dass die Ergebnisse durch Wachstumseffekte beeinflusst werden.

Da der Verlauf der sekundären Temperatur-Selektionen unter konkurrierenden Bedingungen über mehrere Tage verfolgt wurde, fiel bereits auf, dass sich der Anteil der Leishmanien mit dem Cosmid pcos11.2 mit zunehmender Dauer der Temperatur-Selektion deutlich verringerte. Im Gegensatz dazu waren die Stämme mit den Cosmiden pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 um so häufiger vertreten, je länger bei 37°C inkubiert wurde (3.3; Abb.7B). In einem Kontrollexperiment, das parallel zur konkurrierenden Selektion der verschiedenen rekombinanten Stämme in der BALB/c-Maus durchgeführt wurde, zeigte sich der Einfluss des Cosmids pcos11.2 auf das Wachstum der Parasiten sehr deutlich. Dabei wurde das für die Infektion eingesetzte Gemisch der rekombinanten Stämme über den gesamten Zeitraum auch *in vitro* kultiviert, um zu untersuchen, ob bei fehlendem Selektionsdruck bestimmte Cosmide verloren gehen. Tatsächlich lag der Anteil der rekombinanten Parasiten in der Mischkultur jedoch bei 100% und die klonale Analyse ergab, dass in den Kulturen sowohl mit als auch ohne Antibiotika-Selektion ausschließlich der *L. major*-Stamm mit dem Cosmid pcos11.2

vorhanden war (3.4).

Das Cosmid pcos11.2 erhöht allerdings nicht allgemein die Wachstumsrate der rekombinanten Parasiten. Ausgehend von Zellen der logarithmischen Wachstumsphase konnte im Vergleich zu den Kontrollstämmen keine unterschiedliche Proliferation des mit pcos11.2 transfizierten *L. major*- (Abb.13C) bzw. *L. donovani*-Stamms (Abb.13D) festgestellt werden (3.6.3.1). Die Aufnahme von Wachstumskurven, ausgehend von Zellen aus der stationären Wachstumsphase zeigte dagegen, dass der *L. major* [pcos11.2]-Stamm weniger Zeit zur Überwindung des Wachstumsarrests benötigte und die logarithmische Wachstumsphase schneller erreichte (Abb.13A). Durch diese Eigenschaft haben die Parasiten unter Flüssigkultur-Bedingungen, die eine wiederholte Arrettierung in der stationären Wachstumsphase einschließen, einen erheblichen Selektionsvorteil.

Der beobachtete Effekt scheint Gendosis-abhängig zu sein, da das Cosmid pcos11.2 auch auf *L. donovani* eine Wachstums-beschleunigende Wirkung ausübt, wenn die rekombinanten Parasiten sich zuvor in der stationären Phase befanden (Abb.13.B).

Die Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und pBGS9neoR/PbMixD1 gingen aus der Temperatur-Selektion der mit der Plasmid-Genbank aus den Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 (3.6) transfizierten *L. major*-Promastigoten hervor, die eigentlich zur Eingrenzung der für den Selektionsvorteil bei nicht-permissiven Temperaturen verantwortlichen Sequenzen durchgeführt worden war (3.6.1, Tabelle 3, Abb.11). Da beide Plasmide Anteile des Cosmids pcos11.2 aufwiesen, war es nach Bekanntwerden der Ergebnisse des erwähnten Kontrollexperiments naheliegend, dass auch bei dieser Selektion ein Wachstumseffekt eine Rolle spielte. Die Tatsache, dass nach mehrwöchiger *in vitro*-Kultivierung auch ohne Antibiotika-Selektionsdruck die Plasmide mit den pcos11.2-Sequenzen, wie auch das ursprüngliche Cosmid in *L. major* erhalten geblieben sind, während von den Kontroll-Stämmen ein erheblicher Anteil die Vektorplasmide verloren hatte, unterstützte diese Vermutung (3.6.3.2, Abb.14). Zudem wurden *L. major*-Promastigote, die mit der pcos11.2-Plasmid-Genbank bzw. mit der Plasmid-Genbank aus dem Gemisch der vier Cosmide transfiziert worden waren, nochmals einer Selektion unterzogen, jedoch in diesem Fall bei 25°C und unter Bedingungen, die einen regelmäßigen stationären Wachstumsarrest einschlossen. Das Plasmid pBGS9neoR/PbMixD1 wurde dabei wieder identifiziert (3.6.3.3, Abb.15). Den meisten isolierten Plasmiden war ein knapp 1500 bp großes *Sal* I-Fragment gemeinsam, was vermuten ließ, dass ein für den Wachstumseffekt verantwortliches Gen möglicherweise in der Nähe dieses Fragments lokalisiert ist. Durch Sequenzanalyse konnte dies bestätigt werden (3.6.3.3.1, 3.6.4, Abb.16). Es handelt sich um einen 950 bp umfassenden ORF, der für ein hypothetisches Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 33485 Da kodiert, das nur eine signifikante Übereinstimmung in der Sequenz-Datenbank zeigt, und zwar mit einem hypothetischen Protein aus *L. major*.

Weitere Untersuchungen haben inzwischen gezeigt, dass die Überexpression dieses Gens in Promastigoten einerseits die Überwindung eines durch hohe Zelldichte oder Serum-Entzug induzierten Zellzyklus-Arrests in der G1-Phase beschleunigt, andererseits jedoch ein Nachteil für die amastigote Form im Säugetierwirt darstellt. So führte die Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. major*-Stämmen, die den identifizierten ORF überexprimieren, zwar zu einer Läsionsentwicklung, diese war jedoch im Vergleich zu den Mäusen, die mit den Kontrollstämmen infiziert worden waren, erheblich verzögert (J. Clos, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse der *in vivo*-Selektion der rekombinanten Stämme deuteten bereits darauf hin,

dass pcos11.2 *L. major* keinen Selektionsvorteil im Säugetierwirt vermittelt. Der Stamm war nicht unter den Parasiten vertreten, die nach der Mauspassage aus Lymphknoten bzw. Milz reisoliert wurden (3.4, Abb.8A).

Das von dem identifizierten ORF kodierte Genprodukt ist möglicherweise ein Promastigoten-spezifisches Protein, das für den Übergang in die Proliferationsphase der Parasiten nach der Übertragung auf den Insektenvektor von Bedeutung ist, dessen Expression jedoch herunterreguliert bzw. abgeschaltet werden muss, damit eine schnelle Etablierung im Säugetierwirt, die eine Anpassung an veränderte Bedingungen erfordert, gewährleistet ist.

Werden *Leishmania*-Stämme über einen längeren Zeitraum *in vitro* kultiviert, führt dies zu einer verminderten Infektiosität und Virulenz in suszeptiblen Labortieren (Handman *et al.*, 1983; Segovia *et al.*, 1992). Handman *et al.* (1983) haben nahe gelegt, dass dies damit zusammen hängen kann, dass nicht-infektiöse Parasiten eines aus einer gemischten Population bestehenden *Leishmania*-Stamms, die infektiöse Subpopulation mit der Zeit überwachsen.

Es ist denkbar, dass die Deregulierung eines solchen Gens, wie das auf dem Cosmid pcos11.2 identifizierte, dabei eine Rolle spielt und der mit einer veränderten Expression verbundene Selektionsvorteil unter *in vitro*-Kultur-Bedingungen, bei denen das Erreichen der stationären Wachstumsphase nicht immer zu vermeiden ist, bewirkt, dass diese Parasiten nach einer gewissen Zeit in der Kultur dominieren, wie dies bei dem *L. major*-Stamm mit dem Cosmid pcos11.2 beobachtet wurde. Durch eine Passage im Säugetierwirt wird jedoch das Verhältnis wieder zugunsten der virulenten Subpopulation verändert.

Segovia *et al.* (1992) hatten Parasiten eines nicht-infektösen und eines hochvirulenten Klons gemischt und nach einjähriger *in vitro*-Kultivierung eine avirulente Population erhalten. Sie vermuteten, dass auch hier auf die avirulenten Parasiten selektiert wurde, dass aber aufgrund der ähnlichen Wachstumskinetiken nicht unterschiedliche Wachstumsraten dafür verantwortlich waren, wie für *L. donovani* (Nolan und Herman, 1985) beschrieben wurde, sondern Unterschiede bei der Konkurrenz um Stoffwechsel-Substrate.

Das Beispiel des Cosmids pcos11.2 hat gezeigt, dass sich Wachstumseffekte, die in der Erholungsphase der Parasiten nach einer Temperatur-Selektion zum Tragen kommen, auf die Verteilung der selektierten rekombinanten Parasiten auswirken können. Die ermittelten Ergebnisse spiegeln dann nicht die tatsächlichen Verhältnisse wieder, die zum Zeitpunkt der Rückführung auf die niedrigere Kultivierungstemperatur bestanden, wenn bestimmte rekombinante Parasiten in der Lage sind, einen Wachstumsarrest besser zu überwinden und somit schneller die logarithmische Wachstumsphase erreichen können.

Im Rahmen einer Temperatur-Selektion unter konkurrierenden Bedingungen ließe sich der Einfluss von Wachstumseffekten durch eine klonale Analyse auf der Ebene der Parasiten einschränken, etwa durch limitierte Verdünnung auf Mikrotiterplatten direkt nach der Temperatur-Selektion.

4.1.2 Bestimmte aus der Temperatur-Selektion hervorgegangene Cosmide vermitteln *L. major* auch einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt

Verschiedene Tiermodelle stehen für eine experimentelle Infektion mit *Leishmania* zur Verfügung. Diese sind einerseits hilfreich bei der Analyse der Immunantwort des Wirts auf eine

Leishmania-Infektion (Locksley und Louis, 1992; Reiner und Locksley, 1995; Solbach und Laskay, 2000; Engwerda und Kaye, 2000). Andererseits lassen sich Tiermodelle für Untersuchungen zur Infektiösität und Virulenz von Parasiten-Stämmen nutzen und ermöglichen die Identifizierung und Überprüfung Parasiten-eigener Faktoren, die eine erfolgreiche Etablierung, die Virulenz und den Tropismus im Säugetierwirt beeinflussen und somit den Infektionsverlauf mitbestimmen. Infektionsstudien mit entsprechenden *Leishmania*-Mutanten bestätigten beispielsweise, dass LPG auch im Säugetierwirt für die Virulenz von *L. major* eine wichtige Rolle spielt (Späth *et al.*, 2000). In *L. mexicana* dagegen gehört dieses Oberflächenglykokonjugat nicht zu den die Virulenz beeinflussenden Faktoren (Ilg, 2000). Die Cystein-Proteinasen aus *L. mexicana* (Mottram *et al.*, 1996) und die A2-Proteine aus *L. donovani* (Zhang und Matlashewski, 1997) sind weitere Beispiele für Proteine, deren Bedeutung für die Virulenz der Parasiten durch experimentelle Infektionen nachgewiesen wurden.

Wie auch die tatsächlichen Vorgänge bei einer Infektion des Menschen mit *Leishmania* von keinem Modell genau und umfassend reproduziert werden können (Hommel *et al.*, 1995), haben die verschiedenen experimentellen Modelle der kutanen und der viszeralen Leishmaniose ihre Grenzen, wenn es darum geht, mit einem *Leishmania*-Stamm, der eine kutane Leishmaniose verursacht, den Einfluss von Faktoren zu untersuchen, die möglicherweise eine verstärkte Viszeralisierung fördern. Die Wahl eines bestimmten Tiermodells kann entsprechend nur einen Kompromiss darstellen.

Als Modelle für kutane Leishmaniosen werden überwiegend verschiedene Maus-Inzuchtstämme eingesetzt. In Abhängigkeit vom verwendeten Maus-Stamm lassen sich durch eine Infektion mit *L. major* viele Merkmale der humanen Erkrankung reproduzieren, einschließlich einer Reihe von unterschiedlichen Suszeptibilitäts-Lagen. So entwickeln empfängliche BALB/c-Mäuse große ulzerierende Läsionen, die sich ausbreiten und metastasieren. C57BL/6- und CBA/N-Mäuse dagegen kontrollieren die Infektion erfolgreich. Eine Infektion führt hier nur zu kleinen Läsionen, die innerhalb von 10 bis 12 Wochen heilen. Die meisten anderen Maus-Stämme weisen eine intermediäre Empfänglichkeit auf (Handman, 2001). Die für Infektionsstudien mit *L. major* zur Verfügung stehenden Tiermodelle bieten den Vorteil, dass die Progression des Infektionsverlaufs äußerlich über die Messung der Läsionsgröße verfolgt werden kann. Dies ist bei einer Infektion mit *L. donovani* nicht möglich.

Ein Tiermodell für Untersuchungen zur viszeralen Leishmaniose stellt die Infektion von Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) mit *L. donovani* dar. Die Krankheitssymptome, wie beispielweise Anämie, Hyperglobulinämie, Kachexie, ähneln denjenigen, die bei einer humanen viszeralen Leishmaniose beobachtet werden und die Infektion verläuft ebenfalls tödlich. Auch die immunpathologischen Mechanismen der viszeralen Leishmaniose im Hamster-Modell weisen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung auf (Hommel *et al.*, 1995; Melby *et al.*, 2001). Im Tiermodell ist das Resultat einer Infektion auch vom gewählten Infektionsweg abhängig (Hommel *et al.*, 1995). Eine intravenöse, intracardiale oder intraperitoneale Infektion von Hamstern mit *L. donovani* induziert eine plötzlich ausbrechende Form der viszeralen Leishmaniose, die ausnahmslos tödlich verläuft. Erfolgt die Inokulation der Parasiten dagegen entsprechend dem natürlichen Infektionsweg intradermal, ist der Ausgang einer Infektion ungewiss und kann wie beim Menschen auch subklinisch verlaufen. Zudem ist im Hamster-Modell die Dauer des Krankheitsverlaufs nicht absehbar und kann sich über einen Zeitraum von vielen Monaten erstrecken (Hommel *et al.*, 1995; Kaye *et al.*, 1995).

