

Rolle und Funktion Parasitenspezifischer Gene im Lebenszyklus von *Leishmania spp.*

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

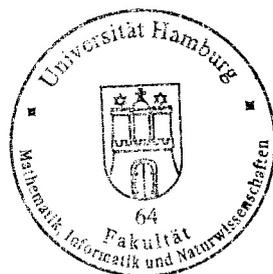
vorgelegt von

Mareike Chrobak
aus Kiel

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. J. CLOS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. W. SCHÄFER
Tag der Disputation: 20. August 2010

Hamburg, den 05. August 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit wurde zwischen Juni 2007 und Juni 2010 unter der Anleitung und in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Clos in der Abteilung Parasitologie des Bernhard-Nocht- Instituts für Tropenmedizin durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Joachim Clos
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Parasitologie
Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer
Biozentrum Klein Flottbek, Molekulare Phytopathologie und Genetik
Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

FÜR THOMAS

Du bist das Beste was mir je passiert ist,
es tut so gut wie du mich liebst.
Ich sags dir viel zu selten,
es ist schön dass es dich gibt.

Wenn sich mein Leben überschlägt,
bist du die Ruhe und die Zuflucht.
Weil alles was du mir gibst,
einfach so unendlich gut tut.

Wenn ich rastlos bin,
bist du die Reise ohne Ende.
Deshalb leg ich meine kleine große Welt
in deine schützenden Hände.

- Silbermond -

Danksagung

Großer Dank gebührt zu allererst meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Joachim Clos. Lieber Joachim, danke für deine konstruktive Kritik, deine engagierte, enthusiastische Betreuung und dein stets offenes Ohr für all meine Fragen.

Herrn Professor Schäfer danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe *Leishmaniasis I* bedanken, insbesondere bei Dorothea Zander für die Durchführung der *real-time* RT-PCR und bei Sarah Meisel für die Unterstützung beim HslVU Projekt. Euch allen ein großes Dankeschön für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die Teilprojekte dieser Dissertation übernommen haben, möchte ich hier danken: Sabine Lorenz für die HslU2-KO, Doreen Gutzke für die GFP-Konstrukte und Zahra Mojtahedi für das pJC45-P46 Plasmid. Großer Dank gilt auch Manfred Krömer, der einen Großteil der Infektionsexperimente durchgeführt hat. Wir vermissen dich!

Ein herzliches Dankeschön an Christel Schmetz und Silke Retzlaff für die Durchführung der Elektronenmikroskopie und die Geduld, die sie mir beim Erklären aller Details entgegen gebracht haben.

Ganz besonderer Dank geht an Gabi Ommen und Annika Rennenberg für all die kritischen Anregungen, das stundenlange Korrekturlesen und viele intensive Gespräche. Ich bin froh, dass ich so wunderbare Menschen wie euch meine Freunde nennen darf ;-)

Natürlich müssen an dieser Stelle auch alle „Kogge-ianer“ erwähnt werden, die mir jede Woche das Bergfest verschönert haben. Was seid ihr bloß für eine geile Truppe. Danke für all die Kicker-Trainings-Stunden!

Ohne die Liebe und Unterstützung meiner Eltern, Geschwister und Großeltern wäre all das nicht möglich gewesen. Ich danke Euch aus tiefstem Herzen für alles, was Ihr für mich getan habt.

Mein größter Dank gilt dem Menschen, der all meine Launen, Nörgeleien, Hochs und Tiefs ertragen hat und trotzdem immer wieder Worte der Aufmunterung fand. Thomas, Du bist einfach das Beste, was mir je passiert ist. Danke für deine unendliche Liebe und den Glauben an mich. Ich freue mich auf unsere neue Zukunft zu dritt und auf all die aufregenden Dinge, die uns gemeinsam noch bevorstehen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	4
<hr/>	
1.1. Leishmaniasen	4
1.2. Aufbau und Lebenszyklus der Leishmanien	5
1.3. Invasionsstrategien der Parasiten	7
1.4. Immunantwort im Säugetierwirt	9
1.5. <i>Leishmania</i> Infektion im Tiermodell	10
1.6. Behandlung der Leishmaniasen	11
1.7. Strategien zur Ermittlung neuer Zielstrukturen	12
1.7.1. <i>functional cloning</i> in <i>Leishmania</i>	13
1.7.2. <i>functional cloning</i> zur Identifizierung von Virulenzfaktoren	13
1.7.3. Datenbankrecherche	15
1.7.3.1. Das bakterielle HsIVU	16
1.7.3.2. HsIV und HsIU in <i>Leishmania spp.</i>	17
1.8. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
<hr/>	
2.1. Material	20
2.1.1. Chemikalien	20
2.1.2. Geräte und sonstige Materialien	20
2.1.3. Kits	21
2.1.4. Enzyme und Größenstandards	21
2.1.5. Antikörper	22
2.1.6. Vektoren und Oligonukleotide	22
2.1.7. Verwendete Organismen und Stämme	26
2.1.8. Nährmedien, Antibiotika, häufig verwendete Puffer und Lösungen	27
2.2. Methoden	29
2.2.1. Zellkultur von Leishmanien	29
2.2.1.1. Kultivierung promastigoter Leishmanien	29
2.2.1.2. Kryokonservierung von Leishmanien	29
2.2.1.3. Transfektion	29
2.2.1.4. Serielle Verdünnung von Mischpopulationen	30

2.2.1.5.	<i>In vitro</i> Differenzierung	30
2.2.1.6.	Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern	30
2.2.1.7.	Fixierung von Leishmanien	31
2.2.1.8.	Herstellung von <i>Leishmania</i> Antigen	31
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	31
2.2.2.1.	Anzucht und Konservierung von <i>E. coli</i>	31
2.2.2.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	32
2.2.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.2.	Semi-quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	33
2.2.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.3.4.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen	34
2.2.3.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.2.3.6.	Restriktionsverdau von DNA	35
2.2.3.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.3.8.	<i>Fill-In</i> Reaktion mit Klenow-Enzym	35
2.2.3.9.	Dephosphorylierung von DNA	36
2.2.3.10.	Phenol-Chloroform-Extraktion	36
2.2.3.11.	Ethanol-fällung von DNA	36
2.2.3.12.	Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien	36
2.2.3.13.	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	37
2.2.3.14.	Isolierung hochreiner Plasmid-DNA	37
2.2.3.15.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	38
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.4.1.	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	38
2.2.4.2.	Aufreinigung durch Affinitätschromatographie	39
2.2.4.3.	Dialyse und Einengen von Proteinlösungen	40
2.2.4.4.	Quantitative Proteinbestimmung	40
2.2.4.5.	Denaturierender Zellaufschluss	40
2.2.4.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.2.4.7.	Coomassie-Brilliant-Blau Färbung	41
2.2.4.8.	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen	42
2.2.4.9.	Native Größenausschluss-PAGE	42

2.2.4.10. Western Blot	43
2.2.5. Immunologische Methoden	44
2.2.5.1. Immunisierung und Antikörpergewinnung	44
2.2.5.2. Generierung von murinen Knochenmarksmakrophagen	44
2.2.5.3. <i>In vitro</i> Infektionsversuche	45
2.2.5.4. Passage von <i>L. major</i> in BALB/c und C57BL/6 Mäusen	45
2.2.5.5. Isolierung von Lymphknotenzellen	46
2.2.5.6. Stimulation von Lymphknotenzellen mit <i>L</i> -Ag oder anti-CD3	46
2.2.5.7. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	46
2.2.5.8. Immunfluoreszenzmikroskopie	57
2.2.5.9. Immunelektronenmikroskopie	57
2.2.6. Datenverarbeitung	48
2.2.6.1. Datenbankanalyse	48
2.2.6.2. Bildbearbeitung	48
2.2.6.3. Statistische Auswertung	49
3. Ergebnisse	50
<hr/>	
3.1. Charakterisierung eines Virulenzfaktors aus <i>L. major</i>	50
3.1.1. Datenbankanalyse des P46 (LmjF33.3060)	50
3.1.2. Klonierung und Transfektion des pcosP46	51
3.1.3. Vergleich des P46 mRNA Levels verschiedener Mutanten	52
3.1.4. <i>In vivo</i> Studien der P46 Überexpression und deren Immunantwort	53
3.1.4.1. BALB/c Mauspassage	53
3.1.4.2. Zytokinantwort im BALB/c Mausmodell	55
3.1.4.3. P46 Überexpression im C57BL/6 Mausmodell	56
3.1.4.4. Zytokinantwort in der C57BL/6 Maus	57
3.1.4.5. C57BL/6 Mauspassage mit <i>L. major</i> FEBNI	58
3.1.4.6. Zytokinantwort in C57BL/6 Maus nach <i>L. major</i> FEBNI Infektion	59
3.1.5. Herstellung eines spezifischen Antiserums	60
3.1.5.1. Klonierung des pJC-Expressionsvektors	60
3.1.5.2. Antikörper Herstellung und Western Blot Analysen	60
3.1.6. Verifizierung des nativen Laufverhaltens von P46	61
3.1.7. Lokalisation des P46 in promastigoten <i>L. major</i> 5ASKH	62
3.1.8. Lokalisation des P46 in infizierten Knochenmarksmakrophagen	64
3.1.9. Infektionsraten und Parasitenlast infizierter Makrophagen	67

3.1.10. Herstellung von Genaustauschmutanten	68
3.1.10.1. Klonierung der Genaustauschkonstrukte und des <i>add back</i>	68
3.1.10.2. Transfektion und Selektion	70
3.2. Charakterisierung des putativen Peptidasekomplexes HsIVU aus <i>Leishmania donovani</i>	71
3.2.1. Herstellung spezifischer Antiseren	71
3.2.1.1. Klonierung der Expressionsvektoren	71
3.2.1.2. Antigen-Aufreinigung, Immunisierung und Analyse des Antiserums	71
3.2.2. Expression während der Stadiendifferenzierung	73
3.2.3. Natve PAGE zur Verifizierung oligomerer Strukturen	74
3.2.4. Subzelluläre Lokalisation der HsIV und HsIU Proteine in Promastigoten	75
3.2.4.1. Herstellung von GFP-Fusionsproteinen	75
3.2.4.2. Lokalisation des HsIV Proteins in <i>L. donovani</i> Promastigoten	76
3.2.4.3. Lokalisation der HsIU Proteine in <i>L. donovani</i> Promastigoten	78
3.2.4.4. Kollokalisierung in Promastigoten	80
3.2.5. Reverse Genetik zur Analyse der HsIV und HsIU Gene	82
3.2.5.1. Klonierung der Genaustauschkonstrukte	83
3.2.5.2. Klonierung der <i>gene add back</i> Konstrukte	84
3.2.5.3. Transfektion und Selektion	84
3.2.6. Verifizierung und Charakterisierung der Genaustauschmutanten	86
3.2.6.1. Untersuchungen des HsIU2 Gens	86
3.2.6.2. Untersuchungen des HsIV Gens	88
3.2.6.3. Untersuchungen des HsIU1 Gens	89
3.2.7. Komplementationsanalyse der HsIV und HsIU Proteine	91
3.2.7.1. Klonierung der Komplementationsplasmide	91
3.2.7.2. Transformation und Expressionsnachweis der pMC02 Plasmide	94
3.2.7.3. Wachstumskurven der Komplementationsplasmide	96
4. Diskussion	98
<hr/>	
4.1. Charakterisierung des Virulenzfaktors P46 aus <i>L. major</i>	99
4.1.1. Sequenzanalysen des P46	99
4.1.2. <i>In vivo</i> Mauspassagen	100
4.1.3. <i>In vitro</i> Makrophageninfektion	101
4.1.4. Reverse Genetik	101
4.1.5. Lokalisationsstudien in Promastigoten und infizierten Makrophagen	102

4.1.6. Zusammenfassung	103
4.1.7. Ausblick	103
4.2. Charakterisierung von HsIV und HsIU aus <i>L. donovani</i>	104
4.2.1. Proteinnachweis und differenzielle Expression während der Stadienkonversion	104
4.2.2. Lokalisationsstudien in Promastigoten	105
4.2.3. Proteininteraktionsstudien	106
4.2.4. Funktionsanalyse durch Komplementation	107
4.2.5. Funktionelle Analyse durch Genaustausch-Mutagenese	108
4.2.6. Ausblick	109
5. Literaturverzeichnis	110
6. Anhang	123
6.1. Abkürzungsverzeichnis	123
6.2. Veröffentlichungen	126

Zusammenfassung

Die Leishmaniose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die durch protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* verursacht wird. Je nach infizierender Spezies werden verschiedene Krankheitsbilder unterschieden, die von selbstheilender, kutaner Leishmaniose bis hin zur lebensbedrohenden, viszeralen Leishmaniose reichen. Derzeit gibt es keine Impfstoffe gegen die Erreger und die Chemotherapie beruht häufig noch auf antiquierten und toxischen Antimon-haltigen Wirkstoffen. Eine erfolgreiche Therapie mit den wenigen vorhandenen Medikamenten wird immer mehr durch die zunehmende Resistenzentwicklung der Parasiten beeinträchtigt. Daher ist die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen erforderlich, um neue Anti-*Leishmania*-Wirkstoffe zu entwickeln.

Mit der *forward genetics* Methode des *functional cloning* lassen sich bislang unbekannte Gene aufgrund ihrer Funktion identifizieren. Bei diesem ergebnisoffenen Ansatz muss nichts über die Eigenschaften der Gene bekannt sein. Somit können auch solche Gene in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden, die nicht zu den "üblichen Verdächtigen" gehören. Im Gegensatz dazu steht der *reverse genetics* Ansatz der vergleichenden Genomanalyse. Hierbei werden Proteine aufgrund ihrer vermuteten Funktion und Analogie zu anderen Spezies ausgewählt. Eine anschließende Untersuchung der Kandidatengene muss dann Aufschluss über deren tatsächliche Funktion und Bedeutung bringen.

Beide Strategien zur Identifizierung putativer Zielstrukturen sollten in dieser Dissertation verfolgt werden. In einem vorangegangenen Promotionsprojekt wurde durch die Verwendung des avirulenten *L. major* Stammes, *L. major hsp100^{-/-}*, eine genomische DNA Bank nach Genen durchsucht, die die Virulenz des Stammes wieder herstellen (Reiling, 2005, Reiling et al., 2010). Tatsächlich kristallisierte sich in dieser Komplementationsanalyse ein Gen heraus, das für die Wiederherstellung der Virulenz verantwortlich zu sein schien. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das durch *functional cloning* vorläufig identifizierte P46 Gen als allgemeiner Virulenzfaktor bestätigt werden. Dabei konnte zum ersten mal ein *L. major* spezifischer Virulenzfaktor identifiziert werden, der nicht nur in der Lage ist, das Fehlen eines Gens zu kompensieren, sondern darüber hinaus auch die Virulenz des Wildtyps erhöht. In den *in vitro* Makrophageninfektionen zeigte sich eine verstärkte Parasitenlast nach Infektion mit P46-überexprimierenden Parasiten. Die zeitgleiche Lokalisation des Proteins im Zytoplasma der Makrophagen deutet auf eine schützende Funktion gegen Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort hin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass bereits eine geringe Veränderung der Genexpression in *L. major* den Ausgang einer Infektion unabhängig von der genetischen Prädisposition des Wirtes beeinflussen kann.

Durch vergleichende Genomanalyse waren im Genom von *Leishmania spp.* bereits 2002 homologe Gene zum bakteriellen HsIVU Komplex identifiziert worden. Da diese Gene nicht im menschlichen Genom vorkommen, könnten sie vielversprechende Zielstrukturen in Leishmanien darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die als HsIV und HsIU annotierten Gene aus *L. donovani* zwar in Leishmanien existieren, allerdings nicht in einem gemeinsamen Komplex vorliegen, wie dies für andere Organismen postuliert wird (Kang et al., 2001, Rohrwild et al., 1996). Mit Hilfe einer Komplementationsanalyse in *E. coli* HsIVU-Deletionsmutanten konnte darüber hinaus eine funktionelle Homologie zu ihren bakteriellen Gegenstücken ausgeschlossen werden. Dennoch zeigten die Experimente zur Generierung von Nullmutanten, dass zwei der Gene, HsIV und HsIU1, essenziell für die Lebensfähigkeit von *L. donovani* sind, und somit vielversprechende Zielstrukturen für Anti-*Leishmania* Wirkstoffe darstellen.

Abstract

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are the causative agents of leishmaniasis. Disease manifestations range from self-healing cutaneous lesions caused by *L. major* or *L. mexicana*, to severe muco-cutaneous lesions caused by *L. braziliensis*, and to potentially fatal visceral infections caused by the *L. donovani* complex. At present, there are no vaccines against leishmaniasis and chemotherapy relies mainly on antiquated antimony compounds. Current treatments are toxic, expensive, and losing their effectiveness due to spreading resistance. Therefore the identification of novel drug targets is necessary to establish new anti-*Leishmania* substances.

Using forward genetics such as functional cloning enables the implication of genes in certain processes based on their function. The approach is unbiased and allows for the identification of previously unsuspected genes, thereby adding to the knowledge base. The opposite approach is reverse genetics and involves database mining. Proteins are chosen for their suspected function by analogy to their homologues in other species. The selected proteins have to be examined for their actual function.

Both strategies were used in this thesis. A previous PhD project focussed on the screening of a genomic DNA cosmid library for genes that can compensate the loss of Hsp100 in the avirulent *L. major hsp100^{-/-}* and restores virulence to this mutant. This complementation analysis pointed at a gene as being responsible for the restoration of virulence. Within this work, the tentatively identified P46 gene could be confirmed as a general virulence factor. This is the first *Leishmania* virulence factor that not only compensates the loss of a gene, but can also increase the virulence of the wild type. Additionally, *in vitro* macrophage infections using P46 overexpressing parasites also resulted in an increased parasite burden. Localization studies revealed P46 inside the macrophage cytoplasm, indicating a possible interaction with the host cell. This may be the mechanism of the protective role of P46 against effector mechanisms of the macrophages. The results show that even minor fluctuations of gene expression in *L. major* may alter the outcome of an infection, regardless of the host's genetic predisposition.

In 2002, homologues of the bacterial HsIVU complex were identified in the genome of *Leishmania spp.* by database mining. Since these genes do not exist in the human genome or any other mammalian genome, they represent promising drug targets. This study showed that HsIV and HsIU exist in *L. donovani* but do not form a common complex as postulated for other organisms. As complementation analysis in *E. coli* HsIVU knock-out mutants ruled out a functional homology to their bacterial counterparts. Moreover, gene replacement mutagenesis experiments revealed that the genes HsIV and HsIU1 are essential for the parasites' viability and are therefore promising drug targets.

1. Einleitung

1.1. Leishmaniasen

Leishmaniose wird durch im Säugetier obligat intrazellulär lebende, einzellige Parasiten der Gattung *Leishmania* (*L.*) hervorgerufen, die zur Ordnung der Kinetoplastida und zur Familie der Trypanosomatidae gehören (Lainson et al., 1987). Die einzelligen Flagellaten wurden erstmals 1903 von Sir William Leishman und Charles Donovan unabhängig voneinander isoliert und beschrieben (Fulton, and Joyner, 1949). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählt die Leishmaniose zu einer der bedeutendsten Tropenkrankheiten. Schätzungsweise 12 Millionen Menschen in 88 (vorwiegend Entwicklungs-) Ländern sind bereits infiziert. Etwa 350 Millionen Menschen leben mit dem Risiko einer Infektion. Jährlich kommen etwa 2 Millionen Neuinfektionen dazu (WHO, <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). Derzeit sind mehr als 30 *Leishmania*-Spezies bekannt, von denen 21 in der Lage sind, Menschen zu infizieren (Ashford, 2000). Auf Basis der verschiedenen Symptome werden beim Menschen drei Krankheitsbilder unterschieden.

Das Auftreten der **kutanen Leishmaniose**, die auch als Orientbeule bezeichnet wird, beschränkt sich vorwiegend auf den Nahen Osten und den Mittelmeerraum. Sie wird vor allem von den Gattungen *L. major*, *L. tropica* und *L. aetiopica* verursacht. In der neuen Welt wird die Krankheit von Erregern des *L. braziliensis*- und *L. mexicana*-Komplexes hervorgerufen. In Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirts können zwei verschiedene Krankheitsverläufe auftreten: Reagiert das Immunsystem des Wirts mit der Ausbildung einer zellvermittelten Immunantwort, bilden sich nach Infektion binnen weniger Wochen bis hin zu Monaten Papillen an der Eintrittsstelle des Erregers. Je nach Art des Erregers können sich diese zu unterschiedlich großen Ulzerationen weiterentwickeln, die nach einer gewissen Zeit spontan abheilen. Diese so genannte lokale kutane Leishmaniose (LCL) gewährt Schutz gegen eine Reinfektion. Kommt es jedoch zu einer ungenügenden zellvermittelten Immunantwort, so bildet sich das Krankheitsbild einer diffusen Hautleishmaniose (DCL) aus, deren Verlauf um ein Vielfaches schwerer ist und die tödlich verlaufen kann (WHO).