Die Infektion von Mäusen mit *L. donovani* bzw. *L. infantum* wird trotz einiger Eigentümlichkeiten bevorzugt als Modell für die viszerale Leishmaniose eingesetzt. Die Etablierung einer Infektion erfordert jedoch die intravenöse Inokulation der Parasiten. Häufig werden dazu Amastigote verwendet. Im Gegensatz zur Situation beim Menschen und beim Hamster treten bei infizierten Mäusen kaum Anzeichen von Kachexia auf und die Infektion verläuft zwar chronisch, jedoch nicht tödlich (Handman, 2001; Kaye *et al.*, 1995). Zudem weisen Mäuse allgemein eine natürliche Resistenz gegenüber einer Infektion mit *L. donovani* und *L. infantum* auf.

Bei Maus-Inzuchtstämmen lassen sich basierend auf der Parasitenlast in Leber und Milz resistente und suszeptible Phänotypen unterscheiden, die in der frühen Phase der Infektion auf unterschiedliche Allele des *Nramp*-Gens (*Natural resistance associated macrophage protein*) zurückzuführen sind, während für die Kontrolle der späten Phase genetische Faktoren, die mit dem MHC-Genlocus verknüpft sind, eine Rolle spielen (Kaye *et al.*, 1995; Blackwell *et al.*, 1996; Leclercq *et al.*, 1996). Die Parasitenlast in der Leber von infizierten *Nramp*-resistenten Stämmen ist im Vergleich zu den entsprechenden *Nramp*-suszeptiblen Stämmen ungefähr 10 bis 100-fach geringer. Bezüglich der T-Zellantwort konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den kongenen *Nramp*-resistenten und *Nramp*-suszeptiblen Maustämmen identifiziert werden. Resistente Mäuse weisen jedoch eine schnellere und quantitativ stärkere T-Zellantwort auf (Kaye *et al.*, 1995).

Bei einer intravenösen oder intraperitonealen Inokulation der Parasiten ist eine Identifizierung von Faktoren und Mechanismen, welche die Ausbreitung der Parasiten von der Haut in die inneren Organe beeinflussen, nicht möglich. Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine subkutane Infektion von *L. donovani* unter üblichen Bedingungen anscheinend nicht zu einer ausgeprägten Viszeralisierung führt. Melby *et al.* (1998) konnten nach einer Infektion von BALB/c-Mäusen mit *L. donovani* weder in der Leber oder der Milz, noch in den sekundären Lymphknoten Parasiten nachweisen. Bei einer Studie mit einem speziellen Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses einer Mangelernährung auf die Viszeralisierung waren zwar Parasiten in Milz und Leber nachweisbar. Bei den Kontrollstämmen wurde jedoch nur in 20 bis 30 % der Fälle eine Viszeralisierung beobachtet, während unterernährte Mäuse eine deutliche Tendenz zur Viszeralisierung zeigten (Anstead *et al.*, 2001).

Das Mausmodell scheint somit im Zusammenhang mit einer kutanen Infektion von *L. donovani* für die Untersuchung des Einflusses der Parasiten auf die Ausbreitung in die inneren Organe wenig geeignet zu sein.

Anhand der Parasitenlasten in der Leber und insbesondere in der Milz lassen sich nach einer intravenösen Infektion von Mäusen mit einem definierten genetischen Hintergrund, wie der BALB/c-Maus, *Leishmania*-Stämme durchaus hinsichtlich ihrer Virulenz unterscheiden, auch wenn der Mausstamm trotz des suszeptiblen Phänotyps auf lange Sicht fähig ist, die Infektion insbesondere in der Leber zu kontrollieren (Kaye *et al.*, 1995). So konnten beispielsweise verschiedene *L. infantum*-Isolate aus Patienten mit kutaner oder viszeraler Leishmaniose, von denen einige zusätzlich mit HIV koinfiziert waren, in virulente und avirulente Stämme sowie in Stämme mit einem intermediärem Virulenz-Phänotyp eingruppiert werden (Sulahian *et al.*, 1997). Auch in Mäusen mit einem anderen genetischen Hintergrund (C57Bl/6; C.B-17/SCID) zeigten die verschiedenen Stämme entsprechende Infektionsprofile (Honoré *et al.*, 1998; Gangneux *et al.*, 2000).

Die Untersuchung der im Verlauf der Temperatur-Selektionen identifizierten Cosmide

hinsichtlich der Übertragung eines Selektionsvorteils auf die Parasiten im Säugetierwirt bzw. eines Einflusses auf den Tropismus erfolgte durch eine konkurrierende Selektion in der BALB/c-Maus (3.4).

Suszeptible BALB/c-Mäuse weisen nach einer Infektion mit der dermatropen *Leishmania*-Spezies *L. major* auch in den inneren Organen Parasiten auf. Dies scheint zunächst im Widerspruch zu der Annahme zu stehen, dass die geringere Temperatur-Resistenz dermatroper Spezies die Ausbreitung der Parasiten in die inneren Organe des Säugetierwirts begrenzt. Die Anzahl der Parasiten ist jedoch zumindestens in den ersten Monaten der Infektion relativ gering und eine wesentliche Vermehrung scheint nicht zu erfolgen. So wurden auch nach ca. 11 Wochen, in denen sich bereits stark ulzerierende Läsionen an der Inokulationsstelle gebildet hatten, in den Milzen nur niedrige Parasitenlasten festgestellt, die um einige Größenordnungen geringer waren, als bei einer Infektion mit *L. donovani* zu erwarten gewesen wären (Abb. 8B, Beobachtungen in der Arbeitsgruppe). Die aus Lymphknoten und Milzen reisolierten Parasiten waren zu 15,6% bzw. 23,5% rekombinant (Abb.8B). Ein erheblicher Anteil der Parasiten hatte somit die Cosmide während der Mauspassage verloren. Im Gegensatz zum Cosmidvektor pcosTL sind einige Cosmide jedoch auch ohne Antibiotika-Selektionsdruck in den Parasiten erhalten geblieben, was für die Vermittlung eines Selektionsvorteils spricht. Das Cosmid pcos11.3 war insbesondere in Parasiten, die aus den Lymphknoten reisoliert worden waren, vertreten, während das Cosmid pcos13.12 hauptsächlich aus Parasiten der Milzen isoliert wurde. Das Cosmid pcos8 war dagegen sowohl in den Parasiten der Lymphknoten als auch in den Parasiten der Milzen stark vertreten (Abb. 8A).

Mit pcos11.3 und pcos13.12 wurden zwei Cosmide identifiziert, die auch in überlebenden *L. major*-Promastigoten nach der konkurrierenden Temperatur-Selektion stark repräsentiert waren. Dies war bezüglich des Cosmids pcos8 nicht der Fall. Cosmide mit bestimmten *L. donovani*-Sequenzen ermöglichen demnach *L. major*-Promastigoten nicht nur höheren Temperaturen besser zu widerstehen, sondern scheinen ebenfalls amastigoten Stadien von *L. major* im Säugetierwirt von Vorteil zu sein. Temperatur-Toleranz und Überlebensfähigkeit bzw. Tropismus im Säugetierwirt sind aber nicht notwendigerweise miteinander verknüpft, was am Beispiel des Cosmids pcos8 deutlich wurde.

Dass in den Milzen bevorzugt die *L. major*-Stämme mit den Cosmiden pcos8 und pcos13.12 lokalisiert waren, wobei *L. major* [pcos13.12] hier sogar wesentlich häufiger als in den Lymphknoten repräsentiert war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Cosmide Sequenzen enthalten, die eine Viszeralisierung fördern. Eine Aussage bezüglich einer verstärkten Tendenz zur Viszeralisierung war unter den gewählten Bedingungen allerdings nicht möglich.

Versuche von Zhang und Matlashewski (2001) haben demonstriert, dass auf *L. major* die Fähigkeit zu einer verstärkten Viszeralisierung übertragen werden kann. Um den Einfluss der amastigoten-spezifischen A2-Proteine auf die Viszeralisierung zu untersuchen, wurde ein A2-Gen aus *L. donovani* in *L. major*, die keine A2-Gene aufweisen, exprimiert, da eine vollständige Deletion des A2-Genlocus in *L. donovani* nicht möglich war. Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit dem A2-exprimierendem *L. major*-Stamm, die allerdings intravenös erfolgte, resultierte in einer signifikanten Vergrößerung der Milz und einem höheren Infektionsniveau verglichen mit den Mäusen, die mit dem Kontrollstamm infiziert worden waren.

Ein entsprechender Versuch könnte Aufschluss darüber geben, ob die für den

Selektionsvorteil im Säugetierwirt verantwortlichen Gene auf den identifizierten Cosmiden tatsächlich zu einer verstärkten Viszeralisierung führen. Es wäre auch denkbar, diese Gene in einem der oben erwähnten von Sulahian *et al.* (1997) basierend auf den Parasitenlasten in Leber und Milz als avirulent eingestuft *L. infantum*-Isolaten zu exprimieren, und zu untersuchen, ob sich das Infektionsprofil in Richtung eines virulenten Phänotyps ändert.

4.1.3 Eingrenzung der für einen Selektionsvorteil verantwortlichen Gene

Die Eingrenzung der Gene, die einen Selektionsvorteil vermitteln, wird durch die Kenntnis der Genomsequenz des untersuchten Organismus erheblich erleichtert. Die Sequenz der identifizierten Cosmide ließe sich dann einfach durch Sequenzanalyse der Endbereiche der Cosmid-Inserts und Vergleich mit den Sequenzen in der Datenbank ermitteln. Das *Leishmania*-Genomprojekt war allerdings zu der Zeit noch nicht sehr weit fortgeschritten und nur von zwei Chromosomen lag eine vollständige Sequenz vor.

Erste Hinweise auf den interessierenden Sequenzbereich ergeben sich oftmals, wenn aus einer Selektion verschiedene Cosmide hervorgegangen sind, die gemeinsame Sequenzbereiche aufweisen. Durch Restriktionsanalyse und Kreuzhybridisierung können diese Abschnitte bestimmt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das für den Effekt verantwortliche Gen enthalten. Wie bereits erwähnt, ergab die Kreuzhybridisierung jedoch, dass die im Verlauf der primären Temperatur-Selektionen identifizierten Cosmide keine überlappenden Sequenzen enthalten.

Dennoch könnten Cosmide mit überlappenden Sequenzen für die Eingrenzung genutzt und eine aufwendige Subklonierung zunächst umgangen werden, indem durch Koloniehybridisierung mit DNA-Sonden, die spezifisch die Endbereiche des Cosmides erkennen, entsprechende Klone aus der verwendeten Cosmid-Genbank identifiziert und isoliert werden, die jeweils nur mit einer Sonde reagieren. Optimal lässt sich diese Methode anwenden, wenn bereits die Sequenz des Cosmids bekannt ist. Wiederum durch Sequenzanalyse der Endbereiche der Cosmide und Vergleich mit der Sequenz des ursprünglichen Cosmids kann auf diese Weise eine Kollektion von Cosmiden mit verschiedenen Überlappungsbereichen zusammengestellt und erneut in eine Selektion eingesetzt werden. Diese Strategie kann erfolgreich sein, wenn eine Voraussetzung, nämlich das Vorliegen entsprechender Klone in der Cosmid-Genbank, erfüllt ist. So ließen sich durch diese Vorgehensweise die für ein verbessertes Überleben von *L. major* in den inneren Organen des Säugetierwirts verantwortlichen Sequenzen eines Cosmids auf zwei ORF eingrenzen (Mellenthin, unveröffentlicht). In einem anderen Fall gelang dies jedoch nicht und es konnten nur Cosmide aus der Genbank isoliert werden, die weitgehend mit dem ursprünglichen Cosmid übereinstimmten (Choudhury, unveröffentlicht). Eine Erklärung dafür wäre, dass die für die Herstellung der Genbank verwendete Restriktionsendonuklease *Sau 3A1* möglicherweise in einigen Bereichen des *Leishmania*-Genoms bevorzugt schneidet.

Die Selektion der Plasmid-Genbanken, die aus den mit *Sau 3A1* verdauten Cosmiden pcos11.2, pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 konstruiert wurden (3.6), ergab keine Stämme mit erhöhter Temperatur-Toleranz. Anscheinend ist die Wahrscheinlichkeit nicht sehr groß, dass die *Sau 3A1*-Fragmente sowohl die vollständigen ORF, als auch die möglicherweise für eine korrekte Expression erforderlichen flankierenden Sequenzen enthalten. Die Selektion der Plasmide pBGS9neoR/PbMixA5 und pBGS9neoR/PbMixD1ist, wie bereits erwähnt

(4.1.1.2), mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ihren Einfluss auf das Wachstum der Parasiten nach einem Wachstumsarrest zurückzuführen. In diesem Fall gelang es, die relevanten Sequenzen durch Selektion der Plasmid-Genbanken einzugrenzen, und einen ORF zu identifizieren, der beiden Plasmiden gemeinsam war und daher am wahrscheinlichsten für den Wachstumseffekt verantwortlich ist (3.6.4; Abb.16).

Eine andere Möglichkeit wäre, von den Cosmiden Deletions-Derivate durch einen Partialverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen der multiplen Klonierungsstelle herzustellen, und/oder spezifische Fragmente des Cosmid-Inserts subzuklonieren und diese Konstrukte erneut zu testen. Diese Vorgehensweise kam in vielen Studien (Ryan *et al.*, 1993b; Descoteaux *et al.*, 1995; Flaspohler *et al.*, 1997; Vasudevan *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2000; Descoteaux *et al.*, 2002) zur Anwendung und scheint offensichtlich sichere Aussichten auf eine erfolgreiche Bestimmung der relevanten Sequenzen zu bieten, als der Einsatz von Plasmid-Genbanken.

Auch Transponierbare Elemente lassen sich auf vielfältige Weise für die Charakterisierung komplexer Genome nutzen. Durch *in vitro*-Transposition können Transposon-Insertions-Bibliotheken hergestellt werden, die sowohl für die Sequenzierung, als auch für funktionelle Genomanalysen einsetzbar sind. In einigen Eukaryonten, wie Hefe, *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* ist es auch möglich gewesen eine Transposon-Mutagenese mit natürlichen oder konstruierten Transposons *in vivo* durchzuführen (Beverley *et al.*, 2002).