Eine weitere Form der Leishmaniose beschränkt sich vor allem auf den mittel- und südamerikanischen Raum. Bei der so genannten **mukokutanen Leishmaniose** kommt es zunächst zu Hautläsionen, die sich anschließend durch eine Metastasierung des Erregers in den nasalen und oralen Schleimhäuten manifestieren. Diese Erkrankung wird vorwiegend von der Spezies *L. braziliensis* verursacht. Die Symptome können auch noch Jahre nach dem Abheilen des primären Hautgeschwürs auftreten und zu schweren Gewebeerstörungen führen.

Die **viszerale Leishmaniose** (Kala Azar, Dum-Dum-Fieber) ist die schwerwiegendste Form und wird durch Erreger des *L. donovani*-Komplexes (Alte Welt) und *L. infantum* (= *L. chagasi*) (Neue Welt) hervorgerufen. Die Erkrankung tritt in Ländern Südeuropas, im vorderen Orient, in Nordafrika, auf dem indischen Subkontinent und in Südamerika auf. Dabei kommt es zum Befall von inneren Organen, insbesondere Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Leber, was zu Fieber, Anämien und in schweren Fällen auch zu Ödemen und Aszites (Bauchwassersucht) führen kann (Awasthi et al., 2004). Unbehandelt liegt die Sterblichkeitsrate bei über 90% (Pagliano et al., 2007). Ein aktuelles Problem stellt die vermehrt auftretende Koinfektion mit Leishmanien und HIV dar. Die im Mittelmeerraum durch *L. infantum* ausgelöste latente, viszerale Leishmaniose entwickelt sich in AIDS-Patienten aufgrund deren Immunsuppression zu einer manifesten viszeralen Leishmaniose (Gradoni et al., 1996). Neben der Pneumozystikose, der Toxoplasmose und der Kryptosporidiose ist die viszerale Leishmaniose die vierthäufigste opportunistische parasitäre Erkrankung bei HIV-positiven Menschen in Spanien (Paredes et al., 2003).

1.2. Aufbau und Lebenszyklus der Leishmanien

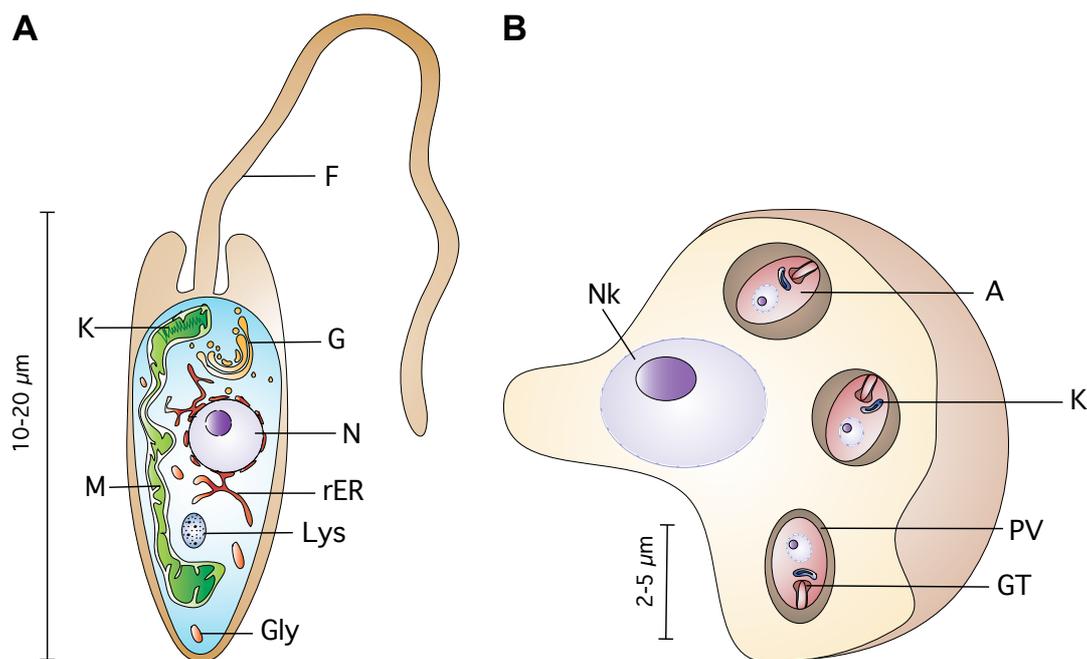


Abb. 1: Schematische Darstellung der zwei Lebensformen der *Leishmania*

Dargestellt sind die wichtigsten Strukturen und Organelle von (A) Promastigoten und (B) Amastigoten in infizierten Makrophagen. A = Amastigote; F = Flagellum; G = Golgi-Apparat; GT = Geißeltasche; K = Kinetoplast; Lys = Lysosomen; M = Mitochondrium; N = Nukleus; Nk = Nukleus des Makrophagen; PV = parasitophore Vakuole; rER = rauhes Endoplasmatisches Retikulum. Die Balken geben die jeweiligen Größen der beiden Lebensstadien der Leishmanien an. (© M. Chrobak)

Leishmanien existieren in zwei verschiedenen Stadien (Abb. 1). In Sandmücken leben die Parasiten als 10-20 μm lang gezogene Promastigote, die sich durch ein Flagellum

auszeichnen. In Säugetierwirtszellen nehmen sie eine runde bis ovale Form mit einem Durchmesser von etwa 2–5 μm an, die als Amastigote bezeichnet wird. Das Flagellum liegt in diesem Stadium tief in der Geißeltasche und wird nur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Das charakteristische Merkmal der Kinetoplastida ist ihr so genannter Kinetoplast, der nahe des Geißelbasalkörpers lokalisiert ist. Hierbei handelt es sich um einen Abschnitt des schlauchförmigen Mitochondriums, in dem ca. 15% der zellulären DNA in Form von 25-50 *Maxicircles* und ca. 10.000 *Minicircles* vorliegt (Chang et al., 1985). Leishmanien besitzen zudem einen typischen eukaryotischen Nukleus, ein Endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi-Apparat (in der Nähe der Geißeltasche), Lysosomen und Glykosomen.

Leishmanien zeichnen sich durch einen biphasischen Lebenszyklus aus (Abb. 2), in dessen Verlauf sie einen Wirtswechsel zwischen Insekten und Wirbeltieren durchleben. Die metazyklischen, promastigoten Parasiten werden bei einem Biss durch infizierte, weibliche Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* (Europa, Afrika und Asien) oder *Lutzomyia* (Zentral- und Südamerika) auf verschiedene Säugetierspezies, einschließlich des Menschen, übertragen (Killick-Kendrick, 1990). Die Promastigoten werden zunächst von phagozytierenden Gewebezellen, den neutrophilen Granulozyten, aufgenommen, bevor sie unerkannt in die Makrophagen gelangen (Laskay et al., 2003). Innerhalb von zwei bis fünf Tagen transformieren die Parasiten im Phagolysosom der Makrophagen, der so genannten parasitophoren Vakuole (PV), zur amastigoten Form (Von Stebut, 2007). Je nach *Leishmania*-Art unterscheiden sich die Größe und die Form der Vakuolen. Während es bei *L. mexicana* und *L. amazonensis* zur Bildung großer PVs kommt, in denen mehrere dicht an die Vakuolenmembran gedrängte Amastigoten existieren, werden bei Infektion mit *L. major* und *L. donovani* PVs gebildet, die jeweils nur einen Parasiten enthalten (Castro et al., 2006, de Souza, 2005). Die Vermehrung der Amastigoten erfolgt mittels longitudinaler Teilung, was letztendlich zur Zerstörung des Makrophagen führt. Dadurch werden die Parasiten in die Blutbahn freigesetzt und können weitere Immunzellen infizieren. Da infizierte Zellen auch im Blut vorkommen (Awasthi et al., 2004), können bei erneuter Blutmahlzeit mit amastigoten Leishmanien infizierte Makrophagen aufgenommen werden. Die Speichelkomponenten der Mücke hemmen die Aktivierung von Makrophagen und somit auch das Abtöten der intrazellulären Parasiten (Hall, and Titus, 1995). Die Amastigoten gelangen in den Hinterdarm (*Phlebotomus*) bzw. in den Mitteldarm (*Lutzomyia*) der Mücke (Killick-Kendrick, 1990), wo sie sich innerhalb eines Tages zu prozyklischen Promastigoten umwandeln. Diese begeißelten Parasiten leben in den ersten Tagen extrazellulär im Darm in der so genannten peritrophen Matrix, die von Darmepithelzellen abgesondert wird und die Parasiten vor proteolytischen Enzymaktivitäten schützt (Pimenta et al., 1997). Um ein Ausscheiden der Parasiten aus dem Darm aufgrund des Auflösens der Matrix zu vermeiden, heften sich die prozyklischen Promastigoten mit Hilfe ihres Hauptoberflächenmoleküls Lipophosphoglycan (LPG) zwischen den Microvilli des

Mitteldarmepithels fest. Hier findet die Replikation durch Zweiteilung statt (Pimenta et al., 1992). Im Verlauf von fünf bis acht Tagen differenzieren die nicht-infektiösen prozyklischen Stadien zu hochgradig infektiösen metazyklischen Promastigoten, wodurch die Fähigkeit zum Anheften an das Darmepithel verloren geht (Sacks et al., 1994). Anschließend wandern die Parasiten aktiv in die Speicheldrüsen der Sandmücke, von wo aus sie bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen neuen Säugetierwirt übertragen werden (Sacks, and Noben-Trauth, 2002).

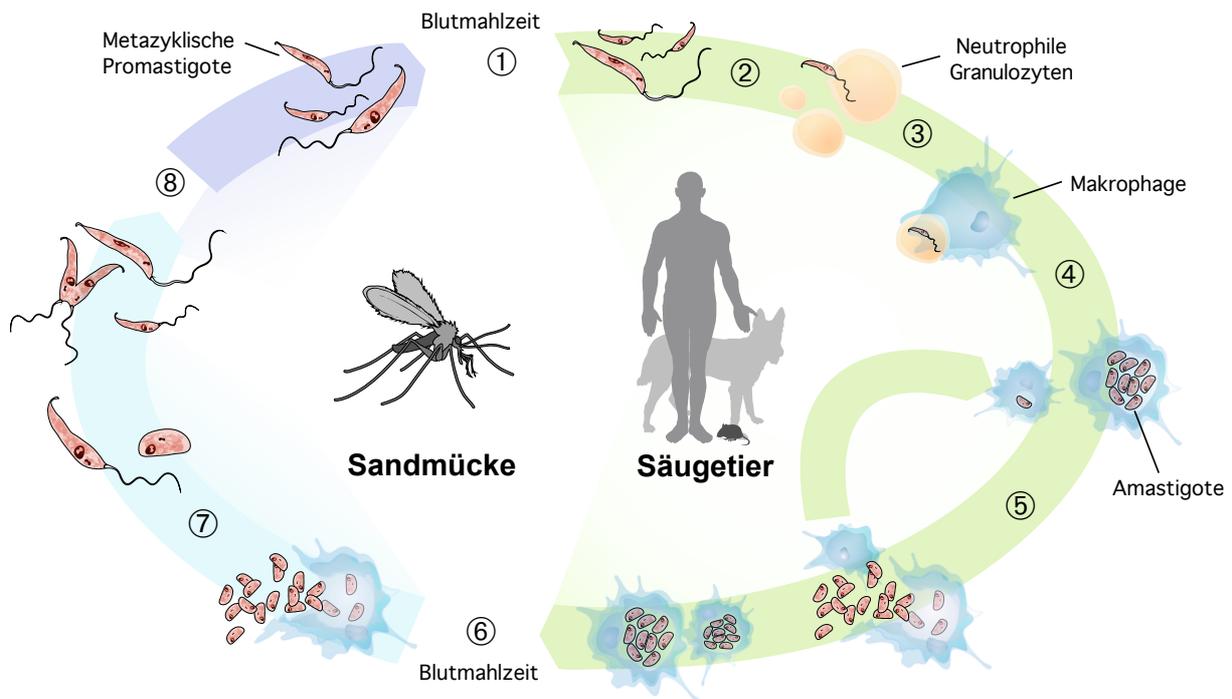


Abb. 2: Entwicklungszyklus der Leishmanien

1 Leishmanien werden während einer Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke übertragen. 2 Metazyklische Promastigote werden in die Haut injiziert, durch Serumbestandteile opsoniert und von neutrophilen Granulozyten aufgenommen. 3 Nach Phagozytose der neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen gelangen die Parasiten in das Phagolysosom. 4 Hier durchlaufen sie eine Entwicklung von der Promastigoten zur Amastigoten. 5 Durch stetige Teilungen der Amastigoten platzen die Makrophagen, wodurch die Parasiten in die Blutbahn geschwemmt werden und weitere Zellen infizieren können. 6 Bei einer erneuten Blutmahlzeit nimmt die Sandmücke amastigote Leishmanien auf. 7 Im Magen der Sandmücke wandeln sich die Parasiten in promastigote Formen um. 8 Nach einer Vermehrung durch Längsteilung wandern die Parasiten aktiv in den Rüssel der Mücke, wo der Lebenszyklus endet. (modifiziert nach: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)

1.3. Invasionsstrategien der Parasiten

Während des Mückenstichs gelangen etwa 10 bis 1000 (Belkaid et al., 2000) Leishmanien in die Hautschichten unter der Epidermis, wo sie zunächst von neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden. Innerhalb der neutrophilen Granulozyten können die Promastigoten zwar überleben, aber keine Teilung durchlaufen (Laufs et al., 2002). Die infizierten

Granulozyten werden apoptotisch und locken durch Sekretion chemotaktischer Faktoren Makrophagen an. Die Aufnahme der infizierten apoptotischen Zellen durch die Makrophagen führt zur Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins *tumor growth factor- β* (TGF- β). Diese Phase der Infektion wird als „stille Invasion“ bezeichnet, da Leishmanien die Granulozyten als „trojanische Pferde“ nutzen, um unerkannt in ihre finalen Wirtszellen einzudringen (van Zandbergen et al., 2004). Zusätzlich haben Leishmanien Strategien entwickelt, um die Immunantwort des Wirts zu unterwandern und sich so vor den Zerstörungsmechanismen der Immunabwehr zu schützen.

Metazyklische Promastigote können auch direkt Makrophagen infizieren. Es konnte gezeigt werden, dass metazyklische Promastigote aufgrund einer veränderten Struktur ihres Oberflächenmoleküls Lipophosphoglycan (LPG) resistent gegenüber einer Komplementsystem-vermittelten Lyse sind (Sacks et al., 1995). Darüber hinaus sezernieren Leishmanien Proteinkinasen, die verschiedene Komplementfaktoren phosphorylieren und so das klassische und alternative Komplementsystem blockieren können (Hermoso et al., 1991, Power et al., 1997). Leishmanien können das Komplementsystem aber auch für ihre eigenen Zwecke zu nutzen. Der Komplementfaktor C3b bindet an LPG-Moleküle und an das Glycoprotein gp63, eine Metallopeptidase auf der Zelloberfläche der Promastigoten. Dieser Vorgang fördert die Opsonisierung der Parasiten. Die Peptidase gp63 wird verstärkt von metazyklischen Promastigoten exprimiert und hydrolysiert eine große Anzahl von Substraten (Brittingham et al., 1995, Reiner, and Locksley, 1995). Unter anderem spaltet sie den Komplementfaktor C3b in die inaktive Form C3bi. Somit kann keine Bindung der nachfolgenden Komponenten des Komplementsystems an C3b erfolgen, wodurch die Lyse der Parasiten verhindert wird (Brittingham et al., 1995, Joshi et al., 1998). Die opsonierten Leishmanien binden über C3b und C3bi an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen und werden phagozytiert.

Auch nach dem Invasionsprozess übernehmen die LPGs auf der Oberfläche der Parasiten eine wichtige Funktion. Promastigote sind nicht in der Lage im Milieu des Lysosoms zu überleben. Mit Hilfe ihrer LPGs können sie allerdings eine Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom zum Phagolysosom verzögern, so dass die Parasiten mehr Zeit für ihre Umwandlung in die Amastigote zur Verfügung haben (Desjardins, and Descoteaux, 1997). Darüber hinaus besitzen amastigote Leishmanien Mechanismen, um sich vor lysosomalen Enzymen zu schützen. Die bereits erwähnte Metallopeptidase gp63 sichert das intraphagolysosomale Überleben des Parasiten durch den Abbau lysosomaler Enzyme (Chaudhuri, and Chang, 1988, Ilg et al., 1993). Allerdings sind die Amastigoten weiterhin den mikrobiziden Abwehrmechanismen des Makrophagen ausgesetzt. Hierzu zählt der *oxidative burst*, ein Prozess bei dem reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxid-Anionen (O_2^-) freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird durch das Enzym NADPH Oxidase katalysiert, welches erst nach Aktivierung durch die Proteinkinase

C (PKC) aktiv werden kann. Das LPG der Amastigoten kann die Aktivität der PKC auf den Makrophagen hemmen und somit zum Überleben der Parasiten beitragen (Descoteaux et al., 1992). Als Hauptoberflächenantigen besitzen die amastigoten Parasiten Glykosyl-inositolphospholipid (GIPL), welches ebenso einen inhibierenden Effekt auf die PKC ausübt. Zusätzlich kann es die Expression der iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) hemmen, die für die Bildung des toxischen Stickoxids (NO) verantwortlich ist (McNeely et al., 1989, Proudfoot et al., 1995). Für den Abbau der bereits aktivierten Sauerstoffmetabolite nutzen die Amastigoten neben LPG die Enzyme Gluthationperoxidase, Superoxiddismutase und Katalase (Chan et al., 1989, Murray, 1982).

1.4. Immunantwort im Säugetierwirt

Das Immunsystem des Körpers ist ein höchst komplexes, regulatorisches Netzwerk, das aus unterschiedlichen Geweben und Zelltypen besteht, die über Zytokine oder über direkten Zellkontakt miteinander kooperieren. Dabei wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen, adaptiven Immunsystem unterschieden, die sich durch ihre unterschiedliche Art der Immunantwort ideal ergänzen. Erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Körpers ermöglicht (Borghans et al., 1999).

Das angeborene, unspezifische Immunsystem reagiert äußerst schnell auf eine Infektion. Es beruht auf unveränderlichen Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen. Die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende Erreger bilden physikalische Barrieren, wie Haut und Schleimhäute (Banchereau et al., 2000). Darüber hinaus helfen Immunzellen wie zytotoxische natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Phagozyten bei der Bekämpfung der Erreger. Zu den phagozytierenden Zellen gehören unter anderem Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Deren Aufgabe ist es, eindringende Erreger in sich aufzunehmen und durch die Anreicherung von toxischen Produkten oder das Einleiten der Apoptose eine Abtötung der Pathogene herbeizuführen (Davey, 1989). Zudem setzen sie zeitgleich eine Fülle von Botenstoffen frei, die eine Aktivierung der umliegenden Zellen und den Einstrom weiterer Immunzellen auslösen (Janeway et al., 2002). Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr nimmt das Komplementsystem ein. Hierbei handelt es sich um ein System von Plasmaproteinen, das an den Oberflächen der eindringenden Erreger eine Enzymkaskade auslöst, was letztendlich zum Anlocken von Phagozyten an den Infektionsherd führt (Janeway et al., 2002).

Das angeborene Immunsystem reicht oftmals nicht aus, um infektiöse Krankheitserreger vollständig zu beseitigen. Viele Pathogene, wie die Leishmanien, können den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort entgehen. Für deren Bekämpfung ist die Aktivierung der spezifischen, adaptiven Immunantwort notwendig. Zu den wichtigsten Immunzellen der erworbenen Immunität zählen dendritische Zellen (DCs) und T-Zellen.