Am Beispiel des Cosmids pcos8, das aufgrund seiner Dominanz bei der konkurrierenden Selektion der *L. major* [pcos]-Stämme im Säugetierwirt (3.4; Abb. 8A) in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurde, wurde überprüft, ob die Integration von Transposons in das Cosmid im Rahmen einer Negativ-Selektion Hinweise auf das für den Selektionsvorteil im Säugetierwirt verantwortliche Gen liefern kann (3.8, Abb.17). Dies setzt allerdings eine zufällige Verteilung der Transposon-Insertionen voraus, so dass durch Bestimmung der Integrationsposition in den nicht-essentiellen Bereichen der Cosmid-Derivate aus den selektierten Parasiten auf das für den Selektionsvorteil verantwortliche Gen rückgeschlossen werden kann. Die Transposon-Mutagenese war auch mit dem Ziel der Sequenzanalyse des Cosmids pcos8 verbunden. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Transposons bevorzugt in den Cosmid-Vektor und nicht in das G/C-reiche *Leishmania*-DNA-Insert integrierten. Daraus ergab sich, dass auch die nach der Mauspassage analysierten aus den Leishmanien der Lymphknoten und Milzen isolierten pcos8-Tn7-Cosmide hauptsächlich Transposon-Insertionen innerhalb des Vektors und innerhalb repetitiver Sequenzen ohne kodierende Bereiche aufwiesen.

Möglicherweise ließen sich mit einem anderen als dem hier verwendeten, auf dem bakteriellen Transposon Tn7 basierenden GPS™-1-System (*Genome Priming System*, New England Biolabs), bessere Resultate erzielen.

Garraway *et al.* (1997) haben Transposons entwickelt, die durch Ty1-vermittelte *in vitro*-Transposition in die Ziel-DNA eingeführt werden. Die Transposition verschiedener Ziel-DNAs von bis zu 50 kb erfolgte mit ausreichender Zufälligkeit hinsichtlich der *Leishmania*-oder Vektor-DNA, des DNA-Strangs oder kodierender und nicht-kodierender Regionen. Um den Erhalt von Klonen mit Insertionen in Vektor-Sequenzen zu minimieren, wurden zudem spezielle Vektoren konstruiert, bei denen eine Transposition in alle Bereiche außer der *Leishmania splice acceptor site* eine Inaktivierung zur Folge hat. Einige der hergestellten Transposon-Insertions-Bibliotheken wurden erfolgreich für die DNA-Sequenzierung innerhalb von

Plasmiden und Cosmiden eingesetzt. Bei einigen Cosmiden mit *Leishmania*-Genen, die in eine Medikamenten-Resistenz oder in den Infektionszyklus der Parasiten involviert sind, wurde zudem eine Transposon-Mutagenese zur Identifizierung des relevanten Gens durch Insertions-Inaktivierung genutzt.

Die Transposon-Mutagenese kann auch eine Alternative zur Herstellung von Mutanten durch chemische Mutagenese sein, und gleichzeitig die vorläufige Identifizierung eines mutanten Gens erlauben, ohne auf Komplementation zurückgreifen zu müssen (Clayton *et al.*, 1999). Mösch und Fink (1997) haben sich dieser Strategie bedient, um Gene zu identifizieren, die für das filamentöse Wachstum von *S. cerevisiae* erforderlich sind.

Gueiros-Filho und Beverley (1997) haben demonstriert, dass in *Leishmania* eine Transposon-Mutagenese *in vivo* grundsätzlich möglich ist. Es gelang ihnen das transponierbare Element *mariner* (Mos1) aus *Drosophila mauritiana* in *L. major* einzuführen, wobei trotz fehlender Selektion für die Transposition 23% der untersuchten Klone eine Insertion aufwiesen. Am Beispiel des *DHFRTS* (Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthase)-Gens wurde gezeigt, dass durch dieses System eine Inaktivierung durch Insertion erzielt werden kann. Ein modifiziertes *mariner* Element mit einem Hygromycin-Resistenz-Gen ermöglichte die Selektion von Genfusionen und die Identifizierung von neuen *Leishmania*-Genen.

Garraway *et al.* (1997) haben bei dem von ihnen verwendeten System festgestellt, dass 90 bis 100% der Transposon-tragenden Plasmide eine einzelne Insertion enthielten. Bei dem untersuchten Cosmid sank der Wert jedoch auf 77%. Mit zunehmender Größe der Ziel-DNA scheint somit die Wahrscheinlichkeit multipler Insertionen anzusteigen. Auf multiple Insertionen ist möglicherweise auch zurückzuführen, dass ca. 25% der mit den pcos8-Tn7-Cosmiden erhaltenen Sequenzen nicht auswertbar waren, obwohl bei der Tn7-Transposition eine sogenannte Ziel-Immunität besteht, die eine Transposition in ein DNA-Molekül, das bereits ein Tn7-Transposon besitzt, unterdrückt, und bei einem Derivat des *E. coli* F-Plasmids auf einer Distanz von 60kb wirkt, während innerhalb des Chromosoms sogar Bereiche von 190kb geschützt waren (Stellwagen und Craig, 1997b).

Durch Sequenzanalyse der pcos8-Tn7-Cosmide konnte nur ein Teil der Sequenz des pcos8-Inserts ermittelt werden. Die Erweiterung der aus den überlappenden Sequenzen erhaltenen Contigs, u. a. durch Primer-Walking, ermöglichte aber zumindestens die vollständige Sequenz der für die Proteine Delta-Adaptin (Abb.18A, ORF4) und RNA-Helicase (Abb.18A, ORF3) kodierenden ORF zu erhalten, sowie einen Teil eines ORF, der für eine mutmaßliche DSP (*Dual Specificity Phosphatase*) (Abb.18A, ORF5) kodiert (3.9).

Die Sequenzierung der Cosmide am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena ergab für das Cosmid pcos8 zwei Contigs, die 9793 bp bzw. 11424 bp umfassten (Abb.18A) und somit nicht das gesamte Insert des Cosmids darstellen können. Diese Sequenzen enthielten zwei weitere ORF, die für Proteine kodieren, welche Homologien zu einem Protein der Phosphoglycerat-Mutase-Familie (Abb.18A, ORF1) bzw. zu einem Transkriptions-Co-Aktivator (Abb.18A, ORF2) aufweisen. Es ist denkbar, dass pcos8 tatsächlich nur diese 5 ORF enthält. Möglicherweise haben Rekombinationsereignisse zu Genduplikationen geführt. Am 3' Ende des 11424 bp-Contigs liegt eine 615 bp große invertierte Sequenzwiederholung, die mit 384 bp des 3' Ende des ORF5 endet. Diese invertierte Sequenzwiederholung könnte möglicherweise einen noch größeren Bereich umfassen, der mehrere der identifizierten ORF einschließt.

Die LD1- (*Leishmania* DNA1) Region auf Chromosom 35 des *Leishmania*-Genoms ist ein Bereich, der zu häufiger extrachromosomaler Amplifikation neigt. Die bevorzugte LD1-Amplifikation in *Leishmania* legt einen daraus resultierenden Selektionsvorteil nahe. Dies konnte für ein Gen dieser Region, das für einen Biopterin-Transporter (BT1) kodiert, bestätigt werden. Die Überexpression von BT1 führt zu einem signifikanten Wachstumsvorteil der Parasiten (Lemley *et al.*, 1999). Nahezu alle LD1-Amplicons enthalten eine invertierte Sequenzwiederholung von LD1 (Segovia *et al.*, 1997). Sunkin *et al.* (2001) haben vermutet, dass individuelle LD1-Amplicons entstehen könnten, wenn ein Umwelt-Stress zu einer abweichenden DNA-Replikation führt. In gestressten Zellen könnte die DNA-Polymerase an verschiedenen Positionen der LD1-Region stecken bleiben, dann den Strang wechseln und nachfolgend den neu synthetisierten Strang als Matrize benutzen. Möglicherweise ist die invertierte Sequenzwiederholung des pcos8-Inserts in ähnlicher Weise im Verlauf der primären Temperatur-Selektion entstanden.

Für das Cosmid pcos13.12 wurde eine fast vollständige Sequenz erhalten, die nur auf vier mögliche ORF schließen ließ (Abb.18B). Diese kodieren für Proteine mit Homologien zu einer cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (Abb.18B, ORF1), einem Glycoprotein, Mucin, (Abb.18B, ORF2), sowie einem hypothetischen Protein (Abb.18B, ORF3). Der ORF4, für den die Datenbankrecherche keine Ergebnisse ergab, macht mit 13550 bp schon mehr als ein Drittel des Inserts aus. Allerdings ist das 3`Ende des ORF4 nicht mehr auf dem Insert enthalten.

Die für den Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen (pcos13.12) bzw. im Säugetierwirt (pcos8, pcos13.12) verantwortlichen Gene wurden letztlich nach Subklonierung der ORF in den Vektor pIR(mcs2-) und Transfektion der Konstrukte in *L. major* (3.10.1) durch eine vergleichende Analyse der die jeweiligen ORF überexprimierenden *L. major*-Stämme ermittelt.

Der ORF1 des Cosmids pcos8 wurde erst nachträglich in einer korrigierten Version der Sequenz identifiziert und konnte nicht mehr in die Versuche einbezogen werden.

4.2 Erhöhte Thermotoleranz ist keine hinreichende Voraussetzung für die Viszeralisierung von *L. donovani*

Die Ergebnisse der sekundären *in vivo*-Selektion (Abb. 8A) haben gezeigt, dass Cosmide, wie pcos14.4, die den Parasiten zwar einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen *in vitro* vermitteln, nicht notwendigerweise auch im Säugetierwirt eine entsprechende Bedeutung haben. Das Cosmid pcos8 zeichnet sich umgekehrt nicht durch ausgeprägte Thermotoleranzvermittelnde Eigenschaften aus und wurde im Gegensatz zu pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 nur vereinzelt aus überlebenden Parasiten nach den konkurrierenden Temperatur-Selektionen isoliert (Abb. 7B, Tabelle 2). In den Reisolaten sowohl aus Lymphknoten, als auch aus Milzen war pcos8 nach der Mauspassage jedoch überrepräsentiert. Das Cosmid pcos11.3 gehörte neben pcos8 und pcos13.12 zu den am häufigsten aus *Leishmania*-Isolaten aus Lymphknoten isolierten Cosmiden. Daraus lässt sich ableiten, dass dieses Cosmid vermutlich *L. donovani*-Sequenzen trägt, die einen positiven Effekt auf das Überleben von *L. major* in der Maus haben. Jedoch fördern diese anscheinend nicht eine Viszeralisierung der Parasiten. Die Identifizierung von pcos11.3 sowohl in den sekundären *in vitro*- als auch *in vivo*-Selektionen kann daher nur allgemein als ein Hinweis auf einen Selektionsdruck für Temperatur-Toleranz interpretiert werden. Weder für pcos14.4, pcos11.3

noch für *pcos8* lässt sich somit eine Verknüpfung von erhöhter Thermotoleranz und einem Tropismus für die inneren Organe herstellen. Auch *pcos13.12* stellt diesbezüglich keine Ausnahme dar. Die Thermotoleranz-vermittelnden Eigenschaften des Cosmids *pcos13.12* sind im Wesentlichen auf den *L. donovani*-ORF3 zurückzuführen. Der den ORF3 überexprimierende *L. major*-Stamm *L. m.* (pIR/P-ORF3) zeichnete sich bei Thermotoleranz-Versuchen (3.10.2, Abb. 20) durch eine deutlich bessere Überlebensfähigkeit gegenüber dem Kontrollstamm und auch im Vergleich zu den anderen rekombinanten Stämmen aus. Die konkurrierende Selektion der die jeweiligen ORF des Cosmids *pcos13.12* überexprimierenden *L. major*-Stämme in BALB/c-Mäusen wies jedoch nicht auf einen Selektionsvorteil durch Überexpression des ORF3 unter *in vivo*-Bedingungen hin (3.10.3, Abb. 21B).

Der *L. donovani*-ORF3 kodiert für ein Protein von 83 kDa. Datenbankrecherchen ergaben keine Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen. Ob es sich bei diesem Protein möglicherweise um ein HSP handelt, müssten weitere Versuche zeigen. Die nach Immunisierung von Hühnern mit dem rekombinant exprimiertem Protein gewonnenen Antikörper (3.12) erkennen im Immun-Blot (Abb. 25B) zwar spezifisch das rekombinante Protein, reagieren jedoch mit einer Vielzahl von Proteinen diverser Größen der *Leishmania*-Lysate und sind somit für eine weitere Charakterisierung nicht geeignet.

Die bessere Überlebensfähigkeit von *L. m.* (pIR/P-ORF3) bei hohen Temperaturen *in vitro* scheint nicht Ursache eines Gendosiseffekts zu sein. Der den homologen ORF3 aus *L. major* überexprimierende *L. major*-Stamm *L. m.* (pIR/P-L.m.ORF3) wurde in die Thermotoleranz-Versuche mit einbezogen und schnitt im Vergleich zum Kontrollstamm sogar schlechter ab (Abb. 20). Eine Sequenzanalyse des *L. major*-ORF3 könnte Hinweise auf die diesen Ergebnissen zugrunde liegenden Unterschiede liefern und lassen möglicherweise einen Rückschluss auf funktionell wichtige Bereiche des ORF3-Gens zu.

Hitzeschockproteine, insbesondere Mitglieder der HSP70- und HSP90-Familie, sind in *Leishmania* auch bei niedrigen Temperaturen außergewöhnlich abundant. Auf einen für die Übertragung auf den Säugetierwirt charakteristischen Anstieg der Umgebungstemperatur reagieren die Parasiten darüber hinaus mit der verstärkten Synthese von HSP (Hunter *et al.*, 1984; Lawrence und Robert-Gero, 1985; Van der Ploeg *et al.*, 1985; Toye und Remold, 1988; Shapira *et al.* 1988; Brandau *et al.*, 1995; Hübel *et al.*, 1995). Aufgrund ihres hohen HSP-Niveaus wird angenommen, dass sich Leishmanien schneller an eine plötzliche Temperaturerhöhung anpassen und sich besser im Wirtsorganismus etablieren können (Zilberstein und Shapira, 1994). Zudem stellen erhöhte Temperaturen, denen die Parasiten im Säugetierwirt ausgesetzt sind, auch ein Schlüsselsignal für die Differenzierung vom promastigoten zum intrazellulären amastigoten Stadium dar. Dass, wie vermutet, HSP einen Einfluss auf diese Differenzierungsprozesse haben, wurde für HSP100 und HSP90 bestätigt (Hübel *et al.*, 1997; Krobitsch *et al.*, 1998; Krobitsch und Clos, 1999; Wiesgigl und Clos, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Hitzeschock-Proteine, für die in anderen Organismen eine Thermotoleranz-vermittelnde Funktion beschrieben wurde, wie u. a. HSP70, HSP100 oder Proteine aus der Familie der kleinen HSP, identifiziert werden. Einerseits war der durchgeführte Screen nicht vollständig. Andererseits könnte dies auch in der gewählten Selektionsstrategie, die auf einem übertragenen Phänotyp beruht und nicht von Mutanten ausgeht, begründet sein. Den rekombinanten *L. major* stand das eigene HSP-Repertoire zur Verfügung. Die Überexpression bestimmter Faktoren hat zudem nicht immer einen positiven

Effekt, sondern kann sich auch negativ auf den Organismus auswirken. In *Drosophila* ist HSP70 für das Überleben bei hohen Temperaturen von großer Bedeutung. Die erzwungene Expression von HSP70 bei normalen Temperaturen wirkt sich jedoch negativ auf das Wachstum und die Zellteilung aus, möglicherweise weil das Protein mit Faktoren reagiert, die für diese Prozesse entscheidend sind. Die Proliferation wird erst fortgesetzt, nachdem die HSP70-Expression eingestellt und existierende Proteine in Granula abgesondert wurden (Feder *et al.*, 1992).

Eine über das physiologische Maß hinausgehende Expression von HSP100 hat zwar keine Auswirkung auf die Proliferation von *L. major*-Promastigoten, hat sich aber als nachteilig für die intrazelluläre amastigote Form erwiesen und äußerte sich bei der Infektion von BALB/c-Mäusen in einer verzögerten Läsionsentwicklung (Hübel *et al.*, 1997).

Ergebnisse von Zhang und Matlashewski (2001) weisen darauf hin, dass auch eine balancierte Expression verschiedener *L. donovani*-A2- und A2rel-Proteine erforderlich ist, damit die normalen Wachstums- und Virulenz-Eigenschaften des Parasiten aufrechterhalten werden.

Hong und Vierling (2000) haben in einem genetischen *screen* auf *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit reduzierter Temperatur-Toleranz selektiert. Es gelang ihnen, einen der betroffenen Genloci den kodierenden Sequenzen des HSP101-Gens zuzuordnen. Zwar hat sich inzwischen gezeigt, dass HSP100 in *L. donovani* nicht primär für die Vermittlung von Thermotoleranz verantwortlich ist (Krobitsch und Clos, 1999), ein *screen* ausgehend von Temperatur-empfindlichen *L. donovani*-Mutanten hätte aber möglicherweise auch zur Identifizierung anderer klassischer, mit Thermotoleranz assoziierter HSP geführt.

Thermotoleranz, wie auch die Fähigkeit zur Viszeralisierung sind offenbar multifaktoriell bedingte Merkmale des Parasiten. Es ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Faktoren existieren, die einerseits Thermotoleranz vermitteln und andererseits auch eine Viszeralisierung fördern. Dass viszeralisierende *Leishmania*-Infektionen jedoch im Wesentlichen durch Thermotoleranz-vermittelnde Faktoren kontrolliert werden, erscheint allerdings unwahrscheinlich zu sein.

Callahan *et al.* (1996) haben mit ihren Versuchen zur Thermotoleranz bestätigt, dass *Leishmania*-Promastigote die gleichen Temperatur-Empfindlichkeits-Charakteristika aufweisen wie *in vitro* kultivierte Amastigote (Berman und Neva, 1981; Sachs *et al.*, 1983). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass viszeralisierende Spezies (*L. donovani*, *L. chagasi*) temperatur-resistenter sind als dermatrope Spezies (*L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* u. a.), und dass die *Leishmania*-Spezies der Alten Welt wiederum temperatur-resistenter sind als die Spezies der Neuen Welt. Sie demonstrierten aber auch, dass *L. chagasi*, die viszeralisierende Spezies der Neuen Welt, zwar besser bei hohen Temperaturen proliferierte als alle dermatropen Spezies der Neuen Welt, sich jedoch im Vergleich zu den dermatropen Spezies der Alten Welt, *L. major* und *L. tropica*, nicht durch ein verbessertes Wachstum auszeichnete. Es scheint somit ein Mindestmaß an Thermotoleranz erforderlich zu sein, damit eine Viszeralisierung stattfinden kann. Dass aber *L. major* und *L. tropica* gleiche Temperatur-Empfindlichkeits-Profile aufweisen wie *L. chagasi*, ist ein Hinweis darauf, dass Temperatur-Empfindlichkeit nicht ein limitierender Faktor für die Viszeralisierung dermatroper *Leishmania*-Spezies der Alten Welt ist (Callahan *et al.*, 1996). So wurde entsprechend für *L. tropica* beschrieben, dass diese überwiegend dermatrope *Leishmania*-Spezies in einigen Fällen auch eine viszerale Leishmaniose auslösen kann (Sacks *et al.*, 1995; Magill *et al.*, 1993).

4.2.1 Eine mutmaßliche *L. donovani*-DSP und *L. donovani*-PDE vermitteln *L. major* einen Selektionsvorteil im Säugetierwirt

Nach den im Kapitel 3.10.3 beschriebenen Ergebnissen ist der Selektionsvorteil, der *L. major* während der Mauspassage durch die Cosmide pcos8 und pcos13.12 vermittelt wird, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den ORF5 des Cosmids pcos8 (Abb.18A) und den ORF1 des Cosmids pcos13.12 (Abb.18B) zurückzuführen, für die sich bei Datenbankrecherchen Übereinstimmungen mit einer mutmaßlichen *dual specificity phosphatase* (DSP, ORF5), bzw. einer mutmaßlichen cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE, ORF1) ergaben. Die diese ORF überexprimierenden *L. major*-Stämme *L. m.* (pIR/A-DSP) und *L. m.* (pIR/A-PDE) dominierten in den Reisolaten sowohl der Lymphknoten, als auch der Milzen (Abb.21B und C). Aus Abbildung 21B geht allerdings hervor, dass der *L. major*-Stamm *L. m.* (pIR/A-PDE) im Vergleich zu *L. m.* (pIR/A-DSP) deutlich unterrepräsentiert war. Dies deutet darauf hin, dass der durch die Überexpression der putativen DSP vermittelte Effekt ausgeprägter ist.

Eine Aussage über ein verändertes Viszeralisierungs-Potential von *L. major*, das aus der Überexpression dieser *L. donovani*-Gene resultieren könnte, war unter den gegebenen Bedingungen, wie auch bei der konkurrierenden *in vivo*-Selektion auf Cosmid-Ebene, nicht möglich. Ob durch Überexpression der mutmaßlichen PDE und DSP eine verstärkte Tendenz zur Viszeralisierung der entsprechenden *L. major*-Stämme erzeugt wird, lässt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend beurteilen. Wie bereits erwähnt (4.1.2), könnte dies in Anlehnung an Zhang und Matlashewski (2001) durch intravenöse Infektion von BALB/c-Mäusen mit den jeweiligen *L. major*-Stämmen untersucht werden.

Ein erster direkter Vergleich, der mit den Stämmen *L. m.* (pIR/A-DSP), *L. m.* (pIR/A-PDE), *L. m.* (pIR/A-L.m.-PDE) und *L. m.* (pIR) als Kontrolle durchgeführt wurde (3.13), gab zwar keine Auskunft über die Parasitenlasten in den Milzen der in diesem Fall subcutan infizierten BALB/c-Mäuse, lieferte aber einen Hinweis darauf, dass durch Überexpression der mutmaßlichen *L. donovani*-DSP möglicherweise die Proliferation von *L. major* im Säugetierwirt gefördert wird (Abb. 27B). Während der Infektionsverlauf der mit dem Kontrollstamm bzw. mit *L. m.* (pIR/A-DSP) infizierten Mäuse sich nicht unterschied (Abb. 27A), wiesen die Lymphknoten der mit *L. m.* (pIR/A-DSP) infizierten Mäuse ca. vierfach höhere Parasitenlasten auf. Diese Ergebnisse sind jedoch nur als vorläufig zu betrachten und bedürfen einer Überprüfung. Ebenfalls müssten weitere Versuche zeigen, ob sich die verzögerte Läsionsentwicklung, die durch den *L. m.* (pIR/A-L.m.-PDE)-Stamm, der den entsprechenden *L. major* ORF überexprimiert, hervorgerufen wurde, bestätigen lässt.

Sowohl das *PDE*- als auch das *DSP*-Gen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit im haploiden *L. donovani*-Genom mit nur einer Kopie vertreten (3.11, Abb. 22). Vorausgesetzt eine Deletion dieser Gene ist nicht letal, wäre die Herstellung von Deletionsmutanten somit für weitere Untersuchungen gut möglich und könnten einen Beitrag zur Definition der Rolle, die diese Proteine in amastigoten *L. donovani* einnehmen, leisten.

Da sich nach rekombinanter Expression das von dem *PDE*-ORF kodierte 168 kDa Protein nicht aus den Zelleinschlusskörpern lösen ließ, konnte kein Antigen zur Herstellung von Antikörpern gewonnen werden. Somit konnten keine zusätzlichen Informationen über die Expression dieses Proteins beispielsweise im Verlauf einer Stadiendifferenzierung erhalten werden.

Signale, die über den second messenger cAMP vermittelt werden, sind das Resultat der

unterschiedlichen Aktivitäten von Adenylatcyclasen und cyclischen Nucleotid-spezifischen Phosphodiesterasen. Die in Säugetieren identifizierten PDEs gehören zu einer Superfamilie, die mindestens 11 verschiedene Familien umfasst, von denen jede wiederum verschiedene Mitglieder aufweist (Seebeck *et al.*, 2001)

Es ist wenig bekannt über cAMP-vermittelte Signaltransduktionswege in Parasiten und ihre Bedeutung für die Wirts-Parasiten-Interaktion. Durch Komplementation einer PDE-defizienten Hefemutante wurde das *TbPDE1*-Gen aus *T. brucei*, identifiziert. Es scheint sich aber nicht um ein essentielles Gen zu handeln. Deletionsmutanten zeigten keinen erkennbaren Phänotyp, mit Ausnahme eines leichten Anstiegs der Generationszeit der procyclischen Form (Gong *et al.*, 2001).

Eine weitere cAMP-spezifische PDE aus *T. brucei*, *TbPDE2A*, wurde identifiziert. Das *TbPDE2A*-Gen ließ sich in *S. cerevisiae* exprimieren und konnte den Hitzeschock-suszeptiblen Phänotyp einer Deletionsmutante komplementieren (Zoraghi *et al.*, 2001).

Die Thermotoleranz-Versuche (3.10.2, Abb. 20) haben gezeigt, dass die Überexpression der mutmaßlichen *L. donovani*-PDE in *L. major* ebenfalls einen tendenziell positiven Einfluss auf das Überleben der Parasiten bei hohen Temperaturen ausübt, wenn auch der durch die Überexpression des ORF3 erzielte Effekt wesentlich stärker war. Die Überexpression des entsprechenden PDE-ORF aus *L. major* lieferte, anders als der ORF3 aus *L. major*, ähnliche Resultate. Versuche am Institut für Zellbiologie an der Universität Bern haben jedoch gezeigt, dass die Expression der mutmaßlichen *L. donovani*-PDE den Temperatur-empfindlichen Phänotyp der Hefe-Deletionsmutante nicht komplementieren kann (T. Seebeck, persönliche Mitteilung).

Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK)-Kaskaden spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation zellulärer Funktionen und der Kontrolle des Zell-Schicksals hinsichtlich Wachstum, Differenzierung oder Apoptose unter zahlreichen physiologischen Bedingungen wie auch unter Stress (Dorion und Landry, 2002).

Die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) erfordert die Phosphorylierung an spezifischen Threonin- und Tyrosin-Resten. Dieser Prozess ist reversibel, auch bei fortgesetzter aktivierender Stimulierung, was auf die Bedeutung von Protein-Phosphatasen als Mechanismus für die Kontrolle der MAPK-Aktivität hindeutet (Camps *et al.*, 1999).

Neben den Tyrosin-spezifischen Phosphatasen sind insbesondere Phosphatasen mit einer Spezifität sowohl für phosphorylierte Tyrosin- als auch phosphorylierte Threonin-Reste in die regulierte Dephosphorylierung von MAPK involviert. Ein komplexes Zusammenspiel von *upstream* wirkenden Aktivatoren und multiplen Protein-Phosphatasen sind verantwortlich für die Regulation der MAPK-Aktivität. Die Aktivität, Substratspezifität und subzelluläre Lokalisation dieser Phosphatasen sind wahrscheinlich Schlüssel-Determinanten der biologischen Wirkung von Signalen, die durch verschiedene MAPK-Wege vermittelt werden (Keyse, 1998).

Mit den aus den Eiern immunisierter Hühner gewonnenen Antikörpern, die gegen das von dem *DSP*-ORF kodierte 60 kDa Protein gerichtet sind, gelang in einer Immun-Blot-Analyse (Abb. 25G) der Nachweis des Proteins in den Lysaten der überexprimierenden *Leishmania*-Stämme. Das Protein wird jedoch offenbar in den *Leishmania*-Wildtyp-Zellen auf sehr niedrigem Niveau exprimiert. Die Empfindlichkeit des Antikörpers reichte in diesem Fall für einen Nachweis nicht

aus. Erste Immunelektronenmikroskopische Analysen deuten auf eine nukleäre Lokalisation der mutmaßlichen DSP hin (M. Krömer, persönliche Mitteilung).