Für eine effektive Bekämpfung der Erreger müssen die T-Zellen zunächst durch Antigenkontakt aktiviert werden. Hierfür transportieren die DCs Leishmanien Antigen (*L*-Ag) vom Ort der Infektion zum drainierenden (ableitenden) Lymphknoten und präsentieren es dort den Antigen spezifischen T-Helferzellen (T_H -Zellen). Diese entwickeln sich zu aktivierten T_H1 - oder T_H2 -Zellen und kehren zum Ort der Infektion zurück. Welcher Weg eingeschlagen wird, hängt vom vorherrschenden Zytokinmilieu ab. Interleukin-12 (IL-12), welches vor allem von Makrophagen und DCs ausgeschüttet wird (Heufler et al., 1996), sowie Interferon- γ (IFN γ), welches durch aktivierte NK-Zellen sezerniert wird, begünstigen die Entwicklung einer naiven T-Helferzelle in Richtung T_H1 . IL-4, IL-10 oder TGF β fördern hingegen eine Differenzierung der T-Helferzelle zu einer T_H2 -Zelle (Seder, and Paul, 1994).

Die T_H1 - und T_H2 -Zellen synthetisieren verschiedene Zytokine, die jeweils unterschiedliche Abwehrmechanismen auslösen (Abbas et al., 1996). T_H1 -Zellen sezernieren den Tumornekrose-Faktor (TNF), sowie die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ , die für eine effektive Makrophagenaktivierung entscheidend sind. Erst im aktivierten Zustand sind diese in der Lage, neben toxischen Produkten zur intrazellulären Erregerabwehr, die Synthese des Stickstoffmonoxid-Radikals (NO \bullet) zu induzieren. Dessen leishmanizide Wirkung konnte bereits früher gezeigt werden (Cunha et al., 1993). Ein weiterer Abwehrmechanismus der Makrophagen ist die Verringerung des intraphagosomalen pH-Wertes, was zum einen toxisch auf die Parasiten wirken kann, zum anderen die Effektivität anderer erregerabtötender Stoffe erhöht. Diese Mechanismen führen letztendlich zum Abtöten des intrazellulären Erregers (Evans et al., 1996, Stenger et al., 1994). Die Hauptaufgabe der T_H2 -Zellen ist die Aktivierung Antikörper produzierender B-Zellen, indem sie die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 freisetzen und so eine humorale Immunantwort einleiten (Mosmann et al., 1991). Dabei spielt das IL-4 die wichtigste Rolle, da es die Proliferation der eigenen T-Zell-Subpopulation fördert.

1.5. *Leishmania* Infektion im Tiermodell

Die Infektion verschiedener Mausstämme hat in den letzten Jahren viel zum Verständnis der Mechanismen beigetragen, die mit Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber den Parasiten verbunden sind. Derzeit gibt es nur für die Spezies *L. major* und *L. mexicana* ein geeignetes Modellsystem, durch das sich der menschliche Krankheitsverlauf für die kutane Leishmaniase näherungsweise abbilden lässt. Für *L. donovani*, den Erreger der viszeralen Leishmaniase, gibt es kein Tiermodell. Es existiert jedoch ein *in vitro* Kultivierungssystem, mit dem es möglich ist promastigote *L. donovani* in Amastigote umzuwandeln. In der vorliegenden Arbeit wurden die Spezies *L. major* und *L. donovani* verwendet. Für die Infektionsexperimente kamen die Inzucht-Mausstämme BALB/c und C57BL/6 zum Einsatz.

Der genetische Hintergrund dieser Mäuse spielt eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Leishmaniose. Nach Infektion von BALB/c Mäusen kommt es zu einem chronischen Verlauf der Infektion, was als Modell einer nicht heilenden Leishmaniose angesehen werden kann. Die Parasiten verteilen sich dabei vorwiegend in lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Anschließend kommt es zur Ausbildung einer T_H2-Immunantwort, die durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 gekennzeichnet ist (Sacks, and Noben-Trauth, 2002). Bereits während der frühen Infektionsphase können im drainierenden Lymphknoten hohe IL-4 mRNA Level nachgewiesen werden (Launois et al., 1995). Durch die Freisetzung der Zytokine werden spezifische Antikörper durch B-Zellen produziert, eine Aktivierung von Makrophagen wird jedoch verhindert. Die sezernierten Antikörper sind unwirksam gegen die intrazellulär lebenden Amastigoten. So können sich die Parasiten innerhalb der Makrophagen ungebremst vermehren. Die Folge ist eine unkontrollierte, systemische Erkrankung und letztlich ein Versterben der Mäuse (Sacks, and Noben-Trauth, 2002). In der gängigen Praxis werden jedoch die Infektionen bereits vor der Ulzerierung der Primärläsionen terminiert.

Im Gegensatz dazu können C57BL/6 Mäuse eine Infektion mit *L. major* kontrollieren, was dem Modell der kutanen Leishmaniose entspricht. Verantwortlich für die Resistenz gegenüber den Parasiten ist die Ausbildung einer starken T_H1-Immunantwort, die zur Ausheilung der Läsionen und zum Überleben der Mäuse beiträgt. Diese ist mit der Fähigkeit verbunden, die IL-4 Produktion kurz nach Infektion auf ein Minimum zu reduzieren, während es gleichzeitig zu einem Anstieg des IFN γ -Niveaus in den drainierenden Lymphknoten kommt (Reiner et al., 1994).

Die Ursache für die verschiedenen Immunreaktionen der Inzucht-Stämme ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass bei den BALB/c Mäusen ein genetischer Defekt für die verstärkte T_H2-Immunreaktion verantwortlich ist (Gorham et al., 1996, Schulte et al., 1997). Hervorzuheben ist, dass die Verwendung verschiedener *L. major* Stämme zu Unterschieden im Infektionsverlauf führen kann. So verursacht z.B. der *L. major* Stamm MHOM/IL/81/FEBNI in C57BL/6 Mäusen eine weitaus stärkere Pathologie als die *L. major* Stämme MHOM/SU/73/5ASKH und MHOM/IL/80/FRIEDLIN (Reiling et al., 2010, Ritter et al., 2004).

1.6. Behandlung der Leishmaniasen

Trotz einiger Vorstudien mit attenuierten *Leishmania* Parasiten oder mit DNA, gibt es keine geeigneten Impfstoffe gegen kutane oder viszerale Leishmaniose (Kedzierski et al., 2006, Vanloubbeeck, and Jones, 2004). Eine medikamentöse Prophylaxe ist ebenso wenig möglich. Die WHO ordnet die Leishmaniasen den so genannten „vernachlässigten Krankheiten“ zu, für die bisher nicht ausreichend in die Entwicklung von Medikamenten investiert wurde. Dies spiegelt sich unter anderem in der geringen Anzahl verfügbarer

Medikamente wieder, die zudem häufig primär für andere Krankheiten entwickelt wurden oder schon seit Jahrzehnten verwendet werden.

Zur Behandlung der Leishmaniasen werden seit den 1940er Jahren fünfwertige Antimone, wie Pentostam (Natriumstibogluconat) oder Glucantim (N-Methylglucaminantimonat) eingesetzt. Diese Medikamente blockieren bestimmte Enzyme des parasitären Stoffwechsels (Berman et al., 1987, Wyllie et al., 2004). Die Behandlung mit den hochgiftigen Antimonpräparaten ist mit starken Nebenwirkungen verbunden und wird durch die zunehmende Resistenzentwicklung der Parasiten eingeschränkt. Im Falle einer Therapieresistenz werden gewöhnlich Pentamidinpräparate verabreicht. Aber auch hier kann es zum Auftreten schwerer Nebenwirkungen kommen. Zudem steigt die Zahl der Patienten an, die nicht mehr auf eine Pentamidintherapie reagieren (Sundar et al., 2000).

Ein weiteres Mittel zur Behandlung der Leishmaniose ist das Polyantibiotikum Amphotericin B, das bereits seit den 1960er Jahren verwendet wird, allerdings stark toxisch wirkt. Nach Veränderung der Lipidformulierung ist das Therapeutikum mittlerweile besser verträglich, aber trotz deutlicher Preissenkung in 2008 für die ärmere Bevölkerung der Endemieregionen nur schwer finanzierbar. Seit 2002 ist der Wirkstoff Miltefosin als Medikament zur Behandlung der Leishmaniose zugelassen (Sundar et al., 2002). Ein großer Vorteil dieses Wirkstoffs, der eigentlich im Rahmen der Krebsforschung entwickelt wurde, ist seine orale Darreichungsform. Die bislang übliche, häufig sehr teure stationäre Infusionstherapie entfällt. Nachteilig sind teratogene Nebenwirkungen, die die Verabreichung an Frauen im gebärfähigen Alter kontraindizieren. Das Aminoglycosidantibiotikum Paromomycin ist erst seit 2006 als Medikament zur Therapie von viszeraler Leishmaniose zugelassen, und weist neben der Inhibierung der Proteinsynthese auch anti-mikrobielle Aktivität auf (Sundar, 2001).

Dieser Überblick über die verfügbaren Therapeutika zeigt, dass derzeit keine effiziente und nebenwirkungsfreie Therapie der Leishmaniose existiert. Viele Medikamente müssen zudem stationär verabreicht werden, was zu weiteren hohen Kosten für die Patienten führt. Die moderneren und oftmals besseren Therapeutika sind teuer und häufig nicht für jede Form der Erkrankung anwendbar. Zudem stellt die zunehmende Resistenzentwicklung der Leishmanien gegen die bisherigen Standardtherapeutika ein ernstzunehmendes Problem dar. Es besteht daher ein dringender Bedarf an neuen Therapieansätzen und Therapeutika.

1.7. Strategien zur Ermittlung neuer Zielstrukturen

Um neue Zielstrukturen für Medikamente aufzudecken, gibt es in der Forschung verschiedene Ansatzmöglichkeiten. Ziel dabei ist es, Proteine von *Leishmania spp.* zu

identifizieren, die nicht im Menschen vorkommen oder sich stark von menschlichen Proteinen unterscheiden.

Eine bereits gut etablierte Methode ist die Identifizierung unbekannter Gene durch das so genannte *functional cloning*. Ziel ist es, Gene zu identifizieren, deren (Über-) Expression einen gewünschten Phänotyp erzeugt. Der bevorzugte Ansatz umfasst zunächst die Herstellung einer Cosmidbank, die genomische DNA aus *Leishmania* enthält. Durch anschließende Transfektion dieser Cosmidbank in einen definierten *Leishmania* Klon, dem dieses Merkmal fehlt, kann eine stringente Selektion der Transfektanten auf den gewünschten Phänotyp hin erfolgen. Anschließend können die mit dem Phänotyp assoziierten Cosmide reisoliert und charakterisiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht in der leichten Isolierung und Identifizierung von Genen, die für das gesuchte Merkmal verantwortlich sind (Clos, and Choudhury, 2006) In der Dissertation von Linda Reiling konnte mit diesem Ansatz bereits ein *Leishmania*-Gen vorläufig identifiziert werden, das den avirulenten Phänotyp einer *hsp100^{-/-}* Mutante kompensiert bzw. komplementiert (Reiling, 2005).

Eine andere Ansatzmöglichkeit zur Identifizierung von neuen Zielstrukturen bietet eine vergleichende Genomanalyse. Dabei wird in Datenbanken nach solchen Genen gesucht, deren Produkte bereits in anderen Organismen ausführlich studiert wurden. Für diese Methode werden Proteine aufgrund ihrer vermuteten Funktion und Analogie zu anderen Spezies ausgewählt. Eine nachfolgende Untersuchung der Kandidatengene durch reverse Genetik muss dann Aufschluss über deren reale Funktion erbringen. Couvreur et al. konnten vor kurzem in *Leishmania spp.* homologe Gene zum bakteriellen *heat shock locus* VU (HsIVU) Komplex identifizieren (Couvreur et al., 2002). Diese Proteine bilden in Bakterien einen gut untersuchten Peptidasekomplex (Rohrwild et al., 1996). Da diese Gene nicht im menschlichen Wirt oder anderen Säugetierspezies vorkommen, eignen sie sich besonders gut als mögliche Zielstrukturen für therapeutische Ansätze.

Sowohl der *forward genetics* Ansatz des *functional cloning*, als auch der *reverse genetics* Ansatz durch vergleichende Genomanalyse waren in der Vergangenheit erfolgreich. Daher wurde der Entschluss gefasst, in der vorliegenden Dissertation beide Herangehensweisen weiter zu verfolgen.

1.7.1. *functional cloning* in *Leishmania*

Diese Strategie wurde in *Leishmania* erstmals mit dem Ziel angewendet, Faktoren zu identifizieren, die während der Synthese des *L. donovani* LPG eine Rolle spielen (Descoteaux et al., 1995, Ryan et al., 1993). *Leishmania* Mutanten, die einen Defekt in der LPG Synthese aufwiesen, wurden mit einer *L. donovani* Wildtyp Cosmidbank transfiziert. Anschließend erfolgte eine Selektion der rekombinanten Population auf Parasiten, die wieder eine Synthese von LPG vorweisen konnten. Die Isolierung und Charakterisierung

der reisolierten Cosmide führte zur Identifizierung von zwei Genen (*LPG1*, *LPG2*), die in der LPG Biosynthese involviert sind.

Mit Hilfe dieser Methode ist es auch möglich, inter-Spezies Komplementationsanalysen durchzuführen. Dobson et al. identifizierten Gene, die an der Synthese der LPG Seitenketten beteiligt sind. Dafür nutzten sie genomische DNA von *L. major* und transfizierten diese in *L. donovani* Parasiten, die auf ihren LPG Molekülen keine Seitenketten aufweisen (Dobson et al., 2003). Solche Ansätze bieten großes Potential, um die molekulare Basis Spezies-spezifischer Merkmale zu verstehen und genauer zu untersuchen, wie z.B. in Zusammenhang mit Organtropismus (Hoyer et al., 2001) oder Virulenz (Zhang, and Matlashewski, 2004).

1.7.2. *functional cloning* zur Identifizierung von Virulenzfaktoren

Für die Suche nach bislang unbekanntem Virulenzfaktoren ist es sinnvoll, eine *Leishmania*-Mutante zu verwenden, deren Phänotyp eine abgeschwächte Virulenz aufweist. So kann bei der *in vivo* Selektion auf die Cosmide/Gene selektiert werden, die die Virulenz dieser Mutante wieder herstellen. Hierfür bot sich die *L. major hsp100* Nullmutante (*L. major hsp100^{-/-}*) an. Sie konnte bereits 1997 als avirulent in BALB/c Mäusen beschrieben werden und stellt für die Zielsetzung somit einen idealen Wirtstamm dar (Hübel et al., 1997). Ebenso zeigte auch eine *L. donovani hsp100^{-/-}* Mutante in *in vitro* Infektionsstudien eine eingeschränkte Infektiosität (Krobitsch, and Clos, 1999). Eine Studie zeigte, dass der Verlust der Virulenz in der *L. major hsp100^{-/-}* Mutante kompensierbar ist (Reiling et al., 2006).

Diese Mutante wurde als „Werkzeug“ eingesetzt, um Cosmide zu finden, die in der Lage sind, den avirulenten Phänotyp des *L. major hsp100^{-/-}* aufzuheben (Reiling, 2005). Um eine Selektion auf das bereits bekannte Hsp100 zu vermeiden, wurde eine Cosmid-Genbank von *L. major hsp100^{-/-}* in die avirulente Mutante transfiziert. Die rekombinante Population wurde *in vivo* in einer BALB/c Mausinfektion selektiert. Dabei konnte eine begrenzte Anzahl von Cosmiden aus den Mäusen reisoliert werden, die zu einer wiedererlangten Virulenz der *hsp100^{-/-}* Mutante führten. Die Virulenzsteigerung dieser Cosmide konnte auch *in vitro* durch Infektionsexperimente mit Makrophagen bestätigt werden. Die virulenzsteigernden Cosmide wurden erneut in die *hsp100^{-/-}* Mutante transfiziert und für eine weitere Infektion in BALB/c Mäusen eingesetzt, um auf die Cosmide zu selektieren, die den stärksten Effekt auf die Virulenz zeigten. In dieser Selektionsrunde wurde vorwiegend ein Cosmid reisoliert (pcosA13), welches 4 intakte ORF und einen unvollständigen ORF aufwies. Um den Abschnitt des Cosmids zu identifizieren, der für die Wiederherstellung der Virulenz verantwortlich war, sollten Cosmide gefunden oder hergestellt werden, deren Sequenzen teilweise mit dem Ausgangscosmid pcosA13 übereinstimmten. Hierfür wurde zum einen die Cosmid-

Genbank nach Cosmiden durchsucht, die eine leicht veränderte Sequenz zum *pcosA13* aufwiesen. Darüber hinaus wurden durch Restriktionsverdau gezielt verkürzte Versionen des *pcosA13* erzeugt (Vgl. Abb. 3). Die erhaltenen Cosmide wurden in *L. major hsp100^{-/-}* transfiziert und erneut *in vivo* selektiert. Nach Infektion in BALB/c Mäusen konnten nur zwei Cosmide (*pcosA13.1* und *pcosA13.3*) reisoliert werden. Diese besaßen als einzige Gemeinsamkeit den ORF4. Diese Sequenz kodiert für ein 46 kDa Protein, das im Folgenden als P46 bezeichnet wird. Somit schien dieses Protein für die Aufhebung des avirulenten Phänotyps der *L. major hsp100^{-/-}* Mutante verantwortlich zu sein (Reiling, 2005, Reiling et al., 2010).

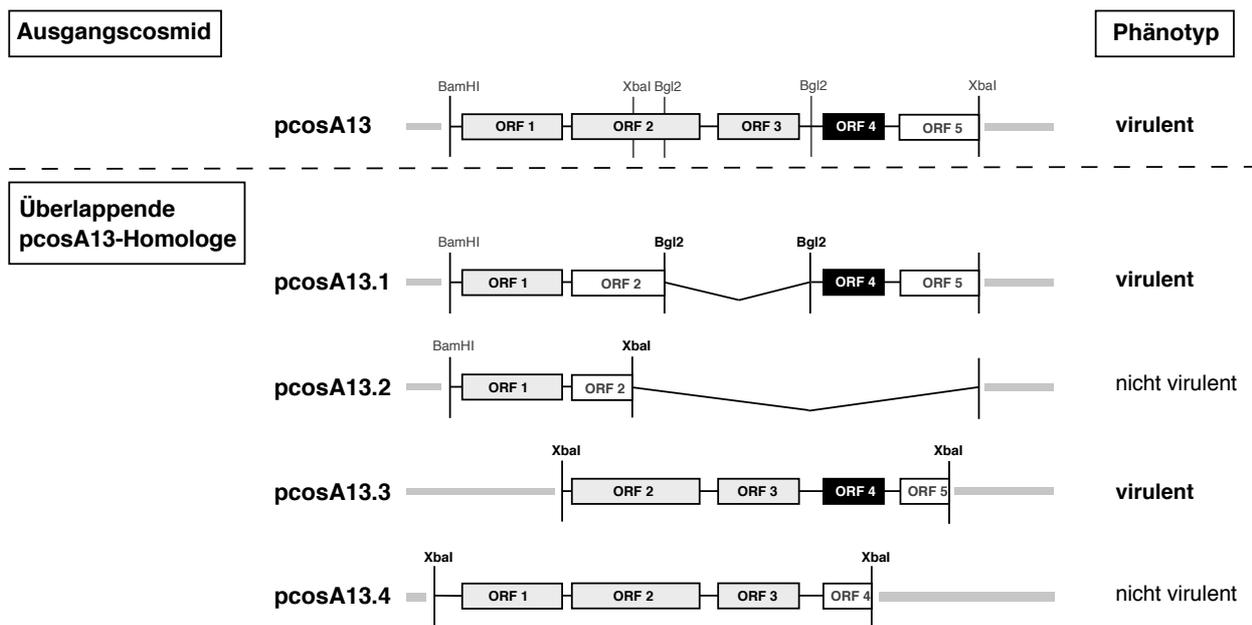


Abb. 3: Schematische Darstellung des Cosmids *pcosA13* und überlappender *pcosA13*-Homologe

Die überlappenden Cosmide *pcosA13.1* und *pcosA13.2* wurden durch Restriktionsverdau des *pcosA13* Ausgangscosmids mit den Enzymen *BglII* bzw. *XbaI* erhalten. Die Cosmide *pcosA13.3* und *pcosA13.4* wurden durch DNA-Hybridisierung von der ursprünglichen Cosmid-Genbank isoliert und mittels Sequenzierung charakterisiert. Neben dem Ausgangscosmid führt nur die Transfektion mit den Cosmiden *pcosA13.1* und *pcosA13.3*, denen der ORF4 gemein ist, zu einer wiederhergestellten Virulenz der *hsp100^{-/-}* Mutante in der BALB/c Maus. Graue Kästen stellen intakte ORF, offene Kästen unvollständige ORF dar; die grauen Linien repräsentieren die Vektor DNA. ORF4 (P46) ist durch schwarze Kästen hervorgehoben (modifiziert nach Reiling et al., 2010).