Es gibt nur wenige Informationen über MAPK-Signaltransduktionswege in *Leishmania*. In *L. mexicana* wurde eine MAPK identifiziert, die für das Überleben und die Proliferation von Amastigoten in Makrophagen erforderlich ist. Die Deletion des *LMPK*-Gens führte zu einem Verlust der Virulenz. BALB/c-Mäuse, die mit dieser Mutante infiziert worden waren, zeigten keine Läsionsentwicklung. In verschiedenen *Leishmania*-Spezies, u. a. in *L. donovani*, wurden Homologe gefunden (Wiese, 1998; Wiese und Görcke, 2001).

Innerhalb welches MAPK-Signaltransduktionswegs die hier identifizierte mutmaßliche *L. donovani*-DSP ihre Wirkung entfaltet und welche Bedeutung diese Kaskade für die amastigote Form innerhalb des Säugetierwirts hat, müssten weitere Versuche zeigen. Hierzu wurde mit der Erzeugung von Nullmutanten begonnen; ein erster Versuch führte jedoch zu einem unklaren Phänotyp (Clos *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Eine transiente Aktivierung von JNK oder p38 wird gewöhnlich mit Überleben und Differenzierung assoziiert, während eine späte und anhaltende Aktivierung dieser Kinasen allgemein mit Apoptose korreliert (Dorion und Landry, 2002). Möglicherweise spielt die DSP in diesem Zusammenhang eine Rolle und fördert das Überleben der Parasiten *in vivo*, indem einem Eintritt der Zellen in die Apoptose entgegengewirkt wird.

MAPK-Kaskaden und der NF- κ B-Weg spielen in Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Funktionen, die in Entzündungsreaktionen und Wirts-Abwehr involviert sind.

Es gibt Hinweise darauf, dass bei einer Infektion mit *Leishmania* auch die Manipulierung von MAPK-Signaltransduktionswegen der Wirtszelle für die Etablierung des Parasiten eine Rolle spielt. Die Hemmung der MAPK p38 durch einen spezifischen Inhibitor verbesserte das Überleben von *L. donovani* in humanen peripheren Blut-Makrophagen (Junghae und Raynes, 2002). Privé und Descoteaux (2000) haben beobachtet, dass innerhalb der ersten 30 Minuten der Infektion das basale Niveau der MAPK p38-Phosphorylierung abfällt. Im Gegensatz zur Umgehung der ERK1/2-Aktivierung, war die fehlende Induktion von p38 unabhängig von dem Vorhandensein von LPG auf der Promastigoten-Oberfläche. Auch der Einfluss Parasiten-eigener Phosphatasen wurde in diesem Zusammenhang in Erwägung gezogen. Nandan und Reiner (1999) haben gezeigt, dass in Lysaten aus *Leishmania*-infizierten Zellen eine Aktivität vorhanden war, die eine MAP-Kinase *in vitro* dephosphorylieren konnte. In diesem Fall wurde jedoch eine Phosphatase des Parasiten ausgeschlossen und nahegelegt, dass durch die Infektion des Makrophagen eine Phosphatase des Wirts induziert wird. Ausserdem spricht die vermutete Kernlokalisation der DSP gegen eine solche Rolle in der Wirtszelle.

5. Zusammenfassung

Protozoen der Gattung *Leishmania* zeichnen sich durch eine hohe basale Thermotoleranz aus. Im Verlauf ihres biphasischen Lebenszyklus werden sie bei der Übertragung von einem poikilothermen Insektenvektor in die Haut eines homiothermen Säugetierwirts mit einem unmittelbaren und drastischen Anstieg ihrer Umgebungstemperatur konfrontiert, der ihnen keine Gelegenheit gibt, Thermotoleranz zu induzieren. Dennoch sind sie in der Lage ihre zellulären Funktionen aufrechtzuerhalten, in die amastigote Form zu differenzieren und sich im Wirt zu etablieren. Die Temperatur-Toleranz dermatroper und viszeralisierender *Leishmania*-Spezies entspricht sich jedoch nicht. Der permissive Temperatur-Bereich dermatroper Spezies geht nicht über die bei ca. 35°C liegenden Temperaturen ihres Zielorgans im Säugetierwirt, der Haut, hinaus. Viszeralisierende *Leishmania*-Spezies dagegen tolerieren auch *in vitro* die in den inneren Organen vorherrschenden höheren Temperaturen (Berman und Neva, 1981; Biegel *et al.*, 1983; Sachs *et al.*, 1983; Callahan *et al.*, 1996). Diese Korrelation zwischen der Temperatur-Toleranz verschiedener *Leishmania*-Spezies und ihrem jeweiligen Tropismus im Säugetierwirt könnte einen ursächlichen Zusammenhang widerspiegeln. Die molekularen Grundlagen der höheren Thermotoleranz viszeralisierender *Leishmania*-Spezies sind jedoch weitgehend unbekannt. Überdies ist bislang noch unklar, ob die Thermotoleranz viszeralisierender *Leishmania*-Spezies tatsächlich für die Ausbreitung der Parasiten in den inneren Organen mitverantwortlich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch einen genetischen Komplementations-*screen* basierend auf einem übertragenen Phänotyp Determinanten erhöhter Thermotoleranz aus *L. donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniase, identifiziert, sowie deren Einfluss auf den Tropismus des Temperatur-empfindlicheren Erregers der kutanen Leishmaniase, *L. major*, analysiert werden. *L. major* wurde zu diesem Zweck mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert. Nachfolgende *in vitro*-Selektionen bei für *L. major* nicht-permissiven Temperaturen dienten zunächst der Identifizierung von Cosmiden, die rekombinanten *L. major* ein Überleben bei den höheren Temperaturen ermöglichen.

Die Analyse der aus überlebenden Leishmanien isolierten Cosmid-DNA zeigte, dass die Vielfalt der rekombinanten Parasiten drastisch eingeschränkt wurde und nur Parasiten mit bestimmten Cosmiden aus den primären Temperatur-Selektionen hervorgegangen sind. In den verschiedenen Ansätzen dominierten jeweils nur ein bis zwei Cosmide. Insgesamt wurden 10 unterschiedliche Cosmide isoliert. Die Tatsache, dass diese Cosmide keine überlappenden Sequenzen aufweisen spiegelt den offensichtlich multifaktoriell determinierten Charakter des Merkmals Thermotoleranz wider.

Die nach Transfektion von *L. major* mit den jeweiligen Cosmiden erhaltenen definierten rekombinanten Stämme wurden sekundären Temperatur-Selektionen unter konkurrierenden Bedingungen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche machten deutlich, dass *L. major* insbesondere durch die Cosmide pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 ein Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen vermittelt wird.

Das Cosmid pcos11.2 ist ebenfalls eines der dominierenden Cosmide, die aus überlebenden Parasiten der sekundären Temperatur-Selektionen isoliert wurden. Dieses Cosmid ist jedoch nicht vorrangig für einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verantwortlich, sondern ermöglicht *L. major*, einen Wachstumsarrest schneller zu überwinden. Auch die mit *L. donovani* [pcos11.2] durchgeführten Versuche ergaben entsprechende Ergebnisse. Dies deutet auf einen Gendosis-abhängigen Effekt hin. Der Einsatz von Plasmid-Genbanken bei

nachfolgenden Selektionen führte zur Identifizierung von zwei Plasmiden mit pcos11.2-Sequenzen, durch die der für den Wachstumseffekt verantwortliche ORF identifiziert werden konnte. Dieser ORF kodiert für ein hypothetisches Protein von 33 kDa. In der Sequenz-Datenbank ergab sich eine signifikante Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein aus *L. major*.

Eine konkurrierende Selektion der *L. major* [pcos]-Stämme in BALB/c-Mäusen zeigte, dass bestimmte Cosmide, die im Verlauf der Temperatur-Selektionen identifiziert worden waren, auch im Säugetierwirt einen Selektionsvorteil auf *L. major* übertragen. Aus den Parasiten der Milzen wurden hauptsächlich pcos13.12 und pcos8 isoliert. Diese Cosmide enthalten möglicherweise *L. donovani*-Sequenzen, die eine Viszeralisierung fördern. Nach den Ergebnissen der sekundären *in vitro*- und *in vivo*-Selektionen war für das Cosmid pcos13.12 auch ein Zusammenhang von Thermotoleranz und Tropismus für die inneren Organe denkbar. Hinsichtlich des Cosmids pcos8, das nach den sekundären Temperatur-Selektionen nur vereinzelt aus überlebenden Parasiten isoliert worden war, schien dies jedoch nicht wahrscheinlich zu sein. Auch für pcos11.3 und pcos14.4 war ein solcher Zusammenhang nicht ersichtlich. Dass pcos11.3 aber neben pcos13.12 und insbesondere pcos8 häufig in den Parasiten der Lymphknoten vertreten war, scheint dafür zu sprechen, dass dieses Cosmid, im Gegensatz zu pcos14.4, auch *in vivo* für *L. major* von Vorteil ist.

Aus den Cosmiden konstruierte Plasmid-Genbanken ließen sich nicht erfolgreich für die Selektion auf Parasiten mit erhöhter Thermotoleranz und somit für die Eingrenzung der für den Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verantwortlichen Sequenzen einsetzen. Desgleichen gelang es nicht, die relevanten Bereiche von pcos8 mit Hilfe von Transposon-Derivaten im Rahmen einer Negativ-Selektion zu identifizieren.

Durch Sequenzanalyse identifizierte ORF der Cosmide pcos8 und pcos13.12 wurden in den Expressions-Vektor pIR(mcs2-) subkloniert und die Konstrukte nachfolgend in *L. major* transfiziert, um durch eine vergleichende Analyse der die jeweiligen ORF überexprimierenden *L. major*-Stämme, die für den Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen bzw. im Säugetierwirt verantwortlichen Gene zu identifizieren.

Die Thermotoleranz-vermittelnden Eigenschaften des Cosmids pcos13.12 sind im wesentlichen auf den *L. donovani*-ORF3 zurückzuführen. Bei Thermotoleranz-Versuchen zeichnete sich der den ORF3 überexprimierende *L. major*-Stamm *L. m.* (pIR/P-ORF3) durch eine deutlich bessere Überlebensfähigkeit gegenüber dem Kontrollstamm und auch im Vergleich zu den anderen rekombinanten Stämmen aus. Der *L. donovani*-ORF3 kodiert für ein Protein von 83 kDa. Datenbankrecherchen ergaben keine Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen. Im Gegensatz zum *L. donovani*-ORF3 verbesserte die Überexpression des homologen ORF3 aus *L. major* die Überlebensfähigkeit von *L. major* nicht. Ein Gendosis-Effekt ist daher auszuschließen.

Eine vergleichende *in vivo*-Selektion zeigte, dass für den Selektionsvorteil, der *L. major* während der Mauspassage durch pcos13.12 und pcos8 vermittelt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit der ORF1 des Cosmids pcos13.12 bzw. der ORF5 des Cosmids pcos8 verantwortlich sind. Dabei dominierten die entsprechenden überexprimierenden *L. major*-Stämme sowohl in den Parasiten der Lymphknoten als auch der Milzen. Für den ORF5 zeichnete sich ein wesentlich ausgeprägter Effekt ab.

Der ORF1 des Cosmids pcos13.12 kodiert für ein 168 kDa-Protein, das Übereinstimmungen

mit einer mutmaßlichen cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE) aufweist.

Für das 60 kDa-Genprodukt des ORF5 ergaben sich Übereinstimmungen zu einer *dual specificity phosphatase* (DSP). Durch die nach Immunisierung von Hühnern mit dem rekombinant exprimiertem Protein gewonnenen Anti-DSP-Antikörper war in einer Immun-Blot-Analyse ein Nachweis der mutmaßlichen DSP in Lysaten überexprimierender *Leishmania*-Stämme möglich, jedoch nicht in Lysaten der Wildtyp-Zellen. Es handelt sich anscheinend um ein auf sehr niedrigem Niveau exprimiertes Protein.

Die zur Bestimmung der Genkopienzahl durchgeführte Southernblot-Analyse zeigte, dass das *PDE*- und das *DSP*-Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit als *single copy*-Gene im haploiden *L. donovani*-Genom vertreten sind.

Vorläufige Ergebnisse eines ersten direkten Vergleichs lieferten einen Hinweis darauf, dass durch Überexpression der DSP in *L. major* möglicherweise die Proliferation der Parasiten im Säugetierwirt gefördert wird. Die Parasitenlast in den Lymphknoten der mit *L. major* (pIR/A-DSP) infizierten BALB/c-Mäuse war im Vergleich zu den mit dem Kontrollstamm infizierten Mäusen vierfach erhöht.

Für den durch pcos13.12 bei hohen Temperaturen bzw. im Säugetierwirt vermittelten Selektionsvorteil sind verschiedene ORF verantwortlich. Es ergab sich also auch in diesem Fall keine Verknüpfung von erhöhter Thermotoleranz und einem Tropismus für die inneren Organe. Somit lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Temperatur-Toleranz und Tropismus nach meinen Ergebnissen nicht belegen.

6. Literaturverzeichnis

- Aebischer, T. (1994): Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites? *Parasitol. Today* **10**: 25-28.
- Agnan, J., Korch, C. und Selitrennikoff, C. (1997): Cloning heterologous genes: Problems and Approaches. *Fungal Genetics and Biology* **21**: 292-301.
- Alvarez, F., Robello, C. und Vignali, M. (1994): Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.* **11**:790-802.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R. und Moreno, J. (1997): *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years: *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 298-319.
- Anderson, R. L., Van, K. I., Kraft, P. E. und Hahn, G. M. (1989): Biochemical analysis of heat-resistant mouse tumor cell strains: A new member of the HSP70 family. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3509-3516.
- Angelidis, C. E., Lazardis, I. und Pagoulatos, G. N. (1991): Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. J. Biochem.* **199**: 35-39.
- Anstead, G. M., Chandrasekar, B., Zhao, W., Yang, J., Perez, L. E. und Melby, P. C. (2001): Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect. Immun.* **69**: 4709-4718.
- Antoine, J.-C., Prina, E., Lang, T. und Courret, N. (1998): The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* **7**: 392-401.
- Aoyama, A., Fröhli, E., Schäfer, R. und Klemenz, R. (1993): α B-crystallin expression in mouse NIH 3T3 fibroblasts: Glucocorticoid responsiveness and involvement in thermal protection. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1824-1835.
- Argaman, M., Aly, R. und Shapira, M. (1994): Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**: 95-110.
- Arrigo, A.-P. und Landry, J. (1994): Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R., Tissières, A. und Georgopoulos, C., eds): 335-373. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Barrett, M. P. und Le Page, R. W. F. (1993): A 6-phosphogluconate dehydrogenase gene from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**: 89-100.
- Bastien, P., Blaineau, C. und Pages, M. (1992): *Leishmania*: Sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today* **8**: 174-177.
- Bates, P. A., Robertson, C. D., Tetley, L. und Coombs, G. H. (1992): Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitol.* **105**: 193-202.
- Bates, P. A. (1993): Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol. Today* **9**: 143-146.
- Bates, P. A. (1994): Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitol.* **108**: 1-9.

- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken, A. und Thevelein, J. M. (1998): Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 33311-33319.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. und Goldberg, A. L. (2001): Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**: 24261-24267.
- 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. *Clinical Infectious Diseases* **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.
- Beverley, S. M., Akopyants, N. S., Goyard, S., Matlib, R. S., Gordon, J. L., Brownstein, B. H., Stormo, G. D., Bukanova, E. N., Hott, C. T., Li, F., MacMillan, S., Muo, J. N., Schwertman, L. A., Smeds, M. R. und Wang, Y. (2002): Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**: 47-53.
- Bhaumik, M., Das, S. und Adhya, S. (1991): Evidence for translational control of β -tubulin synthesis during differentiation of *Leishmania donovani*. *Parasitology* **102**: 197-205.
- Biegel, D., Topper, G. und Rabinovitch, M. (1983): *Leishmania mexicana*: Temperature sensitivity of isolated amastigotes and of amastigotes infecting macrophages in culture. *Exp. Parasitol.* **56**: 289-297.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513
- Blackwell, J. M. (1996): Genetic susceptibility to leishmanial infections: Studies in mice and man. *Parasitol.* **112**: 67-74.
- Blaineau, C., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Wincker, P., Rioux, J.-A. und Roizes, G. (1989): Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 161-168.
- Blaineau, C., Bastien, P., Rioux, J.-A., Roizes, G. und Pages, M. (1991): Long-range restriction maps of size-variable homologous chromosomes in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 293-302.
- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M. und Moll, H. (1993): Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* **167**: 418-425.
- Blum, J. J. und Opperdoes, F. R. (1994): Secretion of sucrase by *Leishmania donovani*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 228-231.

- Bock, J. H. und Langer, P. J. (1993): Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**: 187-197.
- 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. und Röllinghoff, M. (1999): How do protozoan parasites survive inside Macrophages?. *Parasitol. Today* **15**: 22-28.
- Bogdan, C., Donhauser, N., Döring, R., Röllinghoff, M., Diefenbach, A. und Rittig, M. G. (2000): Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.* **191**: 2121-2129.
- Bracken, A. P. und Bond, U. (1999): Reassembly and protection of small nuclear ribonucleoprotein particles by heat shock proteins in yeast cells. *RNA* **5**: 1586-1596.
- Brandau, S., Dresel, A. und Clos, J. (1995): High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem. J.* **310**: 225-232.
- Brandau, S. (1996): Untersuchungen zur Synthese und subzellulären Lokalisation von Hitzeschockproteinen in Leishmanien. Promotionsarbeit, Universität Hamburg.
- 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.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J. P. und Wincker, P. (1998): Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222**: 107-117.
- Brown, C. R., Hong-Brown, Ly Q., Doxsey, S. J. und Welch, W. J. (1996): Molecular chaperones and the centrosome. A role for HSP73 in centrosomal repair following heat shock treatment. *J. Biol. Chem.* **271**: 833-840.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378.
- Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**: 169- 193.
- Butcher, B. A., Turco, S. J., Hilty, B. A., Pimenta, P. F., Panunzio, M. und Sacks, D. L. (1996): Deficiency in β 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J. Biol. Chem.* **271**: 20573-20579.
- Callahan, H. L., Portal, I. F., Bensinger, S. J. und Grogl, M. (1996): *Leishmania* spp.: Temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. *Exp. Parasitology* **84**: 400-409.
- Camps, M., Nichols, A. und Arkinstall, S. (1999): Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* **14**: 6-16.
- Carter, N. S., Drew, M. E., Sanchez, M., Vasudevan, G., Landfear, S. M. und Ullman, B.

- (2000): Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J. Biol. Chem.* **275**: 20935-20941.
- Carter, N., Landfear, S. M. und Ullman, B. (2001): Nucleoside transporters of parasitic protozoa. *Trends Parasitol.* **17**: 142-145.
- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S. J., Sibille, J.-C., Snapper, M., Aisen, P. und Bloom, B. R. (1989): Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2453-2457.
- Chang, K.-P. (1981): Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: 322-333.
- 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.
- Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A. und Chang, K.-P. (1989): Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* **264**: 7483-7489.
- Chen, Y. und Piper, P. W. (1995): Consequences of the overexpression of ubiquitin in yeast: elevated tolerances of osmotic stress, ethanol and canavanine, yet reduced tolerances of cadmium, arsenite and paromomycin. *Biochim. Biophys. Acta* **1268**: 59-64.
- Clayton, C. E. (1999): Genetic manipulation of kinetoplasts. *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.
- Coburn, C. M., Otteman, K. M., McNeely, T., Turco, S. J. und Beverley, S. M. (1991): Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol Biochem. Parasitol.* **46**: 169-180.
- Cohen, S. N., Chang, A. S. Y., Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110.
- Cotrim, P. C., Garrity, L. K. und Beverley, S. M. (1999): Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J. Biol. Chem.* **274**: 37723-37730.
- Craig, N. L. (1996): Transposon Tn7. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **204**: 27-48.
- Cruz, A. und Beverley, S. M. (1990): Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* **348**: 171-173.
- Cruz, A. K., Titus, R. und Beverley, S. M. (1993): Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1599-1603.
- Cuervo, A. M. und Dice, J. F. (1998): Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* **76**: 6-12.
- Das, K. P., Petrash, J. M. und Surewicz, W. K. (1996): Conformational properties of substrate proteins bound to a molecular chaperone α -crystallin. *J. Biol. Chem.* **271**: 10449-10452.
- 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.
- Dermine, J.-F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. und Desjardins, M. (2000): *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell. Microbiol.* **2**: 115-126.
- Der Perng, M., Cairns, L., van den IJssel, P., Prescott, A., Hutcheson, A. M. und Quinlan, R. A. (1999): Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and α B-crystallin. *J. Cell Sci.* **112**: 2099-2112.
- Descoteaux, A. und Turco, S. J. (1993): The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today* **9**: 468-471.
- 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 the 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.
- Descoteaux, A., Mengeling, B. J., Beverley, S. M. und Turco, S. J. (1998): *Leishmania donovani* has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **94**: 27-40.
- Descoteaux, A. und Turco, S. J. (1999): Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**: 341-352.
- Descoteaux, A., Avila, H. A., Zhang, K., Turco, S. M. und Beverley, S. M. (2002): *Leishmania LPG3* encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J.* **21**: 4458-4469.
- Desjardins, M., Nzala, N. N., Corsini, R. und Rondeau, C. (1997): Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J. Cell Sci.* **110**: 2303-2314.
- Desjardins, M. und Descoteaux, A. (1997): Inhibition of phagosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **185**: 2061-2068.
- Desjeux, P. (2001): Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 77-79.
- Desjeux, P. et al. (2000): *Leishmania*/HIV co-infection, South-western Europe, 1990-1998, WHO, CDS/CSR/EDC, WHO/LEISH/2000.42.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. und Wiemken, A. (1994): The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* **219**: 179-186.
- Djabali, K., de Nechaud, B., Landon, F. und Portier, M.-M. (1997): α B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J. Cell. Sci.* **110**: 2759-2769.
- Dominguez, M. und Torano, A. (1999): Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: The mechanism of *Leishmania* infection. *J. Exp. Med.* **189**: 25-35.

- Dorion, S. und Landry, J. (2002): Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress & Chaperones* **7**: 200-206.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Downs, C. A., Jones, L. R. und Heckathorn, S. A. (1999): Evidence for a novel set of small heat-shock proteins that associates with the mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH:ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 344-350.
- Doyle, P. S., Engel, J. C., Pimenta, P. F. P., Da Silva, P. P. und Dwyer, D. M. (1991): *Leishmania donovani*: Long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp. Parasitol.* **73**: 326-334.
- Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M. und Buchner, J. (1997): Binding of a non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**: 221-229.
- Einarson, M. B. und Golemis, E. A. (2000): Encroaching genomics: adapting large-scale science to small academic laboratories. *Physiol. Genomics* **2**: 85-92.
- Elliott, B., Haltiwanger, R. S. und Futcher, B. (1996): Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 923-933.
- Ellis, J. (1987): Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**: 378-379.
- Ellis, J. und van der Vies, S. M. (1991): Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321-347.
- Engwerda, C. R. und Kaye, P. M. (2000): Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol. Today* **21**: 73-78.
- Etges, R., Bouvier, J. und Bordier, C. (1986): The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J. Biol. Chem.* **261**: 9098-9101.
- Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N. und Lindquist (1992): The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* **6**: 1402-1413.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Finley, D., Ozkaynak, E. und Varshawsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**: 1035-1046.
- Flaspohler, J. A., Rickoll, W. L., Beverley, S. M. und Parsons, M. (1997): Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1093-1101.
- Gangneux, J.-P., Sulahian, A., Honore, 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.
- Garin, Y. J.-F., Sulahian, A., Pratlong, F., Meneceur, P., Gangneux, J.-P., Prina, E., Dedet, J.-

- P. und Derouin, F. (2001): Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect. Immun.* **69**: 7365-7373.
- Garraway, L. A., Tosi, L. R. O., Wang, Y., Moore, J. B., Dobson, D. E. und Beverley, S. M. (1997): Insertional mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system. *Gene* **198**: 27-35.
- Glaser, T. A., Baatz, J. E., Kreishman, G. P. und Mukkada, A. J. (1988): pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 7602-7606.
- Glickmann, M. H. und Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**: 373-428.
- Glover, J. R. und Lindquist, S. (1998): Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.
- Glover, J. R. und Tkach, J. M. (2001): Crowbars and ratchets: Hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochem. Cell. Biol.* **79**: 557-568.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Ben Zvi, A. P., Tomoyasu, T. und Bukau, B. (1999): Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13732-13737.
- Gong, K. W., Kunz, S., Zoraghi, R., Kunz Renggli, C., Brun, R. und Seebeck, T. (2001): cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE1 is not essential in *Trypanosoma brucei* in culture or during midgut infection of tsetse flies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**: 229-232.
- Graham, S. V. (1995): Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today* **11**: 217-223.
- Grundstein, 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.* **72**: 3961.
- Gueiros-Filho, F. J. und Beverley, S. M. (1996): Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (*DHFR-TS*) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5655-5663.
- Gueiros-Filho, F. J. und Beverley, S. M. (1997): Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the protozoan *Leishmania*. *Science* **276**: 1716-1719.
- Gupta, N., Goyal, N. und Rastogi, A. K. (2001): In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol.* **17**: 150-153.
- Guy, R. A. und Belosevic, M. (1993): Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect. Immun.* **61**: 1553-1558.
- Hahn, G. M. und Li, G. C. (1990): Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. In: Stress Proteins in Biology and Medicine (Morimoto, R., Tissières, A. und Georgopoulos, C., eds.): 79-100. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Handman, E., Hocking, R. E., Mitchell, G. F. und Spithill, T. W. (1983): Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. *Mol. Biochem.*

- Parasitol.* **7**: 111-126.
- Handman, E. (2001): Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 229-243.
- Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-580.
- Hayes, S. A. und Dice, F. J. (1996): Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J. Cell Biol.* **132**: 255-258.
- Heckathorn, S. A., Downs, C. A., Sharkey, T. D. und Coleman, J. S. (1998): The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol.* **116**: 439-444.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. und Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**: 986-994.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. und Boos, W. (1991): Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 7918-7924.
- Henikoff, S. (1984): Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Herwaldt, B. L. (1999): Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199.
- Hill, J. O. (1986): Pathophysiology of experimental leishmaniasis: pattern of development of metastatic disease in the susceptible host. *Infect. Immun.* **52**: 364-369.
- Hodgkinson, V. H., Soong, L., Monroe Duboise, S. und McMahon-Pratt, D. (1996): *Leishmania amazonensis*: Cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp. Parasitol.* **83**: 94-105.
- Höfheld, J., Cyr, D. M. und Patterson, C. (2001): From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO reports* **21**: 885-890.
- 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.
- Hong, S.-W. und Vierling, E. (2000): Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4392-4397.
- Hong, S.-W. und Vierling, E. (2001): Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* **27**: 25-35.
- 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.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M. N., Boller, T. und Wiemken, A. (1994): The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increases the thermal stability of proteins *in vitro*. *FEBS Lett.* **219**: 187-193.