1.7.3. Datenbankrecherche

Bei der vergleichenden Genomanalyse muss bedacht werden, dass die aus Datenbanken abgeleiteten Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Eukaryoten oder Prokaryoten nicht zwangsläufig eine Analogie der Funktion bedeuten muss. Dies zeigt das Beispiel des ClpB (Hsp100) Proteins: In verschiedenen *Leishmania spp.* wurde das Homolog einer ClpB Chaperone identifiziert (Hübel et al., 1995), das wie homologe Proteine in *S. cerevisiae* (Hsp104) und *E. coli* (ClpB) durch einen Hitzeschock induzierbar war (Kitagawa

et al., 1991, Sanchez, and Lindquist, 1990). Während jedoch Hsp104 aus der Hefe für eine Erhöhung der Thermotoleranz in Hitze-gestressten Zellen verantwortlich ist, konnte in der ClpB Deletionsmutante von *L. donovani* keine verminderte Thermotoleranz beobachtet werden. Somit besitzt das *Leishmania* Hsp100 keine analoge Funktion zur HSP104 Chaperone von *S. cerevisiae* (Krobitsch, and Clos, 1999).

1.7.3.1. Das bakterielle HslVU

Der Abbau von falsch gefalteten Proteinen ist ein lebenswichtiger Prozess in Zellen. Jeder Organismus besitzt ein spezifisches System, mit dem Proteine in kleinere, verwertbare Peptide verdaut werden. In Eukaryoten ist dafür das so genannte Proteasom zuständig (Groll et al., 2005). Für diesen Prozess werden Ubiquitinketten an das abzubauen Protein angehängt und somit für den Abbau durch das Proteasom gekennzeichnet. Ein Großteil der Bakterien besitzt kein Proteasom, hat aber stattdessen alternative Peptidase-Komplexe, die ähnliche Aufgaben in der Zelle übernehmen. Dazu gehört unter anderem der HslVU Komplex (auch ClpQY genannt), der bei der Suche nach bakteriellen Hitzeschockgenen identifiziert und sequenziert wurde (Chuang, and Blattner, 1993). Er besteht aus zwei verschiedenen Proteinen (Gille et al., 2003), die innerhalb des bakteriellen Genoms von dem selben Operon kodiert werden (Rohrwild et al., 1996). Das HslU Protein (auch ClpY) fungiert dabei als AAA⁺ ATPase, das HslV Protein (auch ClpQ) als Peptidase. Während das HslU keine Verwandtschaft zum Proteasom besitzt, weist das HslV deutliche strukturelle Ähnlichkeit zur β -Untereinheit des Proteasoms auf (Chuang et al., 1993). Zusammen bilden die Proteine eine symmetrische Anordnung vier übereinander gestapelter Ringe, die jeweils aus sechs Untereinheiten bestehen. Die beiden äußeren Ringe werden durch sechs HslU Untereinheiten gebildet, während die inneren Ringe sechs HslV Untereinheiten beinhalten. Im Inneren der Ringe befinden sich jeweils die aktiven Zentren der Peptidase bzw. ATPase (Rohrwild et al., 1997). Obwohl der HslVU Komplex selbst stabil ist, gibt es Hinweise, dass der *in vivo* Komplex auf eine Substrat-induzierte Weise entsteht, indem eine Konformationsänderung im HslU-Substratkomplex die Bindung von HslV fördert (Azim et al., 2005). Erst nach Bindung des HslU an HslV ist letzteres in der Lage, beschädigte Proteine abzubauen.

In vielen Bakterien wird der HslVU Komplex als Antwort auf Zellstress verstärkt exprimiert (Ramachandran et al., 2002). Kanemori et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass es in HslVU-Überexpressions- bzw. Deletions-Mutanten zu einem Abfall bzw. Anstieg des Gleichgewichtslevels von HslVU Substraten kommt (Kanemori et al., 1997). Ebenso beeinflusst der HslVU Komplex die Hitzeschockantwort, indem er den Hitzeschockfaktor σ_{32} abbaut (Kanemori et al., 1999). In *E. coli* führt die Deletion des HslVU Komplexes zu keinem Phänotyp bei normalen Wachstumstemperaturen, hat aber bei höheren Temperaturen Auswirkungen auf Wachstum und Lebensfähigkeit der Bakterien (Kanemori et al., 1997). Andere intrazelluläre Peptidasen wie ClpXP und Lon scheinen aber in der

Lage zu sein, das Fehlen des HslVU Komplexes in gewissem Umfang zu kompensieren (Goldberg et al., 1994, Gottesman, 1996, Knipfer et al., 1999). Eine Deletion aller drei Peptidasen führt dementsprechend zu einem stark hitzesensitiven Phänotyp (Kanemori et al., 1997).

1.7.3.2. HslVU in *Leishmania spp.*

Lange Zeit wurde angenommen, dass das Vorkommen von Proteasom und HslVU Komplex sich gegenseitig ausschließen (De Mot et al., 1999). Es wurde postuliert, dass das Proteasom exklusiv in Eukaryoten vorkommt, wohingegen HslVU ausschließlich in Prokaryoten und einigen *Archaeobacteriae* existiert.

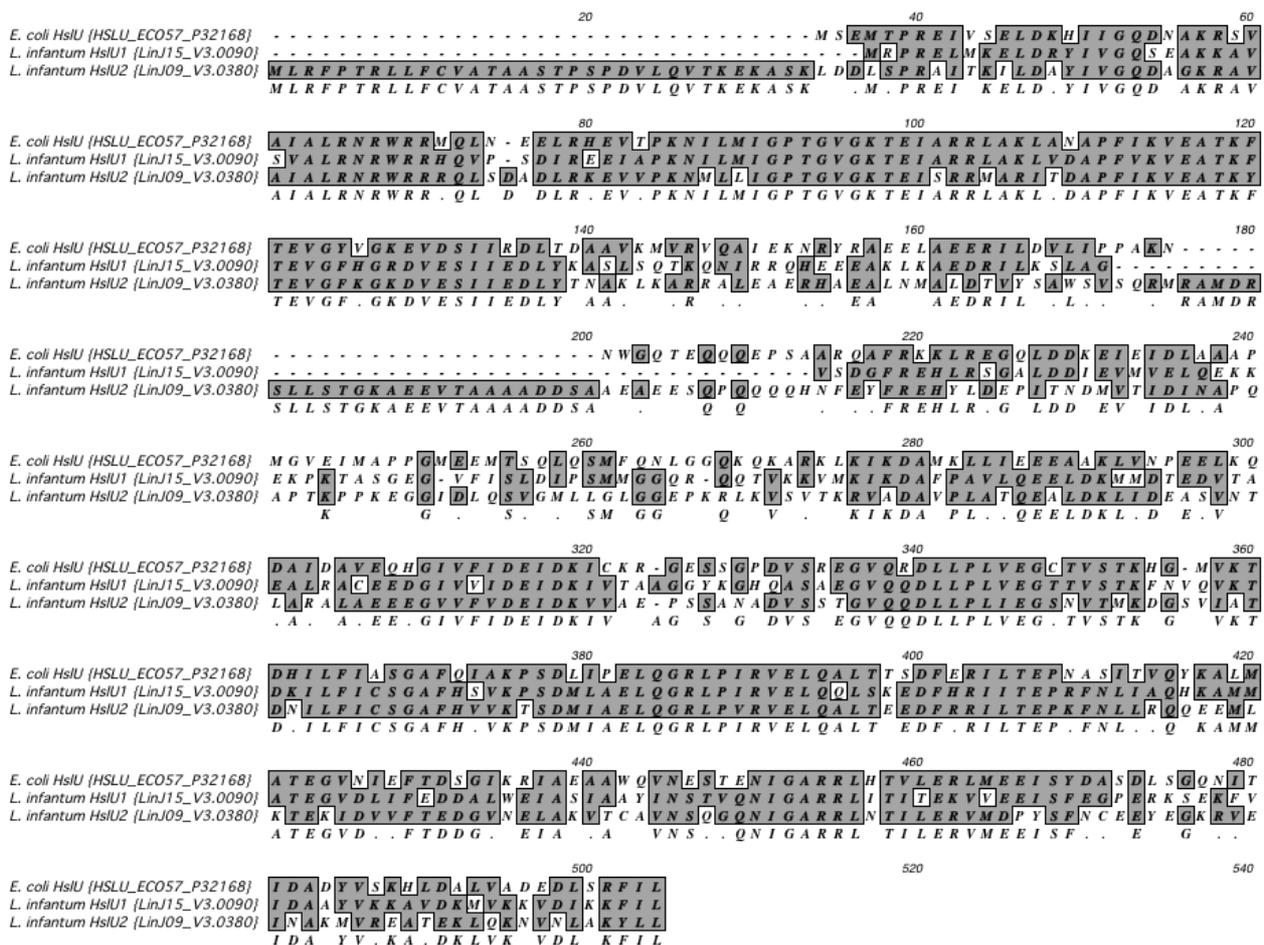


Abb. 4: Sequenzvergleich des *E. coli* HslU Proteins mit dem *L. infantum* HslU1 und HslU2

Das Sequenz-Alignment (ClustalW, MacVector) zeigt jeweils die gesamte Peptidsequenz der HslU Proteine, die in den *E. coli*- und *Leishmania*-Datenbanken angegeben sind. Konservierte oder ähnliche Aminosäuren sind durch graue Kästen hinterlegt (modifiziert nach Couvreur et al., 2002).

Im Jahr 2002 konnte erstmals gezeigt werden, dass Gene für die HslVU Proteine auch in den *Euglenozoa Leishmania* und *Trypanosoma*, wie auch in den *Apicomplexa Plasmodium* vorliegen (Couvreur et al., 2002, Gille et al., 2003). Allerdings gibt es keine

homologen HsIVU Gene in *Rhizaria* oder *Ophisthokonta*, zu denen unter anderem vielzellige Tiere und Pilze gehören (Ruiz-González, and Marín, 2006). Eine Besonderheit der *Trypanosomatidae* ist das Vorhandensein von zwei HsIU Genen, die im Weiteren als *HsIU1* und *HsIU2* bezeichnet werden. Im Gegensatz zum bakteriellen HsIVU, welches innerhalb des selben Operon kodiert wird, liegen die *Leishmania* HsIVU Gene auf unterschiedlichen Chromosomen. Das *L. infantum* HsIV liegt auf Chromosom 36 (LinJ36_V3.4180), das *HsIU1* auf Chromosom 15 (LinJ15_V3.0090) und das *HsIU2* auf Chromosom 9 (LinJ09_V3.0380). Dabei ist das HsIU1 Gen aus *L. infantum* mit insgesamt 64% Sequenzidentität enger mit dem *E. coli* HsIU verwandt, als das HsIU2 Gen (52% Sequenzidentität). Abbildung 4 zeigt das Peptidsequenz-Alignment des *E. coli* HsIU mit den homologen Sequenzen aus *L. infantum*. Interessanterweise zeigen die beiden HsIU Gene aus *L. infantum* untereinander nur eine geringe Sequenzübereinstimmung von 56%. Die Identität der Peptidsequenzen zwischen dem *L. infantum* HsIV und dem *E. coli* HsIV beträgt 55% (Vgl. Couvreur et al., 2002). Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass das *L. infantum* HsIV einen ca. 20 Aminosäure längeren N-Terminus aufweist, als das bakterielle HsIV.

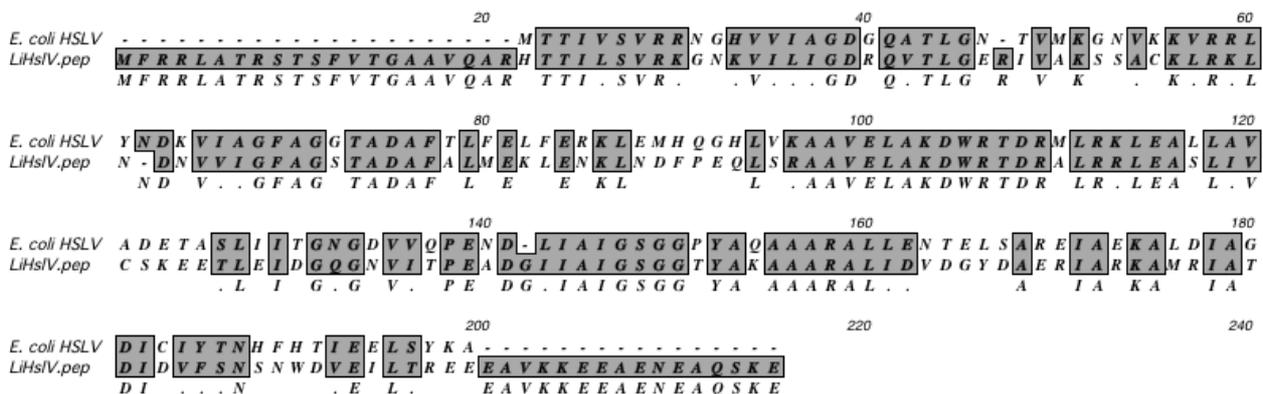


Abb. 5: Multiples Aminosäure-Alignment des *E. coli* HsIV mit dem *L. infantum* HsIV

Das Sequenz-Alignment (ClustalW, MacVector) zeigt jeweils die gesamte Peptidsequenz der HsIV Proteine, die in der *E. coli*- und *Leishmania*-Datenbank angegeben wurden. Konservierte oder ähnliche Aminosäuren sind durch graue Kästen hinterlegt (modifiziert nach Couvreur et al., 2002).

1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Die geringe Anzahl an verfügbaren Medikamenten, aber auch die verstärkt auftretende Resistenzentwicklung der Leishmanien gegen viele Therapeutika stellt ein großes Problem bei der Behandlung der Leishmaniasen dar. Zur Verbesserung der Therapieoptionen ist es dringend erforderlich, neue Angriffspunkte im Parasiten zu finden, die als Zielstrukturen für Medikamente dienen. Im Rahmen dieser Dissertation sollten zwei verschiedene Strategien zur Aufdeckung neuer Zielstrukturen aus *Leishmania spp.* verfolgt werden.

In früheren Untersuchungen von Linda Reiling wurde durch die Methode des *functional cloning* ein Gen vorläufig identifiziert, das bei Überexpression in einer *L. major hsp100^{-/-}* Mutante deren avirulenten Phänotyp aufhebt. Der Schwerpunkt des ersten Teils dieser Arbeit lag daher zunächst in der Verifizierung des Gens P46 als Komplementations- bzw. Kompensationsfaktor für die *hsp100^{-/-}* Mutante. Aus den Beobachtungen der Infektionsverläufe während der Komplementationsanalyse ergab sich die Fragestellung, welche Auswirkungen die Überexpression des Proteins in verschiedenen *Leishmania* Mutanten auf das Immunsystem von BALB/c und C57BL/6 Mäusen hat. Weiterhin sollten Lokalisationsstudien von Promastigoten und infizierten Makrophagen Aufschluss über den Wirkungsort des P46 Proteins geben.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem hypothetischen Peptidasekomplex HsIVU aus *L. donovani*, der in Bakterien bereits gut untersucht ist. Im Rahmen der Genomprojekte konnten homologe Sequenzen dieses bakteriellen Komplexes auch in *Leishmania spp.* identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit war von Interesse, welche Rolle und Funktion diese Gene in den Parasiten einnehmen. Nur wenn sich diese Gene als essenziell für das Überleben oder die Virulenz der Leishmanien herausstellen, sind sie vielversprechende Zielstrukturen für Therapeutika. Daher sollten die Gene und deren Produkte zunächst mittels reverser Genetik und proteinbiochemischer Methoden untersucht werden. Eine anschließende subzelluläre Lokalisationsstudie sollte Aufschluss über die zelluläre Verteilung der Proteine geben und im Fall von Kolo-kalisation Rückschlüsse auf mögliche funktionale Komplexbildungen ermöglichen. Mit Hilfe einer Komplementationsanalyse in *E. coli* Mutanten, denen diese Proteine fehlen, sollten erste Erkenntnisse über die Funktion der Proteine gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität "pro analysis" eingesetzt und von den Firmen Amersham (Freiburg), Roche (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (St. Louis, U.S.A.) bezogen.

2.1.2. Geräte und sonstige Materialien

In dieser Arbeit wurden die unten aufgeführten Geräte und Materialien eingesetzt. Nicht angegebene Geräte entsprechen dem Laborstandard.

Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Biomate 3 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.
Biometra Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Biometra UV Band Eluator	Biometra, Göttingen
Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
CASY Cellcounter und Analyzer	Schärfe System, Reutlingen
Cellophan Folien (24x24 cm)	Carl Roth, Karlsruhe
Centrifugal Filter Units	Millipore, Schwalbach
Elektroporationsküvetten (0,4 cm)	Bio-Rad, München
Epi-Fluoreszenzmikroskop	Leica, Solms
ELISA Platten (96-Well, F-Bottom, Microlon)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter (∅ 185 mm)	Schleicher & Schüll, Dassel
GenePulser & Pulse Controller	Bio-Rad, München
Härtungsbeschleuniger	London Resin Company, London, UK
HisBind Resin	Novagen, Madison, U.S.A.
Invertoskop IDO3	Zeiss, Oberkochen
J2-21 Zentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
J2-HS Zentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Lab-Tek 8-Well chamber slides	Nunc, Roskilde, Dänemark
Olympus FluoView 1000	Olympus, Hamburg
pH-Meter Micropocessor pH 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein

PVDF Membran Fluorotrans, 0,2 μ M	Pall, Europe, Portsmouth, U.K.
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad, München
Quick-seal tubes	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Reichert Ultracut E	Leica, Wetzlar
Rotorgene 3000	Corbett, Sydney, Australien
Spectra/Por regenerated cellulose	Spectrum Europe, Breda, Niederlande
Tecnai Spirit TEM	FEI, Eindhoven, Niederlande
Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
TrayCell	Hellma, Müllheim
Ultraschallbad: Sonovex Super	Bandelin, Berlin
Ultracentrifuge: L8-70M	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Zellschaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsiebe „Cell strainer“ (70 μ M)	BD Biosciences, Bedford, USA

2.1.3. Kits

Cell & Tissue DNA Purification Kit	Gentra Systems, Minneapolis, U.S.A.
GeneClean Kit	QBiogene, Heidelberg
NucleoBond XtraMaxi Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Puregene DNA Isolierungskit	Qiagen, Hilden
QuantiTec Reverse Transcription	Qiagen, Hilden
RealMasterMix Kit	Eppendorf, Hamburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4. Enzyme und Größenstandards

CIP (Alkalische Phosphatase)	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, Vilnius, Litauen
HMW Native Marker	Amersham, Freiburg
iProof High-Fidelity Master Mix	Bio-Rad, München
Klenow-Polymerase	Fermentas, Vilnius, Litauen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, Vilnius, Litauen
Proteinase K	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
RNase A	Sigma, St. Louis, U.S.A.
T4-Ligase	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
Taq DNA Polymerase, Recombinant	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5. Antikörper

anti-CD3	T. Jacobs, BNI, Hamburg
anti-P46-IgG (pk, aus Maus)	M. Chrobak, BNI, Hamburg
anti-HslV-IgG (pk, aus Maus)	M. Chrobak, BNI, Hamburg
anti-HslU1-IgG (pk, aus Maus)	M. Chrobak, BNI, Hamburg
anti-HslU2-IgG (pk, aus Maus)	M. Chrobak, BNI, Hamburg
anti-A2-Mab C9 (mk, aus Maus)	G. Matlashewski, Quebec, Kanada
anti-GFP (mk, aus Kaninchen)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Kaninchen Alexa 594 (pk, aus Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Maus (pk, aus Kaninchen)	Dako, Hamburg
anti-Maus-Alexa 594 (pk, aus Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe
Protein A-gold (10 nm)	University of Utrecht, Niederlande
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Streptavidin-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg

2.1.6. Vektoren und Oligonukleotide

pcosTL: Der Cosmid Vektor, der von J.M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein so genannter *cosmid shuttle vector* mit einer Größe von 8,5 kb. Er wurde für das Einbringen großer DNA Fragmente in *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania donovani* konstruiert (Kelly et al., 1994). Neben dem β -Laktamase-Gen, welches Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht, und zur Selektion in Bakterien dient, besitzt der Vektor das Neomycinphosphotransferase-Gen, welches Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 vermittelt.

pUC19: Für die Herstellung der Genaustauschkonstrukte wurde der pUC19, ein häufig benutzter *E. coli* Klonierungsvektor, verwendet. Dieses *high copy number* Plasmid hat eine Größe von 2.686 bp und besitzt das β -Laktamase-Gen (*bla*), welches Ampicillin-Resistenz verleiht.

pHM-PAC/pHM-Phleo: Beide Plasmide wurden erstmals 1993 beschrieben (Freedman, and Beverley, 1993) und von S. Beverley bzw. M. Wiese zur Verfügung gestellt. Sie enthalten das Gen Puromycinacetyltransferase, das Resistenz gegenüber dem Glykopeptid Antibiotikum PuromycinAC verleiht, sowie das Gen Phleomycintransferase, welches für die Resistenz gegenüber dem DNA-bindenden Medikament Phleomycin bzw. Bleomycin verantwortlich ist. Das ca. 600 bp Gen *puro* bzw. das ca. 400 bp Gen *bleo* wurden mittels PCR mit den Restriktionsschnittstellen *Kpn1* und *BamH1* versehen. Diese Resistenzmarkergene kamen bei der Klonierung der Genaustauschmutanten zum Einsatz.

pBS-neo/pBS-hyg: Diese Plasmide wurden von Dr. E. Tannich (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten das Gen für die Neo-

mycinphosphotransferase bzw. für die Hygromycinphosphotransferase aus *E.coli* (Hamann et al., 1995). Das ca. 800 bp Gen *neo* bzw. das ca. 1.000 bp Gen *hygro* wurde mittels PCR mit den Restriktionsschnittstellen *Kpn1* und *BamH1* versehen. Die PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und für Genaustauschkonstrukte eingesetzt.

pIRmcs3+: Der pIRmcs3+ Vektor ist ein 8,5 kb-Derivat des Plasmids pIR1-SAT, das von S. Beverley (Washington University Medical School, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde. pIR1-SAT ermöglicht eine stadienspezifische Expression von subklonierten Genen in *Leishmania*. Die Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *Swa1* führt zur Linearisierung des Konstrukts. Der linearisierte Vektor trägt an den Enden Sequenzen des *small subunit rRNA locus* aus *L. major* und kann über homologe Rekombination in den rRNA Locus ins Genom integrieren. Dieser Genlocus wird von der RNA-Polymerase I transkribiert, womit eine effiziente Transkription des rekombinanten Gens gewährleistet ist. pIRmcs3+ trägt das *bla*-Gen. Für die Selektion rekombinanter Leishmanien besitzt der Vektor das SAT (Streptothricin-Acetyltransferase)-Gen, welches eine Nourseothricin-Resistenz vermittelt.

pJC45: Der bakterielle Expressionsvektor pJC45 (Schlüter et al., 2000) wird zur Expression rekombinanter *Leishmania* Proteine verwendet. Hierzu wurden die offenen Leserahmen (ORF) der zu exprimierenden Gene über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in den Vektor eingefügt. pJC45 ist ein 2,4 kb *high copy number* Plasmid und ein Derivat von pJC40 (Clos, and Brandau, 1994). Der Vektor trägt einen T7-Promotor und ein *lac*-Operon, um eine regulierte und effiziente Expression rekombinanter Gene zu ermöglichen. Eine Ko-Expression von zehn Histidinen (His₁₀) am N-Terminus des rekombinanten Proteins ermöglicht eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie. pJC45 enthält das pUC *origin of replication* und das β -Laktamase-Gen.

pET16b: Zur Herstellung der pMC02-Komplementationsplasmide wurde der pET16b Klonierungsvektor verwendet. Hierbei handelt es sich um ein 5.711 bp großes *low copy* Plasmid, welches das β -Laktamase-Gen (*bla*) für Ampicillin-Resistenz enthält.

pMC01: Da zur weiteren Einbringung größerer DNA-Fragmente der pET16b zu groß war, wurde dieser mittels der Restriktionsschnittstellen *EcoN1* und *Nru1* geöffnet. Die 5'- bzw. 3'-Überhänge wurden durch Klenow-Enzym aufgefüllt und das Plasmid zum 4.144 bp großen pMC01 religiert.

pMC02 und Derivate: Für die Konstruktion der Komplementationsplasmide wurde in das verkürzte Plasmid pMC01 der ca. 130 bp natürliche *E. coli* HslVU Promotor mittels der Restriktionsenzyme *Bgl2* und *Xba1* integriert, so dass das Plasmid pMC02 entstand. Anschließend wurde das 1.869 bp EchslVU zwischen die Restriktionsschnittstellen *Pml1*

und *BamH1* kloniert. Auf gleiche Weise wurden die putativen Sequenzanaloge aus *Leishmania donovani* LdHsIV (597 bp), LdHsIVlong (663 bp), LdHsIU1 (1.272 bp) sowie LdHsIU2 (1.512 bp) im Anschluss an den Promotor ligiert. So entstanden Plasmide, die jeweils nur die einzelnen Gene aus *L. donovani* zusammen mit dem Promotor exprimierten. Für die zusammengesetzten LdHsIVU Plasmide wurden LdHsIU1 bzw. LdHsIU2 mittels der Enzyme *BamH1* und *Nde1* im Anschluss an das LdHsIV bzw. LdHsIVlong kloniert (Vgl. Abb. 37).

pTL::eGFP: Die pTLv3- und pTLv4::eGFP-Vektoren, abgekürzt pTL::eGFP, sind Plasmide, die die Expression von eGFP-Fusionsproteinen in *Leishmania* ermöglichen und sich ausschließlich in der *multiple cloning side (mcs)* unterscheiden. Sie beinhalten DNA-Abschnitte des pcosTL-Vektors (Kelly et al., 1994), eine eGFP-Expressionskassette aus dem pIRmcs3+-eGFP-Vektor, sowie DNA-Abschnitte vom pUC19-Vektor. Deshalb besitzen diese zwei Vektoren neben dem eGFP-Gen, das die Expression von eGFP-Protein-Chimären ermöglicht, auch zwei Selektionsmarkergene: das *bla*-Gen und das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, die eine Selektion mit Ampicillin und Geneticin/G418 ermöglichen.

Tab. 1: Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendungszweck
P46-5'Xba-new	GGGGTCTAGAAAACGTATGCGCAACACTC	pcosP46-Konstrukt
P46-3'Xba-new	GGGGTCTAGATCTTAGTGGTGGCGGGGTGCTC	pcosP46-Konstrukt
P46 5'UTR-Kpn1	GGGGGTACCGTCGTCGCTCGCAAGGACC	P46 ko-Konstrukt
P46 5'UTR-EcoSwa1	GGGGAATTCATTTAAATCACCGGTCCCTTACAGCCCAC	P46 ko-Konstrukt
P46 3'UTR-Kpn1Bgl2	GGGGGTACCGAATTCAGATCTGCTGCAACACAGCCTCGC	P46 ko-Konstrukt
P46 3'UTR-Swa11Hind3	GGGAAGCTTATTTAAATGTGTACGAGCAAGAAGCC	P46 ko-Konstrukt
P46 AB-Xba1	GGGTCTAGAACCATGGGCAGCAGAGACTTG	P46 add back
P46 AB-Bgl2	GGGAGATCTGGCGTCTCACGTGATTGTG	P46 add back
LmjP46 5'flank-fwd (P3)	GCGCGTGGTATCTCAGGG	P46 Integrations-PCR
LmjP46 3'flank-rev (P4)	GTTTGAACGCAGCGTCGAG	P46 Integrations-PCR
P46-5'Nde1	GGGCATATGGGCAGCAGAGACTTGG	P46 Expression
P46-3'EcoR1	GGGGAATCTAATGGTCAAGGACAGTC	P46 Expression
HsIV 5'UTR-Kpn1	GGGGGTACCTCTCGGCTAAAGGATGTGTG	HsIV ko-Konstrukt
HsIV 5'UTR-EcoR1Swa1	GGGGAATTCATTTAAATCACATGTGTGCGCGTATGC	HsIV ko-Konstrukt
HsIV 3'UTR-Hind3Swa1	GGGAAGCTTATTTAAATTTCTCCTCTTTGCACGTG	HsIV ko-Konstrukt
HsIV 3'UTR-Kpn1EcoR1Bgl2	GGGGGTACCGAATTCAGATCTAGGAAGGTGTAAGAG	HsIV ko-Konstrukt
HsIV AB-Xba1	GGGTCTAGAATGTTCCGTCGCTTGC	HsIV add back
HsIV AB-BamH1	GGTGCGGATCCTGAGAGATACTCCCAC	HsIV add back

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendungszweck
LinHslV-fwd (P1)	ATGTTCCGTCGTCTTGCC	HslV ko-Verifizierung
LinHslV-rev (P2)	CTATTCTTGCTCTGCGC	HslV ko-Verifizierung
LinHslV 5'flank-fwd (P3)	CCCATTACCACAGTTTTC	Integrations PCR
LinHslV 3'flank-rev (P4)	GAGTCGGTACTGTAAAG	Integrations PCR
LiHslV-5'Nde1	GGG CATATG TTCCGTCGTTGCCAC	HslV Expression
LiHslV-3'EcoR1-n	GGG GAATTC TATTCCTTGCTCTGCGCCTC	HslV Expression
HslU1-5'UTR-EcoR1	GGG GAATTC ATTTAAATTCGTTGCGATGGGCGTAG	HslU1 ko-Konstrukt
HslU1-5'UTR-Kpn1	GGGG GTA CCGCGAGATAAAGGAAGATGG	HslU1 ko-Konstrukt
HslU1-3'UTR-BamH1	GGGG GATCC CGTGACGAGAGGCGAGTG	HslU1 ko-Konstrukt
HslU1-3'UTR-Hind3	GGG AAGCTT ATTTAAATCGTCACCTGCTACTGTAGGC	HslU1 ko-Konstrukt
HslU1-AB-Xba1	GGG TCTAGA ACCATGCACCGCGCCCTCTCGCTG	HslU1 add back
HslU1-AB-Bcl1	CTACACGCGCACCCCTACTC	HslU1 add back
LinHslU1-fwd (P1)	ATGCGCCCACGCGAGTTG	HslU1 ko-Verifizierung
LinHslU1-rev (P2)	TCACAAGATGAACTTCTTG	HslU1 ko-Verifizierung
HslU1 5'flank-fwd (P3)	GTTTCGGGCGTGCACTC	Integrations PCR
HslU1 3'flank-rev (P4)	GGGCGCCGAGTACATGAG	Integrations PCR
HslU1-5'Nde1	GGG CATATG CGCCCACGCGAGTTG	HslU1 Expression
HslU1 3'EcoR1	GGG GAATTC ACAAGATGAACTTCTTG	HslU1 Expression
HslU2-5'Nde1	GGG CATATG CTTCGCTTCCCGACTC	HslU2 Expression
LiHslU2-3'EcoR1	GGG GAATTC ACAATAAATACTTAGCTAAG	HslU2 Expression
HslU2-5'flank-fwd (P3)	GTGGCTTACGTTCTTCGTG	Integrations PCR
HslU2-3'flank-rev (P4)	GATGTGATGGTTTGCGAC	Integrations PCR
DHFR-TS-fwd	GTACGCCTTCCTTGACTTGC	addback Integrations-PCR
LST-IR-rev	TCGGGAAGCCTTGAAAGTGAG	addback Integrations-PCR
rDNAflank-3'rev	GAAAATGATCCAGCTGCAGG	addback Integrations-PCR
rDNAflank-5'fwd	ATTACATCAGACGTAATCTG	addback Integrations-PCR
BleoR-5'rev (P6)	GGAACGGCACTGGTCAAC	Bleo Integrations-PCR
BleoR-3'fwd (P5)	GCAACTGCGTGCACTTCG	Bleo Integrations-PCR
PuroAC-5'rev (P8)	GTGGGCTTGACTCGGTC	Puro Integrations-PCR
PuroAC-3'fwd (P7)	GGTGCATGACCCGCAAGC	Puro Integrations-PCR
Neo-5'rev	GGAGAACCTGCGTGCAATC	Neo-Integrations-PCR
Neo-3'fwd	GCGCATCGCCTTCTATCG	Neo-Integrations-PCR
Hygro-5'rev	GACGTGCGGTTGAGTTCAG	Hygro-Integrations-PCR
Hygro-3'fwd	GAAGTACTCGCCGATAGTG	Hygro-Integrations-PCR

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendungszweck
prom-Bgl2	GGG AGATCT CGCCGCCGGGGTTGAAACC	pMC02 Konstrukte
prom-Pml1Xba1	GGGT CTAGACACGTG CTGACCCCTTGGTTACG	pMC02 Konstrukte
EcHsIVU 5'Pml1	GGGTCAG CACGTG ACAACACTATAGTAAGC	pMC02 Konstrukte
EcHsIVU 3'BamH1	GGGG GATCCT TATAGGATAAAACGGCTC	pMC02 Konstrukte
HsIV 5'Pml1	GGGGAATT CACGTG ACCACCATTCTTTCTGTGCG	pMC02 Konstrukte
HsIV 3'BamH1	GGGG GATCCT CGAGCATATGAGATCCTTATTCTTCTGCTGCGCC TC	pMC02 Konstrukte
HsIVlong-5'Pml1	GGGGAATT CACGTG TTCCGTCGTCTTGCC	pMC02 Konstrukte
HsIU1-5'ATG	ATGCGCCCACGCGAGTTGATG	pMC02 Konstrukte
LiHsIU1 5'Nde1	GGGGAATT CATATGCGCCCACGCGAGTTGATG	pMC02 Konstrukte
HsIU1 3'BamH1	GGGG GATCCTCACAAGATGA ACTTCTTGATG	pMC02 Konstrukte
HsIU2-5'ATG	ATGCTTCGCTTCCCGACTCG	pMC02 Konstrukte
HsIU2 5'Nde1	GGG CATATGCTTCGCTTCCCGACTC	pMC02 Konstrukte
HsIU2 3'BamH1	GGGG GATCCTCACAATAA ACTTAGC	pMC02 Konstrukte

2.1.7. Verwendete Organismen und Stämme

Bakterien

Für Klonierungen wurde, falls nicht anders beschrieben, der *E. coli* DH5a *subcloning efficiency* Stamm verwendet. Zur Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli* BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q] Stamm eingesetzt, der sich vom BL21(DE3) Stamm (Novagen) ableitet und von O. Fayet (Centre National DeLa Recherche Scientifique, Toulouse) zur Verfügung gestellt wurde. Der Unterschied zum BL21(DE3) Stamm besteht im Vorhandensein eines zusätzlichen Plasmids, auf dem sich ein weiteres Gen für den *lac*-Repressor sowie ein Gen für die Kanamycin-Resistenz befindet. Für die Untersuchung der HsIVU Funktionalität wurde die Δ HsIVU/ClpXP/Lon *E. coli* Mutante verwendet, die anstatt der entsprechenden Gene Resistenzmarker für Tetrazyklin und Chloramphenicol trägt. Diese Mutante beruht auf dem *E. coli* Wildtyp Stamm MC4100 (Kanemori et al., 1997). Beide Stämme wurden freundlicherweise von M. Kanemori (Kanazawa University, Japan) zur Verfügung gestellt.

Mäuse

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren dienen NMRI Mäuse. Für die Parasitenpassage wurden sowohl BALB/c, als auch C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Knochenmarksmakrophagen (BMM) wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert.

Leishmanien

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit *Leishmania major* und *Leishmania donovani* durchgeführt. Die *L. major* Stämme (MHOM/SU/73/5ASKH), (MHOM/IL/81/FEBNI) und (MHOM/IL/80/FRIEDLIN) wurden von D. Evans (London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK), U. Ritter (Institut für Immunologie, Universität Regensburg) und D. Sacks (NIAID, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Der *L. donovani* Stamm 1SR (MHOM/SD/??/Lo8) wurde von D. Zilberstein (Technion, Israel Institute of Science, Haifa, Israel) zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Nährmedien, Antibiotika, häufig verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser angesetzt. Thermostabile Substanzen wurden gelöst und anschließend autoklaviert (135°C, 20 min), hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µM). Fetales Kälberserum (FCS) und Pferdeserum (PS) wurden zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 min bei 56°C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfrüermedium	30% komplementiertes Medium, 50% inaktiviertes FCS, 20% DMSO
komplementiertes M199 (pH 7,0)	1x M199-Medium, 20% inaktiviertes FCS, 0,2% NaHCO ₃ , 20 µg/ml Gentamicin, 2 mM L-Glutamin, 40 mM HEPES (pH 7,4), 10 µg/ml Haemin, 100 µM Adenin, 1,2 µg/ml 6-Biopterin
LB-Flüssigmedium	2% LB-Broth
LB-Agarplatten	2% LB-Broth, 1,5% Agar
RPMI	1x RPMI, 10% inaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin mit Penicillin/ Streptomycin
IMDM	55% IMDM (ohne Glutamin), 10% inaktiviertes (30 min bei 56°C) FCS, 5% PS, 30% Überstand von L929 Zellen

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Antibiotika und Inhibitoren

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg/ml in dH ₂ O	50 µg/ml
Bleomycin	2,5 mg/ml in 1x PBS (pH 7,0)	5 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in dH ₂ O	20 µg/ml
Genitacin/G418	100 mg/ml	50 µg/ml
Hygromycin	50 mg/ml	25 µg/ml

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Kanamycin	10 mg/ml in dH ₂ O	10 µg/ml
Nourseothriicin/CloNAT	150 mg/ml in dH ₂ O	150 µg/ml
Penicillin	5 000 Einheiten/ml	100 Einheiten/ml
Puromycin	1 mg/ml in Medium	25 µg/ml
Streptomycin	5 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml
Tetrazyklin	10 mg/ml in dH ₂ O	5 µg/ml

Tab. 4: Auflistung der wichtigen Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,5x TBE	45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0)
1x PBS	2,68 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
1x TAE	1 mM EDTA (pH 8,0), 40 mM Tris-Acetat
1x TBS (pH 7,2)	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2)
2x Laemmli	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerol
6x Ladepuffer	85% Formamid, 10 mM EDTA (pH 8,0), 1 mg/ml Bromphenolblau, 1 mg/ml Xylenyanol
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂
Aufschlusspuffer	15% Glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 70 mM KCl, 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin
Bleicitratlösung (pH 12)	80 mM Pb(NO ₃), 120 mM Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)x2H ₂ O, 16% 1N NaOH
Blotpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glyzin, 0,037% SDS, 20% Methanol
Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2)	100 mM Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ x3H ₂ O, 100 mM Saccharose, 2 mM CaCl ₂ , 8% 0,1N HCl
Plasmid-Lösung 1	50 mM Glukose, 10 mM EDTA (pH 8,0), 25 mM Tris
Plasmid-Lösung 2	0,2 N NaOH, 1% SDS
Plasmid-Lösung 3	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0)
TE-RNase A	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 µg/ml RNase A

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur von Leishmanien

2.2.1.1. Kultivierung promastigoter Leishmanien

Die promastigote Form der Leishmanien liegt in der Sandfliege assoziiert an das Darmepithel vor. Um vergleichbare Bedingungen für die *in vitro* Kultivierung zu schaffen, wurden die Promastigoten in komplementiertem M199 (pH 7,0) bei 25°C und unter limitierender Luftzufuhr in 25 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert. Bei transfizierten Kulturen wurden dem Medium zusätzlich entsprechende Antibiotika hinzugefügt. Für Experimente wurden Promastigote aus verschiedenen Wachstumsphasen eingesetzt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe eines *CASY Cell Counters*. Um ein logarithmisches Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen dreimal wöchentlich auf eine Dichte von 5x10⁵-1x10⁶ Zellen/ml verdünnt.

2.2.1.2. Kryokonservierung von Leishmanien

Eukaryotische Zellen können unter Zusatz von DMSO, welches die Bildung von Eiskristallen verhindert, lange Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zur Langzeitkonservierung von Leishmanien wurden logarithmisch wachsende Promastigote sedimentiert (1.250xg, 10 min, 4°C), in kaltem komplementiertem M199 (pH 7,0) resuspendiert, mit 1 Volumen kaltem Einfriermedium (50% komplementiertes M199, 30% inaktiviertes FCS, 20% DMSO) gemischt und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert, so dass eine Zelldichte von 1-2x10⁸ Zellen/ml vorlag. Um eine moderate Kühlungsrate sicherzustellen, wurden die Zellen zunächst für 24 h bei -70°C eingefroren, bevor sie dauerhaft in den Kryotank überführt wurden.