- Hoyer, C. (1996): Herstellung einer Cosmid-Genbank aus *Leishmania donovani* und Isolierung Temperatur-Toleranz-vermittelnder Gene. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Hübel, A., Brandau, S., Dresel, A. und Clos, J. (1995): A member of the clpb family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**: 107-118.
- Hübel, A. und Clos, J. (1996): The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp. Parasitol.* **82**: 225-228.
- Hübel, A. (1996): Isolierung und mutagenetische Funktionsanalyse von Hitzeschock-Genen aus *Leishmania major*. Promotionsarbeit, Universität Hamburg.
- 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.
- Hunter, K. W., Cook, C. L. und Hayunga, E. G. (1984): Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 755-760.
- Ibelgaufts, H. (1993): Gentechnologie von A bis Z. VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- 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. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989.
- Jacob, U., Gaestel, M., Engel, K. und Buchner, J. (1993): Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-1520.
- Jacobson, R. L., Schlein, Y. und Eisenberger, C. L. (2001): The biological function of sand fly and *Leishmania* glycosidases. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 51-55.
- Jardim, A., Bergeson, S. E., Shih, S., Carter, N., Lucas, R. W., Merlin, G., Myler, P. J., Stuart, K. und Ullman, B. (1999): Xanthine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **274**: 34403-34410.
- Joshi, M., Dwyer, D. M. und Nakhasi, H. L. (1993): Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown „amastigotes“ of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 345-354.
- Joshi, P. B., Kelly, B. L., Kamhawi, S., Sacks, D. L. und McMaster, W. R. (2002): Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 33-40.
- Junghae, M. und Raynes, J. G. (2002): Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infect. Immun.* **70**: 5026-5035.
- 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.
- Kaye, P. M., Gorak, P., Murphy, M. und Ross, S. (1995): Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89**: 75-81.
- Kébaier, C., Louzir, H., Chenik, M., Ben Salah, A. und Dellagi, K. (2001): Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune

- response. *Infect. Immun.* **69**: 4906-4915.
- 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. Cell. Biol.* **65**: 51-62.
- Kelly, J. M. (1995): Trypanosomatid shuttle vectors: New tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitol. Today* **11**: 447-451.
- Keyse, S. M. (1998): Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *sem. in Cell & Dev. Biol.* **9**: 149-152.
- Kima, P. E., Constant, S. L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K. S., Haberman, A. M., Shlomchik, M. J. und McMahon-Pratt, D. (2000): Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **191**: 1063-1067.
- Kirchhoff, L. V., Kim, K. S., Engman, D. M. und Donelson, J. E. (1988): Ubiquitin genes in trypanosomatidae. *J. Biol. Chem.* **263**: 12698-12704.
- 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.
- Krobitsch, S. und Clos, J. (1999): A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* **4**: 191-198.
- Kündig, C., Haimeur, A., Legare, D., Papadopoulou, B. und Ouellette, M. (1999): Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.* **18**: 2342-2351.
- Kunau, W. H., Beyer, A., Franken, T., Götte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A. und Wiebel, F. F. (1993): Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Forward and reversed genetics. *Biochimie* **75**: 209-224.
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. of Biochem. and Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- Laemmli, U. K. (1979): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-686.
- Lainson, R. und Shaw, J. J. (1987): Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* (Peters, W. und Killick-Kendrick, R., eds) Volume I, pp 1-120. Academic Press, London.
- Landfear, S. M. (2001): Molecular genetics of nucleoside transporters in *Leishmania* and African trypanosomes. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 149-155.
- Landry, J., Chrétien, P., Lambert, H., Hickey, E. und Weber, L. A. (1989): Heat shock resistance conferred by expression of the human hsp27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**: 7-15.
- Laszlo, A. und Li, G. C. (1985): Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered

- in expression of heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8029-8033.
- 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.
- Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M. und Landry, J. (1993): Induction of Chinese hamster hsp27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J. Cell Biol.* **268**: 3420-3429.
- Lawrence, F. und Robert-Gero, M. (1985): Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4414-4417.
- Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J. und Milon, G. (1996): The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. *J. Immunol.* **157**: 4537-4545.
- Lee, G. J., Pokala, N. und Vierling, E. (1995): Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock Proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-10438.
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. und Vierling, E. (1997): A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.
- Lee, G. J. und Vierling, E. (2000): A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* **122**: 189-197.
- Lee, J. Y.-R., Nagao, R. T. und Key, J. L. (1994): A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast *HSP104* deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell* **6**: 1889-1897.
- Lee, M. G. und Nurse, P. (1987): Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**: 31-35.
- Lee, M. G.-S., Atkinson, B. L., Giannini, S. H. und van der Ploeg, L. H. T. (1988): Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9567-9585.
- Lee, S., Prochaska, D. J., Fang, F. und Barnum, S. R. (1998): A 16.6-kilodalton protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 plays a role in the heat shock response. *Curr. Microbiol.* **37**: 403-407.
- Lee, S., Owen, H. A., Prochaska, D. J. und Barnum, S. R. (2000): HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol* **40**: 283-287.
- Lemley, C., Yan, S., Dole, V. S., Madhubala, R., Cunningham, M. L., Beverley, S. M., Myler, P. J. und Stuart, K. D. (1999): The *Leishmania donovani* LD1 locus gene *ORFG* encodes a bipterin transporter (BT1). *Mol. Biochem. Parasitol.* **104**: 93-105.
- Leopold, P. und O'Farrell, P. (1991): An evolutionary conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins. *Cell* **66**: 1207-1216.
- Lew, D. J., Dulic, V. und Reed, S. I. (1991): Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**: 1197-1206.

- Li, G. C. und Werb, Z. (1982): Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 3218-3222.
- Li, G. C., Li, L., Liu, Y-K., Mak, J. Y., Chen, L. und Lee, W. M. F. (1991): Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1681-1685.
- Lindquist, S. (1986): The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1151-1191.
- Lira, R., Mendez, S., Carrera, L., Jaffe, C., Neva, F. und Sachs, D. (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.
- Locksley, R. M. und Louis, J. A. (1992): Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 413-418.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Ma, D., Russell, D. G., Beverley, S. M. und Turco, S. J. (1997): Golgi GDP-mannose uptake requires *Leishmania* LPG2. *J. Biol. Chem.* **272**: 3799-3805.
- Magill, A. J., Grogl, 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.
- Mäser, P., Sütterlin, C., Kralli, A. und Kaminsky, R. (1999): A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* **285**: 242-244.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E. und Tschudi, C. (2000): A new twist in trypanosome RNA metabolism: Cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* **6**: 163-169.
- Martinez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S., Fox, M., Stuart, K. und Myler, P. J. (2001): Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**: 147-157.
- Matte, C. und Olivier, M. (2002): *Leishmania*-induced cellular recruitment during early inflammatory response: Modulation of proinflammatory mediators. *J. Infect. Dis.* **185**: 673-681.
- Mayer, M. P., Brehmer, D., Gässler, C. S. und Bukau, B. (2002): Hsp70 chaperone machines. In: *Advances in protein chemistry* (Richards, F. M., Eisenberg, D. S., Kuriyan, J., eds.) **59**: 1-44. Academic Press.
- McFarlane, J., Blaxter, M. L., Bishop, R. P., Miles, M. A. und Kelly, J. M. (1990): Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat shock protein family. *Eur. J. Biochem.* **190**: 377-384.
- Melby, P. C., Yang, Y.-Z., Cheng, J. und Zhao, W. (1998): Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **66**: 18-27.

- Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W. und Coe, J. E. (2001): 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.
- Méndez, S., Fernández-Pérez, F. J., Santín, M., De La Fuente, C., Cuquerella, M., Gómez-Munoz, M. T. und Alunda, J. M. (2001): Correlation between in vitro and in vivo infectivity of *Leishmania infantum* clones. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 616-621.
- Merck, K. B., Groenen, P. J., Voorter, C. E., de Haard-Hoekman, W. A., Horwitz, J., Bloemendal, H. und de Jong, W. W. (1993): Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1052.
- Miller, M. A., McGowan, S. E., Gantt, K. R., Champion, M., Novick, S. L., Andersen, K. A., Bacchi, C. J., Yarlett, N., Britigan, B. E. und Wilson, M. E. (2000): Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *J. Biol. Chem.* **275**: 33883-33889.
- Mißlitz, A., Mottram, J. C., Overath, P. und Aebischer, Toni. (2000): Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **107**:251-261.
- Mösch, H.-U. und Fink, G. R. (1997): Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**: 671-684.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H. und Bukau, B. (1999): Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**: 6934-6949.
- 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., Flohe, S. und Röllinghoff, M. (1995): Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur. J. Immunol.* **25**: 693-699.
- Moll, H., Ritter, U., Flohe, S., Erb, K., Bauer, C. und Blank, C. (1996): Cutaneous leishmaniasis: A model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **184**: 163-168.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C. und Massie, B. (1997): Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5317-5327.
- Mosser, D. M. und Edelson, P. J. (1985): The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.* **135**: 2785-2789.
- Mosser, D. M. und Edelson, P. J. (1987): The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* **327**: 329-331.
- Mosser, D. M. und Brittingham, A. (1997): *Leishmania* macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitol.* **115**: 9-23.
- Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M. und Yoshida, M. (1999): Heat-inactivated proteins

- are rescued by the DnaK 'J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 7184-7189.
- Mottram, J. C., Souza, A. E., Hutchison, J. E., Carter, R., Frame, M. J., und Coombs, G. H. (1996): Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulent factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6008-6013.
- Moxon, E. R., Hood, D. W., Saunders, N. J., Schweda, E. K. H. und Richards, J. C. (2002): Functional genomics of pathogenic bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**: 109-116.
- 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.
- Mukkada, A. J., Meade, J. C., Glaser, T. A. und Bonventre, P. F. (1985): Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: An adaptation for intracellular growth. *Science* **229**: 1099-1101.
- Myler, P. J., Audleman, L., Vos de, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. und Stuart, K. (1999): *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 2902-2906.
- Myler, P. J., Sisk, E., McDonagh, P. D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S. M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A. und Stuart, K. (2000): Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 527-531.
- Nakamoto, H., Suzuki, N. und Roy, S. K. (2000): Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Lett.* **483**: 169-174.
- 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 oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **67**: 4055-4063.
- Nathan, D. F., Vos, M. H. und Lindquist, S. (1997): In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12949-12956.
- Nathan, D. F., Harju Vos, M. und Lindquist, S. (1999): Identification of *SSF1*, *CNS1*, and *HCH1* as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1409-1414.
- Nieto-Sotelo, J., Martinez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., Alagon, A., Meeley, R. B., Ribaut, J.-M. und Yang, R. (2002): Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* **14**: 1621-1633.
- Nilsen, T. W. (1995): Trans-splicing: An update. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**: 1-6.
- Nolan, T. J. und Herman, R. (1985): Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.* **32**: 70-75.
- Nwaka, S. und Holzer, H. (1997): Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**: 197-237.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. und Okayama, H. (1990): High-

- frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6485-6489.
- Oliver, S. G. (2002): Functional genomics: lessons from yeast. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**: 17-23.
- Pages, M., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Wincker, P., Rioux, J. A. und Roizes, G. (1989): Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggests amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 161-168.
- Pahl, A. Kühlbrandt, U., Brune, K., Röllinghoff, M. und Gessner, A. (1999): Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by *real-time* PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1958-1963.
- Pan, A. A. (1984): *Leishmania mexicana*: Serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp. Parasitol.* **58**: 72-80.
- Pan, A. A. und Pan, S. C. (1986): *Leishmania mexicana*. Comparative fine structure of amastigotes and promastigotes *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol.* **62**: 254-265.
- Pan, A. A., Monroe Duboise, S., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinson, V., Traub-Cseko, Y. und McMahon-Pratt, D. (1993): Developmental life cycle of *Leishmania* - Cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 213-223.
- Panton, L. J., Tesh, R. B., Nadeau, K. und Beverley, S. M. (1991): A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J. Protozool.* **38**: 224-228.
- Parag, H. A., Raboy, B. und Kulka, R. G. (1987): Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* **6**: 55-61.
- Parsell, D. A., Taulien, J. und Lindquist, S. (1993): The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **339**: 279-286.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. und Lindquist, S. (1994): Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.
- Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1993): The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 437-496.
- Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1994): Heat shock proteins and stress tolerance. In: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Morimoto, R., Tissières, A. und Georgopoulos, C., eds): 457-494. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pearson, R. D. und Steigbigel, R. T. (1981): Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **127**: 1438-1443.
- Pearson, R. D., De Queiroz Sousa, A. und Jeronimo, S. M. B. (2000): *Leishmania* species: Visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., eds.) Fifth Edition, Vol. 2, pp 2831-2845. Churchill Livingstone.
- Pedrosa, A. L. und Cruz, A. K. (2002): The effect of location and direction of an episomal gene on the restoration of a phenotype by functional complementation in *Leishmania*. *Mol.*

- Biochem. Parasitol.* **122**: 141-148.
- Pelham, H. R. B. (1990): Functions of the hsp70 protein family: An overview. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto, R., Tissières, A. und Georgopoulos, C., eds): 287-299. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Peri, S., Ibarrola, N., Blagoev, B., Mann, M. und Pandey, A. (2001): Common pitfalls in bioinformatics-based analyses: Look before you leap. *Trends in Genetics.* **17**: 541-545.
- 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.
- Petko, L. und Lindquist, S. (1986): Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* **45**: 885-894.
- 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., Saraiva, E. M. B., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., Turco, S. L. und Sacks, D. L. (1994): Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphism in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 9155-9159.
- Pinelli, E. und Shapira, M. (1990): Temperature-induced expression of proteins in *Leishmania mexicana amazonensis*. A 22-kDa protein is possibly localized in the mitochondrion. *Eur. J. Biochem.* **194**: 685-691.
- Plon, S. E., Leppig, K. A., Do, H. N. und Groudine, M. (1993): Cloning of the human homolog of the CDC34 cell cycle gene by complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10484-10488.
- Polson, A., von Wechmar, B. M. und van Regenmortel, M. H. V. (1980): Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Communication* **9**: 475-493.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. und van der Merve, K. J. (1985): Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Investigations* **14**: 323-327.
- Potter, H. (1988): Electroporation in biology: methods, applications and instrumentation. *Anal. Biochem.* **174**: 361-373.
- Privé, C. und Descoteaux, A. (2000): *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2235-2244.
- Proudfoot, L., O'Donnell 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., Wei, X.-Q., Ferguson, M. A. J., Brimacombe, J. S. und Liew, F. Y. (1996): Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 10984-10989.