2.2.1.3. Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Wird dabei die DNA in das Genom integriert und bei Zellteilungen weitergegeben, so spricht man von stabiler Transfektion. Die Elektroporation ist eine Methode der Transfektion, bei der die Zellmembran durch einen elektrischen Puls hoher Feldstärke durchlässig gemacht wird, so dass die DNA in das Zellinnere gelangt. Zur Transfektion wurden Leishmanien aus der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert (1.250xg, 10 min, 4°C) und je einmal mit kaltem PBS (pH 7,0) und kaltem Elektroporationspuffer (21 mM HEPES [pH 7,5], 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM Glukose) gewaschen. Das Sediment wurde so in Elektroporationspuffer resuspendiert, dass eine Dichte von 1x10⁸ Zellen/ml vorlag. 400 µl dieser Suspension wurden zusammen mit der zu transfizierenden DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (4 mm) gegeben. Für eine Integration von linearer DNA durch homologe Rekombination wurde dem Ansatz 2-4 µg DNA eines Integrations-Konstrukts zugegeben. Zur episomalen Etablierung zirkulärer DNA wurden 50 µg ver-

wendet. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne DNA. Die Elektroporation erfolgte mit dem *GenePulser* (Bio-Rad) durch dreimalige Stromstöße bei 1,5 kV (3.750 V/cm), 25 μ F, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Zeitkonstante von etwa 1 ms. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min auf Eis gekühlt, bevor sie in 10 ml Medium überführt und für 24 h bei 25°C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde dem Medium zur Selektion rekombinanter Zellen, je nach transfiziertem DNA-Konstrukt, Antibiotika in entsprechender Konzentration zugegeben. Bei der folgenden Kultivierung wurden die Transfektanten und die Kontrollgruppe stets gleich verdünnt. Die Selektion auf rekombinante Leishmanien war abgeschlossen, sobald die Kontrolle keine lebenden Parasiten mehr enthielt.

2.2.1.4. Serielle Verdünnung von Mischpopulationen

Die Vereinzelung von Mischpopulationen zu Einzelklonen erfolgte in Mikrotiterplatten. Hierzu wurde die Mischpopulation durch eine serielle Verdünnung auf eine Zelldichte von 2,5 Zellen/ml eingestellt. Die Verdünnung erfolgte in komplementiertem M199, versetzt mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) sowie den entsprechenden Selektionsantibiotika, so dass sich eine rechnerische Konzentration von 0,5 Zellen pro 200 μ l Medium ergab. Diese verdünnte Kultur wurde auf eine 96-Well Mikrotiterplatte verteilt (200 μ l/Vertiefung). Nach Verschluss mit Parafilm wurde die Platte für 10-14 Tage bei 25°C inkubiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Sind in maximal der Hälfte aller Vertiefungen der Mikrotiterplatte Leishmanien angewachsen, wurde davon ausgegangen, dass es sich um Einzelzellklone handelt. Einige dieser Einzelklonkulturen wurden in Kulturflaschen überführt und im Folgenden als Einzelklone kultiviert.

2.2.1.5. *In vitro* Differenzierung

Für die Untersuchung von Proteinexpressionen im Verlauf des Lebenszyklus von *Leishmania donovani* dient die *in vitro* Stadiendifferenzierung von Promastigoten zu axenischen Amastigoten (Saar et al., 1998). Dafür wurden logarithmisch wachsende Promastigote auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in M199 (pH 7,0) verdünnt und 24 h bei 37°C in Zellkulturflaschen mit gasundurchlässigem Deckel inkubiert. Nach 24 h, in denen sich die Zelldichte auf ca. $1-2 \times 10^7$ erhöhte, wurden die Zellen zentrifugiert und in doppeltem Ausgangsvolumen M199 (pH 5,5) resuspendiert. Die Zellen wurden für weitere 3 Tage bei 37°C inkubiert, wobei am zweiten Tag nach Ansäuerung das Medium erneuert wurde. Während des gesamten Differenzierungsprozesses wurden täglich Parasiten abgenommen, deren Zelllysate für weitere Versuche eingesetzt wurden.

2.2.1.6. Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern

Um eine bessere Haftung der Parasiten auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wird die Oberfläche der Objektträger durch die kationischen Polylysinmoleküle positiv aufgeladen. Dies führt zu einer verbesserten Haftung

der zumeist negativ geladenen, proteinreichen Parasitenoberflächen (Mazia et al., 1975). Zunächst wurden die Objektträger mit 96% Ethanol gereinigt und mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurde ein Tropfen Poly-L-Lysin auf einen Objektträger getropft und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach Trocknung an der Luft wurden die beschichteten Objektträger bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.7. Fixierung von Leishmanien

Für die Immunfluoreszenz wurden 1×10^7 Leishmanien sedimentiert (1.250xg, 5 min, 4°C), zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Je 20 μ l (entsprechen 2×10^5 Zellen) dieser Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gegeben, getrocknet und 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Nach der Fixierung wurden die Objektträger für mindestens 20 min getrocknet. Die fixierten Leishmanien wurden mit einem Fettstift (G. Kisker) umkreist und bis zur Verwendung bei 4°C unter trockenen Bedingungen gelagert.

2.2.1.8. Herstellung von *Leishmania* Antigen

Für die Herstellung von löslichem *Leishmania* Antigen (*L-Ag*) wurden promastigote *L. major* 5ASKH Wildtyp Parasiten dreimal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 3.000xg, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die Parasiten gezählt und mit PBS auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Aliquots (200 μ l) wurden abwechselnd je 3 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das so gewonnene *L-Ag* wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Anzucht und Konservierung von *E. coli*

E. coli wurde in LB-Medium in Gegenwart der jeweiligen Antibiotika bei 37°C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Inokulation erfolgte mit Einzelkolonien von frischen Vereinzlungsplatten oder aus Übernachtskulturen, die zuvor auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt worden sind. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit Hilfe eines Photometers verfolgt. Zur langfristigen Aufbewahrung von transgenen Bakterien wurden sowohl *Stab*-Kulturen als auch Glycerol-Stocks angelegt. Für die *Stab*-Kulturen wurde 1ml LB-Agar je Kultur autoklaviert, auf 50°C heruntergekühlt und in 2 ml Drehverschlussröhrchen gefüllt. Nach dem Aushärten wurde mittels Impföse eine Kolonie einer frisch überimpften Agarplatte gepickt und mehrmals tief in den Softagar gestochen. Der Ansatz wurde mit leicht geöffnetem Deckel für 4-8 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor er zur Langzeitlagerung dicht verschlossen bei 4°C aufbewahrt wurde. Für die Kryokonservierung wurden 500 μ l einer 4ml Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit 500 μ l sterilem Glycerol versetzt und in Kryogefäßen bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2.2. Herstellung kompetenter *E. coli*

Da Bakterien von sich aus nur in geringem Umfang DNA aufnehmen, müssen sie zunächst in einen Zustand versetzt werden, in dem die DNA-Aufnahme effektiv möglich ist. Zu diesem Zweck wurden *E. coli*-Zellen mittels Calciumchlorid-Behandlung kompetent gemacht. 200 ml LB-Medium wurden mit dem jeweiligen Selektionsantibiotika versetzt und mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm beimpft. Die Kultur wurde schüttelnd bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml ($OD_{600}: 0,4-0,5$) herangezogen. Nach Zentrifugation ($3.220 \times g$, 15 min, 4°C) wurden die Zellen in 20 ml einer eiskalten 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$, 50% Glycerin und 7% DMSO resuspendiert. Anschließend wurden 50 μ l Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.3. Transformation von *E. coli*

Eine Transformation stellt die Einschleusung freier, löslicher DNA in Bakterienzellen dar. Plasmide und Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 α bzw. KY2266 transformiert, Expressionsvektoren in *E. coli* BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q]-Zellen. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 25-50 μ l der Zellen wurden mit 1-3 μ l eines Ligationsansatzes oder 0,5-1 μ l Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 20 s bei 37°C (bei den DH5 α - und KY2266-Zellen) bzw. 30 s bei 42°C (bei den BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q]-Zellen). Nach kurzer Inkubation der Zellen auf Eis, wurden diese mit 1 ml LB-Medium versehen und für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Sedimentation ($3.220 \times g$, 5 min, RT) wurde der Überstand bis auf 150 μ l abgenommen und das Zellsediment in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Jeweils 100 μ l wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Aufnahme der Plasmid-DNA besitzen die Bakterien ein (zusätzliches) Resistenzgen, das ihnen das Wachstum auf entsprechenden Selektionsplatten ermöglicht.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki et al., 1988). Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird zu einem einzelsträngigen DNA-Strang, der als Matrize dient, ein komplementärer Strang synthetisiert. Die als Doppelstrang vorliegenden DNA-Fragmente (oder auch DNA-RNA-Hybride nach einer reversen Transkription) werden durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Das anschließende Abkühlen ermöglicht die Hybridisierung von zwei Oligonukleotiden an die Matrize (*annealing*), an die dann durch eine thermostabile DNA-Polymerase Nukleotide in 5'→3'-Richtung angefügt werden (Elongation). Die aufeinander folgenden Zyklen aus Denaturierung, *annealing* und Elongation ermöglichen die

exponentielle Synthese der zu amplifizierenden DNA. Die Reaktion läuft automatisiert im *Mastercycler gradient* ab. Das Reaktionsprofil wird für jede PCR angepasst. Hierbei werden die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide, die Eigenschaften der verwendeten Polymerase sowie die Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts berücksichtigt. Nach Beendigung wird der Ansatz auf 4°C gekühlt. Die Versuchsbedingungen für eine Standard-PCR sind im Folgenden aufgelistet.

PCR-Programm:

initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 25-30 Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	
<i>annealing</i>	50-60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/1 kbp	
Füllsynthese	72°C	5 min	

Für die Synthese von zu klonierenden PCR-Produkten wurde die Polymerase *i-Proof* aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt. Für analytische Amplifikationen wurde die Taq DNA Polymerase *recombinant* verwendet. Dieses Enzym besitzt neben der 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Jeder analytische Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt folgende Komponenten:

Menge	Bezeichnung
2,5 µl	10x Puffer (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl)
0,5 µl	dNTPs (10 mM je dNTP)
0,75 µl	50 mM MgCl ₂
0,5 µl	10 µM <i>forward primer</i>
0,5 µl	10 µM <i>reverse primer</i>
0,25 µl	Taq DNA Polymerase (5U/µl)
19,5 µl	dH ₂ O
0,5 µl	<i>template</i> (DNA oder dH ₂ O)

Für die Kontrollen wurde jeweils nur einer der beiden eingesetzten Oligonukleotide oder dH₂O statt der DNA eingesetzt, um unspezifische PCR-Produkte oder Kontaminationen durch Fremd-DNA auszuschließen. Die PCR-Ansätze wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, um die entstandenen Amplifikate zu detektieren. Präparative PCR-Ansätze wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.3.2. Semi-quantitative *real-time* RT-PCR

Mittels semi-quantitativer *real-time* Reverse-Transkriptase PCR wurde die mRNA Menge in diversen transfizierten Leishmanien quantifiziert. Hierzu wurden 3x10⁷ Leishmanien

sedimentiert und zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers. Es folgte die cDNA-Synthese unter Verwendung des QuantiTect *Reverse Transcription* Kits. Die gewonnene cDNA wurde mit spezifischen Oligonukleotiden auf die Transkripte der jeweiligen Proteine und β -Aktin (interner Standard) untersucht. Dabei kam das RealMasterMix Kit zum Einsatz, das den Farbstoff *SYBR Green 1* enthält. Die Amplifizierung und Quantifizierung erfolgte im *real-time PCR Cycler Rotorgene 3000* (Software Version 6).

2.2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von negativ geladenen DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe. In dieser Arbeit wurden jeweils 1%ige Gele in TAE-Puffer verwendet. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde dem Agarosegel der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.1 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die DNA-Proben wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt und die Auftrennung erfolgte bei 10 Volt/cm. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandard und zur semi-quantitativen Bestimmung der DNA-Mengen wurde zusätzlich ein 1 kb DNA-Marker aufgetragen.

2.2.3.4. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen

Um störende Salze, Proteine, Nukleotide oder Matrizen- bzw. Vektor-DNA zu entfernen, wurden PCR-Produkte oder DNA-Fragmente nach einem präparativen Restriktionsverdau über ein 1x TAE-Agarosegel aufgereinigt. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Isolierung aus der Agarose erfolgte mit dem NucleoSpin *Extract II* oder dem *GeneClean* Kit laut Herstellerangaben. Die Quantitätsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung.

2.2.3.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung wässriger DNA-Lösungen erfolgte photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein Absorptionswert von 1,0 bei dieser Wellenlänge entspricht dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Protein-Verunreinigungen der DNA-Lösungen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm und Berechnung des A_{260}/A_{280} -Quotienten nachgewiesen. Für reine DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, für reine RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf die Anwesenheit von Proteinen oder auch auf die unvollständige Entfernung von Phenolresten bei der DNA-Präzipitation hin.

2.2.3.6. Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist die Spaltung doppelsträngiger DNA möglich, weil die DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in beiden Strängen geschnitten wird. Die Enzyme wirken sequenzspezifisch, wobei in der Regel palindromische Sequenzen erkannt werden. Durch diesen Vorgang entstehen einzelsträngige 3'-oder 5'-Überhänge (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsanalysen zur Identifizierung von DNA-Konstrukten, zur gerichteten Klonierung sowie zur Linearisierung angewendet. Die Restriktionsverdauungen wurden in den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Für analytische Zwecke wurde 1 μg DNA für 1 Stunde verdaut, während präparative Verdauungen (10-20 μg DNA) mindestens über 2 Stunden in einem Gesamtvolumen von 100 μl durchgeführt wurden. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von DNA-Ladepuffer oder Einfrieren bei -20°C gestoppt. Die erfolgreiche Spaltung der DNA wurde durch Auftragen eines Aliquots des Reaktionsansatzes auf ein 1%iges TAE-Gel überprüft.

2.2.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Ligase miteinander verknüpft, die unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphatrest eines DNA-Stranges und einer freien 3'-Hydroxylgruppe eines benachbarten DNA-Stranges katalysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die aus dem Bakteriophagen T4 stammende Ligase verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μl durchgeführt. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Gesamtmenge an eingesetzter Vektor-DNA betrug 25-50 ng. Pro Ansatz wurde eine *Unit* Ligase sowie der entsprechende Puffer verwendet. Die Ligation von überhängenden Enden erfolgte bei 4°C über Nacht, die von glatten Enden bei RT für 4 h. Die Ansätze wurden anschließend in *E. coli* transformiert.

2.2.3.8. Fill-In Reaktion mit Klenow-Fragment

Das Klenow-Fragment ist ein Teil der *E. coli* DNA-Polymerase I. Es besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität, mit der es komplementäre Nukleotide in einzelsträngige *template*-DNA einbauen und somit glatte Enden (*blunt ends*) erzeugen kann (*fill-in*). In dieser Arbeit wurden teilweise 5'-Enden (*sticky ends*) mit Nukleotiden aufgefüllt, um spezifisch Restriktionsschnittstellen zu zerstören. *Fill-in* Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 μl durchgeführt. Hierfür wurde 1 μg *template* DNA mit 1 U Klenow-Fragment, dNTPs (je 25 μM) und 2 μl 10x Puffer zusammengefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die Inaktivierung des Klenow-Enzyms erfolgte durch Inkubation im Heizblock (10 min, 70°C). Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA durchgeführt.

2.2.3.9. Dephosphorylierung von DNA

Um bei Klonierungen die Religation des Vektors zu reduzieren und den Einbau von Fremd-DNA zu fördern, wurden die durch Restriktionsverdau entstandenen 5'-Phosphatreste an den Enden eines Vektors mit dem Enzym Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde im Anschluss an einen Restriktionsverdau 1 Unit Alkalische Phosphatase pro μg DNA zugefügt und 60 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 min erneut Enzym zugefügt wurde. Durch Zugabe von EGTA (5 mM Endkonzentration) und anschließender Inkubation für 5 min bei 75°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Dephosphorylierung von 3'-Überhängen erfolgte für 30 min bei 37°C. Nach Zugabe von frischem Enzym wurde die Temperatur für weitere 30 min auf 55°C erhöht. Die Reaktion wurde wie bereits beschrieben beendet. Die Entfernung des Enzyms aus dem Ansatz erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

2.2.3.10. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen. Dazu wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und intensiv gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (3.220xg, 10 min, RT). In der Interphase sammeln sich dabei die durch das Phenol denaturierten Proteine an, wohingegen sich die DNA in der oberen wässrigen Phase befindet. Diese Phase wurde abgenommen, und die darin enthaltene DNA gefällt.

2.2.3.11. Ethanolfällung von DNA

Die Entsalzung oder Konzentrierung von Nukleinsäuren wird in Anwesenheit monovalenter Kationen in Alkohol durchgeführt. Dabei bildet sich ein unlöslicher Niederschlag, der durch Zentrifugation sedimentiert und durch Waschen von Salz- und Alkoholresten gereinigt wird. DNA-Lösungen wurden zur Fällung mit 1/10 Volumen 10 M NH_4 -Acetat sowie 2,5 Volumen 98% Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert, anschließend sedimentiert (3.220xg, 30 min, RT) und mit 70% Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Qualitäts- und Quantitätsbestimmung erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese oder durch photometrische Messung.

2.2.3.12. Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien

Für die Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien kam das *Cell & Tissue DNA Purification* Kit von Gentra Systems nach Herstellerangaben zum Einsatz. Hierzu wurden 1×10^8 Leishmanien sedimentiert (1.250xg, 10 min, 4°C), zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen und durch Zugabe von 300 μl *cell lysis solution* lysiert. Die Lyse der Zellen fand in Anwesenheit eines DNA-Stabilisators statt, der die DNase-Aktivität einschränkt und so die DNA vor einem vorzeitigen Abbau bewahrt. Nach der Behandlung mit RNase A (0,2

mg/ml, 30 min, 37°C) erfolgte die Fällung der Proteine durch Zugabe von 100 μ l *protein precipitation solution* und 5-minütiger Inkubation auf Eis. Nach Sedimentation (16.100xg, 5 min, RT) wurde die im Überstand enthaltene DNA mit 300 μ l Isopropanol gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, bevor es in 100 μ l *DNA hydration solution* für 1 h bei 65°C gelöst wurde.

2.2.3.13. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Nach der Transformation der Plasmid-Konstrukte in kompetente Bakterien wurden diese vermehrt, um das Plasmid zu isolieren und für weitere Experimente einzusetzen. In Abhängigkeit von der benötigten Menge an Plasmid-DNA wurden verschiedene Arten der Präparation (Minipräparation, Maxipräparation) angewandt. Dabei werden Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und bei der nachfolgenden Neutralisierung bakterielle Proteine, Membranreste und die Nukleotid-DNA ausgefällt, wohingegen die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt. Anschließend kann diese durch Ethanol (Minipräparation) oder Isopropanol (Maxipräparation) gefällt werden.

Für Minipräparationen wurden 2 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (16.100xg, 5 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 100 μ l Plasmid-Lösung 1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 μ l Plasmid-Lösung 2 hinzugefügt. Die Proteine und das in Plasmid-Lösung 2 befindliche SDS wurden durch Zugabe von 150 μ l Plasmid-Lösung 3 in einer 5-minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation (16.100xg, 30 min, 4°C) wurden Zelltrümmer, gefällte Proteine und SDS von der gelösten Plasmid-DNA getrennt. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (16.100xg, 10 min, RT). Nach Zentrifugation (16.100xg, 10 min, RT) wurde das DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 40 μ l TE-RNase A aufgenommen und für 30 min bei 37°C gelöst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in einer Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.2.3.14. Isolierung hochreiner Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Leishmanien sind große Mengen hochreiner superhelikaler Plasmid-DNA erforderlich. Um dies zu gewährleisten, wurde eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 400 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterienkultur (5.000xg, 15 min, 4°C) wurde das Sediment in 10 ml Plasmid-Lösung 1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz mit 20 ml Plasmid-Lösung 2 versetzt, durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für 15 min bei RT auf einem Rollentisch inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz mit 15 ml Plasmid-Lösung 3 versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert, sedimentiert (3.220xg, 10 min,

4°C), und der Überstand durch einen Faltenfilter in ein frisches Reaktionsgefäß filtriert. Anschließend wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugefügt, 20 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (3.220xg, 30 min, RT) sedimentiert. Die gefällte DNA wurde daraufhin mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das getrocknete DNA-Präzipitat wurde in 4 ml TE (pH 8,0) vollständig gelöst. Nachfolgend wurde die DNA-Lösung mit 4,9 g Cäsiumchlorid sowie mit 150 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt, gut gemischt, bis das Cäsiumchlorid vollständig gelöst war, und kurz zentrifugiert. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die DNA-Lösung in ein *Quick-Seal*-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, austariert und luftblasenfrei verschweißt. Es folgte eine 18-stündige Zentrifugation bei 173.000xg und 25°C in der Ultrazentrifuge. Nach Beendigung des Zentrifugationslaufs wurde die Bande, welche die superhelikale Plasmid-DNA enthielt, vorsichtig abgenommen. Um interkaliertes Ethidiumbromid aus der DNA zu entfernen, wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 0,1 Volumen NH₄-Acetat-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt. Der Überstand wurde verworfen, die DNA anschließend mit zwei Volumen dH₂O und 0,1 Volumen 7,5 M Ammoniumacetatlösung versetzt. Nach Zugabe von 2,5 Volumen 98% Ethanol wurde die DNA gefällt, sedimentiert (3.220xg, 30 min, RT) und nach einem letzten Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Präzipitat in 500 μ l TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

2.2.3.15. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Nach der Identifizierung von Bakterienklonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment enthielten, wurden die entsprechenden Fragmente sequenziert, um mögliche Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen auszuschließen. Dafür wurde die gewünschte Plasmid-DNA mit den jeweiligen Oligonukleotiden zur Sequenzierung an AGOWA (Berlin) geschickt. Die Analyse der Daten erfolgte unter Anwendung der Software MacVector sowie mittels Datenbankanalysen von öffentlich zugänglichen Datenbanken.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die rekombinante Überexpression der in pJC45 unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors stehenden Sequenzen erfolgt in *E. coli* BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q]. Zur Induktion der Expression werden die Kulturen mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) versetzt, welches an den *lac*-Repressor bindet. Dieser verliert aufgrund einer Konformationsänderung die Fähigkeit, 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.