- Puentes, S. M., Sacks, D. L., Da Dilva, R. P. und Joiner, K. A. (1988): Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **167**: 887-902.
- Puentes, S. M., Dwyer, D. M., Bates, P. A. und Joiner, K. A. (1989): Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* **143**: 3743-3749.
- 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.
- Queitsch, C., Hong, S-W., Vierling, E. und Lindquist, S. (2000): Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 479-492.
- Rainey, P. M., Spithill, T. W., McMahon-Pratt, D. und Pan, A. A. (1991): Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 111-118.
- Ravel, C., Macari, F., Bastien, P., Pages, M. und Blaineau, C. (1995): Conservation among Old World *Leishmania* species of six physical linkage groups defined in *Leishmania infantum* small chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69**: 1-8.
- Ravel, C., Wincker, P., Blaineau, C., Britto, C., Bastien, P. und Pages, M. (1996): Medium-Range restriction maps of five chromosomes of *Leishmania infantum* and localization of size-variable regions. *Genomics* **35**: 509-516.
- Ravel, C., Dubessay, P., Ivens, A., Blackwell, J. M. und Bastien, P. (1998): The *Leishmania* Genome Network. *Parasitol. Today* **14**: 301-303.
- Ravel, C., Dubessay, P., Britto, C., Blaineau, C., Bastien, P. und Pages, M. (1999): High conservation of the fine-scale organisation of chromosome 5 between two pathogenic *Leishmania* species. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2473-2477.
- Razkin, B. und Carbon, J. (1977): Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 487-491.
- Reiner, N. E. (1994): Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today* **15**: 374-381.
- Reiner, S. L. und Locksley, R. M. (1995): The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 151-177.
- Rey-Ladino, J. A., Joshi, P. B., Singh, B., Gupta, R. und Reiner, N. E. (1997): *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp. Parasitol.* **85**: 249-263.
- Riabowol, K. T., Mizzen, L. A. und Welch, W. J. (1988): Heat shock is lethal to fibroblasts mikroinjiziert with antibodies against hsp70. *Science* **242**: 433-436.
- Ribeiro, M. J. S., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A. und De Virgilio, C. (1997): Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **25**: 571-581.
- Rittig, M. G. und Bogdan, C. (2000): *Leishmania*-host-cell interactions: Complexities and alternative views. *Parasitol. Today* **16**: 292-297.

- Rollet, E., Lavoie, J. N., Landry, J. und Tanguay, R. M. (1992): Expression of *Drosophila*'s 27 kDa heat shock protein into rodent cells confers thermal resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 116-125.
- Rosenthal, L. A., Sutterwala, F. S., Kehrl, 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. (1987): The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur. J. Biochem.* **164**: 213-221.
- Ryan, K. A., Dasgupta, S. und Beverley, S. M. (1993a): Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene* **131**: 145-150.
- Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J. und Beverley, S. M. (1993b): Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 8609-8613.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumbee, J., Turco, S. J. und Zilberstein, D. (1998): Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**: 9-20.
- Sacks, D. L., Barral, A. und Neva, F. (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. und Perkins, P. V. (1984): Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**: 1417-1419.
- Sacks, D. L. (1989): Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitology.* **69**: 100-103.
- Sacks, D. L., Brodin, T. N. und Turco, S. J. (1990): Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 225-234.
- 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**: 55-62.
- Sacks, D. L., Kenney, R. T., Kreutzer, R. D., Jaffe, C. L., Gupta, A. K., Sharma, M. C., Sinha, S. P., Neva, F. A. und Saran, R. (1995): Indian kala azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* **345**: 959-961.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J. und Beverley, S. M. (2000): The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 406-411.
- Sacks, D. und Kamhawi, S. (2001): Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 453-483.
- 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.
- Samali, A., Robertson, J. D., Peterson, E., Manero, F., van Zeijl, L., Paul, C., Cotgreave, I. A.,

- Arrigo, A.-P. und Orrenius, S. (2001): Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chap.* **6**: 49-58.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, Y. und Lindquist, S. (1990): HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112-1115.
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A. und Lindquist, S. (1992): Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357-2364.
- Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A. und Lindquist, S. (1993): Genetic evidence for a functional relationship between Hsp 104 and Hsp70. *J. of Bact.* **175**: 6484-6491.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **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.* **89**: 9944-9948.
- Schirmer, E. C., Lindquist, S. und Vierling, E. (1994): An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**: 1899-1909.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R. Singer, M. A. und Lindquist, S. (1996): HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 289-296.
- Schlein, Y. (1993): *Leishmania* and the sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today* **9**: 255-258.
- Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. und Clos, J. (2000): Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim. Biophys. Acta* **1491**: 65-74.
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F.-U. und Bukau, B. (1993): DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *Embo J.* **12**: 4137-4144.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.-F., Meresse, S., Descoteaux, A. und Desjardins, M. (1999): Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol.* **1**: 19-32.
- Searle, S., Campos, A. J., Coulson, R. M., Spithill, T. W. und Smith, D. F. (1989): A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 5081-5095.
- Searle, S., McCrossan, M. V. und Smith, D. F. (1993): Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Cell Sci.* **104**: 1091-1100.
- Searle, S. und Smith, D. F. (1993): *Leishmania major*: characterization and expression of a cytoplasmic stress-related protein. *Exp. Parasitol.* **77**: 43-52.
- 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.
- Seebeck, T., Gong, K. W., Kunz, S., Schaub, R., Shalaby, T. und Zoraghi, R. (2001): cAMP signalling in *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 491-498.
- Segovia, M., Artero, J. M., Mellado, E. und Chance, M. L. (1992): Effects of long-term *in vitro* cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **86**: 347-354.
- Segovia, M. und Ortiz, G.: LD1 amplification in *Leishmania*. *Parasitol. Today* **13**: 342-348.
- Seufert, W. und Jentsch, S. (1990): Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**: 543-550.
- Shakarian, A. M. und Dwyer, D. M. (2000): Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp. Parasitology* **94**: 238-242.
- Shapira, M., McEwen, J. G. und Jaffe, C. L. (1988): Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* **7**: 2895-2901.
- Shapira, M. und Pinelli, E. (1989): Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. *Eur. J. Biochem.* **185**: 231-236.
- Shapira, M., Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Dahan, I. und Yavesky, V. (2001): Post transcriptional control of gene expression in *Leishmania*. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 23-26.
- Shapiro, T. A. und Englund, P. T. (1995): The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 117-143.
- Singer, M. A. und Lindquist, S. (1998a): Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotech.* **16**: 460-468.
- Singer, M. A. und Lindquist, S. (1998b): Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molec. Cell* **1**: 639-648.
- Skowyra, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1990): The *E. coli dnaK* gene product, the hsp70 homologue, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP-hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**: 939-944.
- Solbach, W. und Laskay, T. (2000): The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* **74**: 275-317.
- Solomon, J. M., Rossi, J. M., Golic, K., McGarry, T. und Lindquist, S. (1991): Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *New Biol.* **3**: 1106-1120.
- Soto, A., Allona, I., Collada, C., Guevara, M.-A., Casado, R., Rodriguez-Cerezo, E., Aragoncillo, C. und Gomez, L. (1999a): Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol.* **120**: 521-528.
- Soto, T., Fernandez, J., Vicente-Soler, J., Cansado, J. und Gacto, M. (1999b): Accumulation of trehalose by overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphat synthase,

- causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Envir. Microbiol.* **65**: 2020-2024.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Späth, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J. und Beverley, S. (2000): Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9258-9263.
- Späth, G. F. und Beverley (2001): A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp. Parasitol* **99**: 97-103.
- Spratt, B. G., Hedge, P. J., te Heesen, S., Edelman, A. und Broome-Smith, J. K. (1986): Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**:337-342.
- Squires, C. L., Pedersen, S., Ross, B. M. und Squires, C. (1991): ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. of Bact.* **173**: 4254-4262.
- Stellwagen, A. E. und Craig, N. L. (1997a): Gain-of-function mutations in TnsC, an ATP-dependent transposition protein that activates the bacterial transposon Tn7. *Genetics* **145**: 573-585.
- Stellwagen, A. E. and Craig, N. L. (1997b): Avoiding self: two Tn7-encoded proteins mediate target immunity in Tn7 transposition. *EMBO J.* **16**: 6823-6834.
- Stiles, J. K., Hicock, P. I., Shah, P. H. und Meade, J. C. (1999): Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Annals Trop. Med. Parasitol.* **93**: 781-807.
- Struhl, K., Cameron, J. R. und Davis, R. W. (1976): Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 1471-1475.
- Stryer, L. (1991): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, New York.
- Studier, F. W. und Moffat, B. A. (1986): Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990): Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakaborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J. und Russell, D. G. (1994): Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**:678-681.
- 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.
- Sunderkötter, C., Kunz, M. Steinbrink, K., Meinardus-Hager, G., Goebeler, M., Bildau, H. und Sorg, C. (1993): Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more

- rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **151**: 4891-4901.
- Sunkin, S. M., Kiser, P., Myler, P. J., und Stuart, K. (2000): The size difference between *Leishmania major* Friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**: 1-15.
- Sunkin, S. M., McDonagh, P., Cunningham, M. L., Beverley, S. M., Stuart, K. und Myler, P. J. (2001): Conservation of the LD1 region in *Leishmania* includes DNA implicated in LD1 amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**: 515-321.
- Tacchini-Cottier, F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., Milon, G. und Louis, J. A. (2000): An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.* **165**: 2628-2636.
- Thomas, J. G. und Banexy, F. (1998): Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J. Bacteriol.* **180**: 5165-5172.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. und Ayala, F. J. (1990): A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomic consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2414-2418.
- Török, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E. Crowe, J. H. und Vigh, L. (2001): Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 3098-3103.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Toye, P. und Remold, H. (1989): The influence of temperature and serum deprivation on the synthesis of heat-shock proteins and alpha and beta tubulin in promastigotes of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**: 1-10.
- Van den Ijssel, P. R. L. A., Overkamp, P., Knauf, U. Gaestel, M. und de Jong, W. W. (1994): α A-crystallin confers cellular thermoresistance. *FEBS Lett.* **355**: 54-56.
- Van der Ploeg, L. H. T., Giannini, S. H. und Cantor, C. R. (1985): Heat shock genes: Regulatory role of differentiation in parasitic protozoa. *Science* **228**: 1443-1446.
- Van Hellemond, J. J., Neuville, P., Schwarz, R. T., Matthews, K. R. und Mottram, J. C. (2000): Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *J. Biol. Chem.* **275**: 8315-8323.
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A. und de Souza, W. (2002): Cell biology of *Leishmania* spp.: Invading and evading. *Curr. Pharmaceutical. Design* **8**: 297-318.
- Vasudevan, G., Carter, N. S., Drew, M. E., Beverley, S. M., Sanchez, M. A., Seyfang, A., Ullman, B. und Landfear, S. M. (1998): Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 9873-9878.

- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J. und Goloubinoff, P. (1998): The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J. Biol Chem.* **273**: 11032-11037.
- Velazquez, J. M., Sonoda, S., Bugaisky, G. und Lindquist, S. (1983): Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell Biol.* **96**: 286-290.
- Vogel, J. L., Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1995): Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Curr. Biol.* **5**: 306-317.
- Walder, J. A., Eder, P. S., Engman, D. M., Brentano, S. T., Walder, R. Y., Knutzon, D. S., Dorfman, D. M. und Donelson, J. E. (1986): The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science* **233**: 569-571.
- Wang, Y., Dimitrov, K., Garrity, L. K., Sazer, S. und Beverley, S. M. (1998): Stage-specific activity of the *Leishmania major* CRK3 kinase and functional rescue of a *Schizosaccharomyces pombe* cdc2 mutant. *Mol. Biochem. Parasitol.* **96**: 139-150.
- Wei, X-Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.-J., Huang, F.-P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. und Liew, F. Y. (1995): Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**: 408-411.
- Welch, W. J. (1990): The mammalian stress response: Cell physiology and biochemistry of stress proteins. In *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto, R., Tissières, A. und Georgopoulos, C., eds): 223-278. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Welch, W. J. (1992): Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* **72**: 1063-1080.
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S. und Thevelein, J. M. (1999): Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **343**: 621-626.
- Wiese, M. (1998): A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBO J.* **17**: 2619-2628.
- Wiese, M. und Görcke, I. (2001): Homologues of LMPK, a mitogen-activated protein kinase from *Leishmania mexicana*, in different *Leishmania* species. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 19-22.
- Wiesgigl, M. und Clos, J. (2001): Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* **12**: 3307-3316.
- 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. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1688-1694.
- Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H. und Britton, S. (1999): *Leishmania*/HIV interaction: Immunopathogenic mechanisms. *Parasitol. Today* **15**: 182-187.
- Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., Desjeux, P. und Britton, S. (2001): Emerging *Leishmania*/HIV co-infection in Africa. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 65-67.
- Wright, S. D. und Silverstein, S. C. (1983): Receptors for C3b und C3bi promote

- phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**: 2016-2023.
- Yan, S., Lodes, M. J., Fox, M., Myler, P. J. und Stuart, K. (1999): Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promotor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **103**: 197-210.
- Yan, S., Myler, P. J. und Stuart, K. (2001): Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **112**: 61-69.
- Yeh, C.-H., Chang, P-F. L., Yeh, K.-W., Lin, W.-C., Chen, Y.-M. und Lin, C.-Y. (1997): Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 10967-10972.
- Yost, H. J. und Lindquist, S. (1991): Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1062-1068.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., Gaxiola, R., Covarrubias, A. A., Nieto-Sotelo, J., Thevelein, J. M. und Iturriaga, G. (1999): A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphat synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol.* **119**: 1473-1482.
- Zhang, W. W. und Matlashewski, G. (1997): Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 8807-8811.
- Zhang, W. W. und Matlashewski, G. (2001): Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol. Microbiol.* **39**: 935-948.
- Zilberstein, D. und Shapira, M. (1994): The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 449-470.
- Zolkiewski, M. (1999): ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. *J. Biol. Chem.* **274**: 28083-28086.
- Zoraghi, R., Kunz, S., Gong, K. und Seebeck, T. (2001): Characterization of TbPDE2A, a novel cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **276**: 11559-11566.

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn PD Dr. J. Clos, für die Vergabe des Themas, die Betreuung der Arbeit sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. L. Renwrantz danke ich sehr für seine Tätigkeit als Gutachter meiner Arbeit.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich herzlich bei den lieben KollegInnen der Arbeitsgruppe Leishmaniasis bedanken. Es war eine schöne Zeit mit euch. Bei Anne MacDonald und Dorothea Zander bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei den so häufig angefallenen „Fließband“-Arbeiten. Doro danke ich auch für ihre Hilfe bei den Subklonierungen. Für die Durchführung der Arbeiten rund um die Elektronenmikroskopie sowie für seine Hilfe bei den Infektionen der Mäuse und den Immunisierungen der Hühner möchte ich mich bei Manfred Krömer bedanken.

Für die Sequenzanalyse der Cosmide bin ich Herrn Dr. M. Schilhabel vom IMB in Jena zu Dank verpflichtet.

Bei Alexandra Schulze und Dr. Sebastian Graefe aus der Medizinischen Zentraldiagnostik des BNI bedanke ich mich für die Durchführung und Auswertung der *real time*-PCR.