Für die rekombinante Expression des P46 und der putativen HsIVU Proteine wurden die entsprechenden ORF in die *multiple cloning site (mcs)* des pJC45-Vektors integriert. Im Anschluss wurden Kompetente BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q]-Zellen mit den Expressionsvektoren transformiert. Als Kontrolle diente der pJC45-Vektor ohne Insert. Einzelkolonien der über Nacht gewachsenen Transformanden wurden in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin überführt. Für Testexpressionen wurden 10 ml Kulturen verwendet, für eine Expression der rekombinanten Proteine im präparativen Maßstab wurden 400 ml Ansätze eingesetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,1-0,3 erreichten. Je 2 ml der Bakterienkultur wurde als Negativ-Kontrolle (uninduzierte Probe) 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 OD₆₀₀ bestimmt und eine 2 ml Probe (induzierte Probe) entnommen. Die Proben wurden zur Analyse in einem SDS-Polyacrylamid-Gel wie unter 2.2.4.5. beschrieben vorbereitet und bis zur Elektrophorese bei -20°C aufbewahrt. Dabei war zu beachten, dass die Proben vor und nach Zugabe von IPTG die gleiche Dichte haben.

2.2.4.2. Aufreinigung durch Affinitätschromatographie

Die in *E. coli* exprimierten Genprodukte der in den Expressionsvektor pJC45 klonierten ORF erhalten am N-terminalen Ende zusätzlich ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Oligopeptid mit 10 Histidin-Resten (His₁₀), die eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglichen. Bei dieser Methode bilden die rekombinanten Proteine über den Histidin-*tag* einen stabilen Koordinationskomplex mit den Nickelionen, die an eine Säulenmatrix gekoppelt sind. Die Elution des Proteins erfolgt mit Imidazolhaltigem Puffer in einem Konzentrationsgradienten. Dabei konkurriert Imidazol mit dem Histidin um die Bindung an Nickel.

Nach positiver Auswertung des SDS-Gels folgte die Zentrifugation der restlichen induzierten Bakterienkultur (2.744xg, 20 min, 4°C). Das Zellsediment wurde mit kaltem PBS (pH 7,0) gewaschen und in 20 ml Puffer 1 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizierung der Probe auf Eis (6x 20 s, 45% Output). Nach Sedimentation (7.700xg, 30 min, 4°C) befanden sich die unlöslichen Bestandteile, wie z.B. *inclusion bodies*, im Sediment der Probe, während die löslichen Proteine im Überstand zu finden waren. Um zu überprüfen, in welcher Fraktion sich das rekombinant exprimierte Protein befand, wurden Proben vom Sediment und vom Überstand mit Laemmli-Probenpuffer versehen, aufgeköcht und im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Liegt das rekombinante Protein in den *inclusion bodies* der Bakterien vor, müssen die Proteine unter denaturierenden Bedingungen aus ihnen gelöst werden. Hierzu wurde das Sediment in 10 ml Puffer 2 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 8 M Urea) resuspendiert und für 1 h auf dem Rollenschüttler im Kühlraum inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (7.700xg, 30 min, 4°C) wurde eine Probe aus dem

Überstand mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und es folgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proben vor und nach Behandlung mit Harnstoff.

Zur Herstellung der Aufreinigungssäule wurden 1 ml *HisBind Resin* (Novagen) mehrfach mit 10 ml Puffer 2 gewaschen, mit 2 ml einer 100 mM Nickelsulfat-Lösung inkubiert und pelletiert. Anschließend folgte die Fusionierung des gewaschenen und aktivierten Säulenmaterials mit der Proteinlösung für 1 h im Kühlraum auf dem Rollenschüttler. Nach der Inkubation wurde das Protein-Matrix-Gemisch auf eine leere und mit dH₂O äquilibrierte Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. In den darauf folgenden Waschschrritten wurden jeweils 10 ml Puffer 2, 3 und 4, die sich ausschließlich in ihren Imidazolkonzentrationen unterscheiden (5 mM, 20 mM, 60 mM), auf die Säule gegeben. Die jeweiligen Durchflüsse wurden aufgefangen. Im Anschluss erfolgte die schrittweise Elution des rekombinanten Proteins mit je 1,5 ml Puffer 5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 8 M Urea). Aliquots (15 μ l) der fünf separat gesammelten Fraktionen sowie die Durchflussfraktionen wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemacht.

2.2.4.3. Dialyse und Einengen von Proteinlösungen

Für das Entfernen des Harnstoffs aus eluierten Proteinfractionen wurden die Proben in äquilibrierten Dialyseschläuchen mit einem MWCO-Wert (*molecular weight cut-off*) von 6-8 kDa bei 4°C gegen PBS (pH 7,0) dialysiert. Im Anschluss wurden die Proteinlösungen eingengt, um ausreichend hohe Konzentrationen zu erhalten. Hierfür wurden nach Herstellerangaben Amicon Ultrazentrifugenfilter verwendet, deren Poren eine Ausschlussgröße von 10 kDa aufwiesen.

2.2.4.4. Quantitative Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte photometrisch bei 215 nm mit Hilfe einer *TrayCell* Küvette der Firma Hellma nach Herstellerangaben.

2.2.4.5. Denaturierender Zellaufschluss

Zur Herstellung von denaturierten *E. coli*- bzw. *Leishmania*-Zelllysaten wurden Aliquots der jeweiligen Kulturen sedimentiert (3.220xg, 10 min, RT), zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen, je nach gewünschter Zelldichte in PBS resuspendiert und mit 1 Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung wurden die Zellen 5 min bei 95°C aufgeköcht. Zur Scherung der DNA wurden die Lysate für 5 min bei 100% Output bei RT im Ultraschallbad sonifiziert bzw. mit Ribolyser-Kügelchen intensiv gemischt (30 s vortexen) und im Anschluss zentrifugiert (16.100xg, 5 min, RT). Das im Überstand befindliche zelluläre Gesamtprotein wurde sofort gelelektrophoretisch analysiert.

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

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse durch die Wanderung in einem elektrischen Feld. Die Proteinstruktur wird dabei durch die denaturierende Wirkung des im Laufpuffer und Gel enthaltenen SDS aufgelöst. Die Zugabe von DTT bewirkt die Reduzierung von Disulfidbrücken und dadurch die völlige Entfaltung der Proteine, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine nur noch von ihrer Größe, jedoch nicht mehr von ihrer Form abhängt. Die Eigenladung der Proteine wird zudem durch die negative Ladung des SDS überdeckt, was dazu führt, dass die Proteine von der Kathode zur Anode wandern. Für die Experimente wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem die Proteine zuerst mit Hilfe eines Sammelgels fokussiert und im Trenngel aufgetrennt werden (Laemmli, 1970).

In einem vertikalen Gel-Gießstand wurden zunächst zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten und zwei Abstandhalter eingespannt, bevor ein Trenngel eingegossen werden konnte. Es wurden jeweils 5%ige Sammelgele (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], 5% Acrylamid-Bisacrylamid [37,5:1; 40%], 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED) und 10%ige Trenngele (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], 10% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1; 40%), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED) verwendet. Das Trenngel wurde mit 70%igem Ethanol überschichtet und bis zur vollständigen Polymerisation bei RT gelagert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Trenngel mit dem 5%igen Sammelgel überschichtet und sofort mit einem Kamm mit der erforderlichen Taschenzahl für die Proteinproben versehen. Sobald das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde die Apparatur in eine vertikale Gelkammer eingebaut. Die Gelkammer wurde mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt bis das Gel vollständig überschichtet war, der Probenkamm aus dem Sammelgel entfernt und die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen des Gels gegeben. Als Größenmarker wurde der PageRuler *Prestained Protein Ladder* verwendet, dessen Proteinbanden sowohl im Gel als auch später auf der Blotmembran als farbige Banden sichtbar sind. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 15 V/cm. Anschließend wurden die Proteingele je nach Verwendungszweck mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder auf eine PVDF Membran transferiert.

2.2.4.7. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Unter Verwendung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau R-250 können in einem Polyacrylamidgel unspezifisch alle Proteine angefärbt werden. Dies geschieht durch Anlagerung des Farbstoffes an die basischen Seitenketten der Aminosäuren, wodurch unspezifisch fast alle Proteine gefärbt werden. Die Färbung der Proteingele wurde durch mindestens 2-stündiges Schwenken in der Färbelösung (1 g/l Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 40% Ethanol [98%], 10% Essigsäure) bei RT durchgeführt. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärbelösung (40% Ethanol [98%], 10% Essigsäure) geschwenkt, bis

der Hintergrund des Gels die Farbe wieder abgegeben hatte, und nur noch die gefärbten Proteinbanden zu erkennen waren. Nach der Entfärbung wurde das Gel in dH₂O gespült, digitalisiert und zur Aufbewahrung zwischen zwei feuchte Zellophanfolien gespannt und getrocknet.

2.2.4.8. Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

Zur Untersuchung nativer Proteine und Proteinkomplexe muss das zelluläre Gesamtprotein unter nativen Bedingungen aus den Leishmanien extrahiert werden. Hierfür wurden 2×10^7 Promastigote einer logarithmisch wachsenden Kultur sedimentiert (1.250xg, 10 min, 4°C), zweimal mit kaltem PBS (pH 7,0) gewaschen und in 40 μ l Aufschluss-Puffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen. Zum Scheren der DNA wurden die Lysate mit Ribolyser-Kügelchen gemischt und anschließend zentrifugiert (12.000xg, 5 min, RT). Das im Überstand befindliche zelluläre Gesamtprotein wurde in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.4.9. Native Größenausschluss-PAGE

Die Native PAGE ermöglicht durch ihre nicht-denaturierenden Bedingungen, native, also gefaltete Proteine und Proteinkomplexe zu untersuchen. Diese wandern im Gradientengel mit zunehmend kleiner werdenden Poren bis zu ihrer Porenausschlussgröße und konzentrieren sich dort (Andersson et al., 1972). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit einem Gradienten von 4-18% Acrylamidkonzentration verwendet. Dafür wurden in einen Mischer mit zwei Kammern Lösungen unterschiedlicher Acrylamidkonzentration eingefüllt (Vgl. Abb. 6). In Kammer **A** wurden 27 ml einer leichten Lösung (50% TBE, 2,5% Glycerin, 4% Acrylamid-Bisacrylamid, 0,05% APS, 0,05% TEMED) pipettiert, in Kammer **B** 28 ml einer schweren Lösung (50% TBE, 15% Glycerin, 18% Acrylamid-Bisacrylamid, 0,05% APS, 0,05% TEMED, 0,005% Bromphenolblau). Das Bromphenolblau diente der Visualisierung des Gradienten.

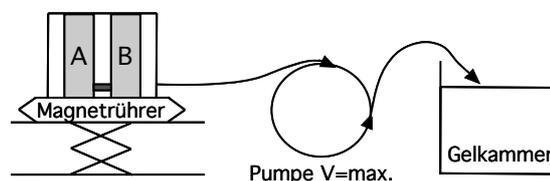


Abb. 6: Schematische Darstellung der Apparatur für die Native PAGE

Die Lösungen wurden mit Hilfe einer Pumpe in eine vertikale Gelkammer (20 cm x 20 cm) gepumpt. Durch die Mischapparatur wurde ein Polyacrylamidgradient hergestellt, welcher im unteren Teil der Kammer mit einer Konzentration von 18% beginnend nach oben hin kontinuierlich abnahm, bis eine Konzentration von 4% erreicht war. Die Kammer wurde vollständig gefüllt und abschließend mit einem Kamm der benötigten Taschenzahl versehen. Nach der Polymerisation des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 0,5x

TBE befüllt und das Gel ohne Proben 30 min äquilibriert (im Kühlraum bei 10 V/cm). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Beschwerelösung (1/4 Vol. Glycerin, 1 μ l Bromphenolblau) versetzt. Als Marker diente ein *High molecular weight* (HMW, Amersham) Längenstandard. Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum über 20-24 h bei einer Spannung von 10 V/cm. Vor dem Proteintransfer aus dem nativen Gel auf eine PVDF Membran wurde das Gel zunächst in modifiziertem Blotpuffer (+3% SDS, 5 mM DTT) für 30 min bei 55°C im Wasserbad äquilibriert. Dieser Schritt war notwendig, um die im Gel noch nativ vorliegenden Proteine und eventuell durch Luftsauerstoff ausgebildete Disulfidbindungen zu zerstören. Hierdurch sollte ein quantitativer Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran garantiert werden. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran transferiert und mittels Westernblot analysiert.

2.2.4.10. Western Blot

Der Western Blot stellt eine Methode dar, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine geeignete Trägermembran transferiert werden, auf der die Proteine spezifisch mittels Antikörpern oder anderen an das Zielprotein bindenden Reagenzien nachgewiesen werden. In dieser Arbeit erfolgte der Proteintransfer im *semi-dry*-Verfahren in einer horizontalen Blot-Apparatur. Die Proteine wandern dabei von der Kathode zur Anode, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die PVDF Membran binden. Für diesen Zweck wurden auf die Kathodenplatte der Blot-Kammer drei in Blotpuffer getränkte 3 mm Whatman-Filterpapiere aufgelegt, auf die dann das Gel und darüber die in Methanol aktivierte, mit dH₂O gespülte und in Blotpuffer äquilibrierte PVDF Membran geschichtet wurde. Der Stapel wurde daraufhin noch mit drei Lagen in Blotpuffer äquilibrierten Whatman-Filterpapieren bedeckt, bevor die Anodenplatte aufgelegt wurde. Der Proteintransfer erfolgte 1-2 h bei einer Stromdichte von 1 mA/cm².

Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei RT in 1x TBS mit 5% Milchpulver und 0,1% Tween-20 geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran von mindestens 1 h bei RT mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper. In Ausnahmefällen wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach mehrfachem Spülen in Waschpuffer (1x TBS, 0,05% Tween-20) wurde der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) zugegeben und die Membran darin eine Stunde bei RT geschwenkt. Es folgten erneut mehrere Waschschritte bevor eine einstündige Inkubation mit AP-konjugiertem Streptavidin (verdünnt in Blockierungslösung) erfolgte. Abschließend wurde die Membran wiederholt gewaschen, einmal mit AP-Puffer inkubiert und für 15 min bei RT in AP-Puffer äquilibriert. Der colorimetrische Nachweis von Alkalischer Phosphatase erfolgte durch Zugabe von BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) als chromogenes Substrat zusammen mit NBT (4-

Nitroblautetrazoliumchlorid). Das Enzym katalysiert dabei die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat um. Dieses wird durch NBT oxidiert und zum tiefblauen, unlöslichen Farbniederschlag Indigo dimerisiert. Die Reaktion wurde im Dunkeln durchgeführt und nach deutlicher Anfärbung der Proteinbanden durch mehrfaches Spülen in Wasser gestoppt. Die entwickelte Membran wurde anschließend getrocknet und digitalisiert.

2.2.5. Immunologische Methoden

2.2.5.1. Immunisierung und Antikörpergewinnung

Für die Antiserumgewinnung wurden NMRI-Mäuse mit 50-75 μg des jeweiligen rekombinanten Proteins, das zu gleichen Teilen mit *Freund's Adjuvant complete* versetzt wurde, in einem Volumen von 400 μl intraperitoneal verabreicht (*priming*). Im Abstand von 10-14 Tagen erfolgten zwei weitere Injektionen (*boost*) mit bis zu 50 μg des Antigens, welches im Verhältnis 1:1 mit *Freund's Adjuvant incomplete* vermischt wurde. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen das gesamte Blut durch Herzpunktion entnommen. Die Blutzellen wurden zentrifugiert (3.220xg, 5 min, 4°C) und das im Überstand befindliche Serum abgenommen. Dieses wurde zu gleichen Teilen mit Glycerin und 0,02% Natriumazid versetzt und bei -70°C gelagert. Die Qualität des Antiserums wurde mittels Western Blot überprüft.

2.2.5.2. Generierung von murinen Knochenmarksmakrophagen

Die Reifung von Makrophagen aus murinen Knochenmarks-Stammzellen ist durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart des Differenzierungsfaktors M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) möglich, der im Überstand der Fibroblasten-Zelllinie L929 in ausreichend hoher Konzentration enthalten ist. Für dessen Herstellung wurden die L929-Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und in IMDM-Vollmedium bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert, bis diese konfluent waren. Die Kultivierung wurde danach weitere 10-14 Tage fortgesetzt und der Überstand schließlich zehn Minuten bei 3.220xg und 4°C zentrifugiert. Nach einer Sterilfiltration des L929-Überstandes wurde dieser bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Präparation der Knochenmarks-Stammzellen wurden Femur und Tibia einer sechs bis zehn Wochen alten C57BL/6 Maus unter der Sterilbank entnommen, in 70% Ethanol desinfiziert, getrocknet und die Enden der Knochen entfernt. Die Zellen wurden mittels einer mit IMDM gefüllten Spritze aus den Knochen herausgespült. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (1.250xg, 10 min, 4°C), das Pellet in IMDM resuspendiert, die Zellen gezählt und auf eine Dichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in einer 6-Well-Zellkulturplatte (2 ml pro Vertiefung) bei 37°C und 9% CO₂-Gehalt kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurden weitere 2 ml Makrophagen-Kulturmedium zugegeben, an den Tagen 6 und 8 nach Präparation nochmals je 2 ml Medium durch frisches Kulturmedium

ersetzt. Die Knochenmarksmakrophagen (BMM) wurden am Tag 10 durch Ablösen mit einem *cell scraper* geerntet, pelletiert, in frischem IMDM aufgenommen und direkt für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.2.5.3. *In vitro* Infektionsversuche

Die *in vitro* Makrophageninfektion stellt eine etablierte Methode für Interaktionsstudien zwischen Leishmanien und Makrophagen dar. In dieser Arbeit wurden für die Infektionsstudien Knochenmarksmakrophagen verwendet.

Zur Adhäsion der Zellen wurden je 400 μ l BMM (1×10^6 Zellen/ml in IMDM) pro Vertiefung in einer *chamber slide* für 48 h bei 37°C und 9% CO₂ inkubiert. Für die Infektion wurden promastigote Leishmanien aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase verwendet und auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in komplementiertem M199 (pH 7,0) eingestellt. Nach Abnahme der Makrophagenüberstände wurden je 400 μ l der Leishmanien-Zellsuspension auf die Makrophagen gegeben (Infektionsverhältnis 1:10) und für 4 h bei 37°C und 9% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Kammern mehrmals mit vorgewärmtem PBS (pH 7,0) gespült, um nicht-phagozytierte Leishmanien zu entfernen. Nach erneuter Inkubation für 24 h bei 37°C in vorgewärmtem IMDM wurden die Zellen mehrmals mit PBS (pH 7,0) gewaschen, der Kammeraufsatz vom Objektträger entfernt, die Zellen getrocknet und anschließend für 4 min in Methanol fixiert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen und Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Für die Bestimmung der Infektionsrate und Parasitenlast wurden die DAPI Färbungen von fünf unabhängigen Infektionsexperimenten ausgezählt. Dafür wurden je 100-200 Makrophagen betrachtet, die entweder mit *L. major* 5ASKH Wildtyp oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert waren. Dabei wurde die Infektionsrate in Prozent infizierter Makrophagen dargestellt, die Parasitenlast wurde als die Anzahl von Parasiten pro infiziertem Makrophagen angegeben.

2.2.5.4. Passage von *L. major* in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Für eine *Passage* wurden Leishmanien aus der spät-stationären Wachstumsphase eingesetzt. Die gewünschte Zellzahl wurde sedimentiert (1.250g, 10 min, 4°C), zweimal mit kaltem PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^7 / 50 μ l PBS eingestellt. Die Leishmanien wurden subkutan in den rechten Hinterlauf einer BALB/c oder C57BL/6 Maus injiziert. Der Infektionsverlauf wurde über mehrere Wochen verfolgt und in Form von wöchentlicher Fußdickenmessung dokumentiert. Dabei wurde die Läsionsgröße in mm als Differenz der Fußdicke zwischen infiziertem und uninfiziertem Fuß definiert. Sobald die Läsionen ulzerierten, wurden die Mäuse getötet, um eine Superinfektion der Läsionen zu verhindern. Im Falle der frühen Konzentrationsbestimmung diverser Zytokine wurden die Mäuse bereits 17 Tage nach Infektion getötet.

2.2.5.5. Isolierung von Lymphknotenzellen

Zur Untersuchung einer frühen Zytokinantwort wurden 17 Tage nach Infektion die Lymphknoten infizierter BALB/c oder C57BL/6 Mäuse isoliert. Dazu wurden die drainierenden, poplietalen Lymphknoten unter der Sterilbank entnommen und mit Hilfe des Stempels einer 5 ml Spritze durch ein mit RPMI Medium getränktes Zellsieb gerieben, das anschließend mit 20 ml RPMI Medium durchgespült wurde. Nach Zentrifugation bei 450xg für 10 min bei 4°C wurden die Zellen gezählt und für die Pulsinfektionsversuche auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.5.6. Stimulation von Lymphknotenzellen mit L-Ag oder anti-CD3

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lymphknotenzellen von infizierten BALB/c oder C57BL/6 Mäusen *in vitro* stimuliert, um Effekte transgener P46-Parasiten auf die IFN γ und IL-4 Produktion zu untersuchen.

Dazu wurden 3×10^5 Lymphknotenzellen in jede Vertiefung einer 96-Well Zellkulturplatte pipettiert und in Triplikaten mit L-Ag (Verhältnis 1:10), anti-CD3 (3 $\mu\text{g/ml}$) oder ohne Stimulus als Negativ-Kontrolle bei 37°C und 5% CO $_2$ kultiviert. Nach 72-stündiger Inkubation wurden 150 μl Kulturüberstand für die Zytokin-ELISAs abgenommen.

2.2.5.7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISAs kann die Konzentration einzelner in Lösung befindlicher Proteine bestimmt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Sandwich-ELISAs dazu verwendet, die Konzentration von Zytokinen (IFN γ , IL-4) in Zellüberständen zu quantifizieren. Die Detektion beruht darauf, dass das Zytokin nach Bindung an einen immobilisierten Antikörper durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen wird. Dabei ermöglichen die Biotinylierung des Detektions-Antikörpers und die nachfolgende Inkubation mit Streptavidin-HRP-Konjugat eine Signalverstärkung.

96-Well-ELISA-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen *Capture*-Antikörper in *Coating*-Puffer beschichtet (50 $\mu\text{l/Well}$). Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation der Platten mit 1% BSA/PBS (150 $\mu\text{l/Well}$) bei 37°C abgesättigt. Es folgten vier Waschschritte mit Waschpuffer, bevor 50 μl der Zellüberstände zugegeben wurden. Für jede Probe wurden jeweils Doppel- oder Dreifachbestimmungen vorgenommen, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Um die Konzentration des Zytokins in der jeweiligen Probe ermitteln zu können, war es nötig, auf jeder Platte eine Verdünnungsreihe eines externen Standards mitzuführen (jeweils Doppelwerte). Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Vertiefungen der ELISA-Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit je 50 μl des biotinylierten Detektions-Antikörpers inkubiert (verdünnt in 0,1%

BSA/PBS). Die Platte wurde zwei Stunden bei RT geschwenkt und nach vier weiteren Waschvorgängen mit Waschpuffer wurde das Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben (1:200 in 0,1% BSA/PBS verdünnt). Biotin besitzt eine hohe Affinität zu Streptavidin, so dass sich nach 30 min stabile Komplexe bildeten. Die Detektion erfolgte nach viermaligem Waschen mit 100 μ l Farbsubstratlösung. Das enthaltene Tetramethylbenzidin wird durch die HRP, die proportional zu dem vorhandenen Zielmolekül im *Well* vorhanden war, in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Sobald die Standardreihe deutlich zu erkennen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l 2M H₂SO₄ pro *Well* gestoppt, was zu einem Farbumschlag zu Gelb führte. Daraufhin wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anhand des mitgeführten Standards die jeweilige Zytokin-Konzentration berechnet.

2.2.5.8. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine Methode, mit der sich Moleküle in Zellen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper mikroskopisch nachweisen lassen. Zusätzlich können DNA-haltige Kompartimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), der sich spezifisch an DNA anlagert, sichtbar gemacht werden.

Die auf Objektträger fixierten Zellen wurden zunächst 5 min in Waschlösung (PBS [pH 7,0], 0,01% Triton X-100) gewaschen und anschließend 15 min in Permeabilisierungslösung (50 mM NH₄Cl, PBS [pH 7,0], 0,1% Triton X-100) inkubiert. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen 20 min in Blockierungslösung (BL; 2% BSA in PBS, 0,1% Triton X-100) inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in BL). Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und DAPI (verdünnt in BL) für 1 h. Nach wiederholtem Waschen wurden die Präparate mit Mowiol (25% Glycerol, 0,1 M Tris-HCl [pH 8,5], 10% Mowiol 4-88) eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Nach Aushärten des Eindeckmediums wurden die Proben bei 100-facher Vergrößerung am Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica) bzw. konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Olympus) untersucht.

2.2.5.9. Immunelektronenmikroskopie

Für Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden logarithmische Promastigote und infizierte Makrophagen eingesetzt. 1×10^8 Leishmanien wurden sedimentiert (1.250g, 10 min, 4°C) und zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Die infizierten Makrophagen wurden vom Boden der Zellkulturplatten gelöst, sanft sedimentiert (450xg, 10 min, 4°C) und ebenfalls zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37°C in 100mM Natriumcacodylat-Puffer mit 1% Paraformaldehyd und 0,025% Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden durch ansteigende Ethanolkonzentration schrittweise dehydriert und in *LR-White*TM Resin mit einem Härtingsbeschleuniger

(London Resin Company, Berkshire, UK) eingebettet. Die Präparate wurden unter mikroskopischer Kontrolle aus dem LR White™ Resin-Block freigelegt, mit einem Histo-Diamanten (DIATOME) am Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung) angeschnitten und über Semi-Dünnschnitte analysiert. Nickel-Grids (200 mesh; 3,05 nm; Agar) wurden auf der matten Seite mit 0,6% Pioloform/Chloroform beschichtet. Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultra-45°-Diamanten (DIATOME) angefertigt und auf die matte, befilmte Seite der Grids überführt. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet. Die belegten Nickel-Grids wurden für 15 min in PBS gewaschen, für 1 h bei RT in 10% BSA/PBS blockiert und anschließend zunächst 1 h bei 37°C und dann bei 4°C über Nacht mit entsprechendem Erstantikörper (1:1000) bzw. naivem Mausserum (1:1000) inkubiert. Nach viermaligem Waschen in 0,1% BSA/PBS erfolgte die Inkubation mit einem Kaninchen anti-Maus Antikörper (1:1000) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die Proben für 1 h mit Protein-A-Gold (10 nm, 1:70) behandelt. Für die Kontrastierung wurden eine 1% wässrige Uranylacetatlösung und eine Bleicitratlösung verwendet (Reynolds, 1963). Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden am Transmissionselektronenmikroskop (FEI Tecnai) erstellt.

2.2.6. Datenverarbeitung

2.2.6.1. Datenbankanalyse

Zur Untersuchung von Genen und ihrer Genprodukte wurden die entsprechenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen *in silico* mit Hilfe diverser Programme, die im Internet auf dem *ExPasy Server* kostenlos zur Verfügung stehen, analysiert (<http://expasy.org/>). Hierbei wurde unter anderem das theoretische Molekulargewicht ermittelt, mögliche Signalpeptide oder Transmembrandomänen identifiziert und nach putativen Homologen in sämtlichen anderen Datenbanken mittels BLAST- (*Basic Local Alignment Search Tool*) gesucht. *Alignments* verschiedener Proteine wurden mit Hilfe der MacVector Software (Version 11.0.4) erstellt.

2.2.6.2. Bildbearbeitung

Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte SDS-Gele und Western Blots wurden mit einem Flachbettscanner (Scan Maker 8700, Microtek) digitalisiert. Die Agarosegele wurden unter UV-Ausleuchtung fotografiert. Die Infektionsversuche wurden mittels einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (Coolpix, Nikon) ausgewertet. Die digitalen Aufnahmen vom Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica) und konfokalen Mikroskop (Olympus) wurden mit Hilfe der Software Openlab 5.0 bzw. FluoView 1000 aufgenommen. Zur Bearbeitung der digitalen Bilder wurde die Software Adobe Photoshop CS4 eingesetzt, die Beschriftung der Abbildungen erfolgte unter Verwendung der Software Intaglio 3.0.1.

2.2.6.3. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, San Diego, U.S.A.). Für die Signifikanz-Berechnungen wurde der Mann-Whitney-U-Test (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi>) angewendet.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit wird die Identifizierung und Charakterisierung des putativen Komplementations- bzw. Kompensationsfaktors P46 aus *L. major* beschrieben. Der zweite Teil ist der Untersuchung des Peptidasekomplexes HslVU von *L. donovani* gewidmet.

3.1. Charakterisierung eines Virulenzfaktors aus *L. major*

In Vorarbeiten wurde durch *functional cloning* ein Gen identifiziert, das bei Überexpression in einer *L. major hsp100^{-/-}* Mutante deren avirulenten Phänotyp aufhebt. Dieser vorläufig identifizierte ORF4 des pcosA13 Cosmids sollte in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Neben einer umfassenden Datenbankrecherche und anschließender Klonierung des Gens, wurden Infektionsstudien, proteinbiochemische und immunologische Analysen, sowie molekularbiologische Methoden in die Untersuchung des Genprodukts mit einbezogen.

3.1.1. Datenbankanalyse des P46 (LmjF33.3060)

Um erste Hinweise auf die Funktion des vom ORF4 exprimierten P46 Proteins zu erhalten, wurden umfangreiche Datenbankanalysen durchgeführt. Dafür wurden sowohl die Nukleotidsequenz als auch die Aminosäuresequenz des Proteins in BLAST-Suchen und verschiedenen Peptid-Motif-Suchen eingesetzt. Die Aminosäuresequenz des P46 beinhaltet jedoch keine bekannten funktionellen Motive, Domänen oder Signalsequenzen. Ebenso wurden keine verwandten Gene oder Proteine in verfügbaren Datenbanken aller Spezies gefunden. Als einziges Homolog wurde ein partiell konserviertes putatives P46 Gen in *L. infantum* identifiziert. Im Vergleich zum *L. major P46* beinhaltet die Nukleotidsequenz des *L. infantum* nur einen kleinen ORF, der weniger als 40% der *L. major* Aminosäuresequenz repräsentiert. Für Leishmanien, die normalerweise mehr als 90% DNA-Sequenzkonservierung aufweisen (Peacock et al., 2007), ist dies ein extrem niedriger Wert. Eine ähnlich unvollständige Konservierung zeigt die orthologe Region des P46 Proteins in der vorläufigen Genom-Datenbank von *L. mexicana mexicana*. In der korrespondierenden Region des *L. braziliensis* Genoms konnte hingegen kein echter ORF gefunden werden, obwohl die Datenbanken nach BLAST-Suche einen Bereich auf Chromosom 33 angeben. Hierbei handelt es sich jedoch maximal um Überreste eines Gens, da dessen Sequenz zahlreiche Stop-Codons enthält. Somit kommt das P46 Protein offenbar ausschließlich in *L. major* vor. In Abbildung 7 ist ein *ClustalW Alignment* der P46 Peptidsequenzen von *L. major* (LmjF33.3060), *L. infantum* (LinJ33_V3.3220), *L. braziliensis* (LbrM33_V2.3340) und *L. mexicana mexicana* (LmxM32.3060) dargestellt. Hervorgehoben sind vor allem die zahlreichen Stop-Codons.

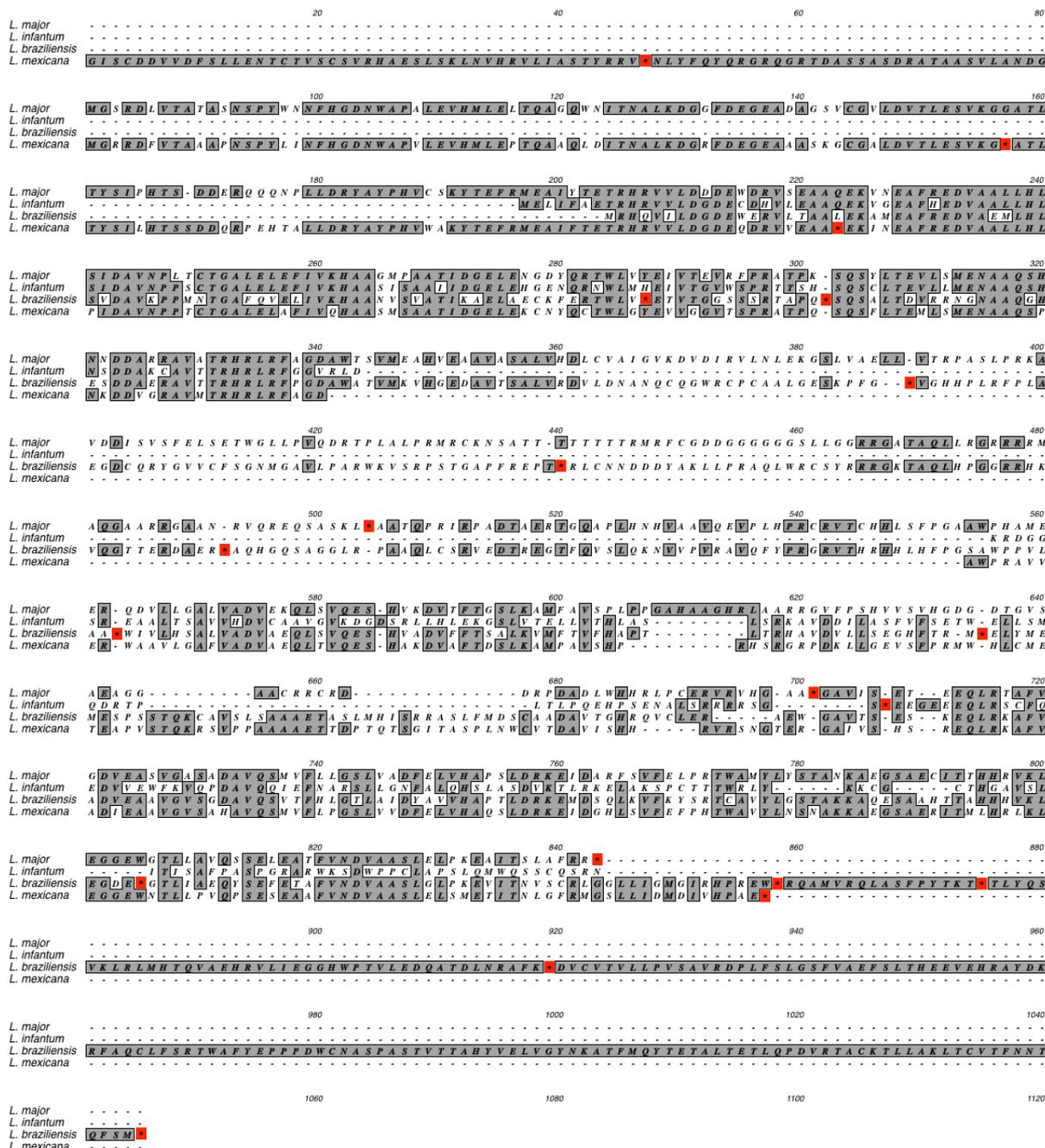


Abb. 7: Peptidsequenzvergleich des P46 innerhalb der *Leishmania* Spezies

Das Sequenz-alignment (ClustalW, MacVector) zeigt jeweils die gesamte P46 Peptidsequenz inklusive aller Stop-Codons, die in den Datenbanken für die Stämme *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* und *L. mexicana mexicana* angegeben ist. Konservierte Aminosäuren sind durch graue Kästen hinterlegt, Stop-Codons sind als * in rot hinterlegten Kästen dargestellt.

3.1.2. Klonierung und Transfektion des pcosP46

Um zu verifizieren, dass P46 tatsächlich zur Wiederherstellung der Virulenz der *hsp100*-Mutante in der Lage ist, sollte P46 in einem geeigneten Vektor in *L. major* zur Expression gebracht werden. Die Komplementationsanalyse, bei der das P46 Gen identifiziert wurde, war mit dem *cosmid shuttle* Vektor pcosTL durchgeführt worden. Dieser ist für die

Einbringung großer DNA Fragmente in *L. donovani* konstruiert worden (Kelly et al., 1994) und ist zudem als Komplementationsvektor für Mauspassagen etabliert (Hoyer et al., 2001, Krobtsch et al., 1998). Aus diesem Grund wurde der pcosTL Vektor zur Klonierung des P46 ORF eingesetzt. Besonderes Augenmerk lag darauf, das P46 Gen samt seiner 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen in den Vektor zu ligieren, um eine möglichst natürliche Transkription des Proteins zu gewährleisten.

Hierzu wurde das P46 Gen inklusive flankierender Sequenzen mit den spezifischen Oligonukleotiden P46-5'*Xba*1 und P46-3'*Xba*1 durch PCR amplifiziert und anschließend in die *Xba*1 Schnittstelle des pBluescriptII-SK+ Vektors integriert. Dieser Vektor diente zur Subklonierung des ca. 4.200 bp großen Fragments, da eine direkte Integration von größeren PCR-Produkten in den sehr großen pcosTL Vektor schwierig ist. Das entstandene pBS-P46 Plasmid wurde mittels analytischem Restriktionsverdau und Ansequenzierung der integrierten Bereiche auf korrekten Einbau überprüft und nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *Not*1 und *Xba*1 zwischen die entsprechenden Schnittstellen im pcosTL Vektor ligiert. Nach Verifizierung des pcosP46 durch analytische Restriktion wurde das Plasmid in die Stämme *L. major* 5ASKH Wildtyp, *L. major* 5ASKH *hsp100*^{-/-} und *L. major* FEBNI Wildtyp transfiziert. Nach ca. 2 Wochen unter G418 Selektion wurden die rekombinanten Leishmanien in Aliquots kryogenisch eingefroren und standen so für weitere Experimente zur Verfügung.

3.1.3. Vergleich des P46 mRNA Levels verschiedener Mutanten

Die *real-time* RT-PCR ist eine Kombination aus reverser Transkription von mRNA und nachfolgender *real-time* PCR der cDNA, die die relative Quantifizierung der eingesetzten mRNA ermöglicht. Mit dieser Methode konnte das relative Transkriptionsniveau der P46-RNA verschiedener *Leishmania* Mutanten bezogen auf den Wildtyp untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst das P46 mRNA Level von *L. major hsp100*^{-/-}, *L. major hsp100*^{-/-} [pcosP46], *L. major* 5ASKH Wildtyp und *L. major* 5ASKH [pcosP46] verglichen. Die Ergebnisse in Abbildung 8 sind als Vielfaches des *L. major* 5ASKH Wildtyp dargestellt. Im Vergleich zum *L. major hsp100*^{-/-} weist der *L. major hsp100*^{-/-} [pcosP46] eine 25-fach verstärkte Transkription auf. Das mRNA Level des *L. major* 5ASKH [pcosP46] ist hingegen nur 7-fach erhöht verglichen zum *L. major* 5ASKH Wildtyp (Abb. 8A). Dies lässt vermuten, dass in der *hsp100*^{-/-} Mutante ein größerer Bedarf für die P46-Expression besteht.

Um mögliche stammspezifische Unterschiede in der Transkription der P46 mRNA zu verifizieren, wurde ebenfalls eine P46 spezifische *real-time* RT-PCR auf Basis verschiedener *L. major* Wildtypstämme durchgeführt. Dabei konnte auf P46 mRNA-Niveau kein Unterschied zwischen *L. major* 5ASKH, *L. major* FEBNI und *L. major* FRIEDLIN

festgestellt werden (Abb. 8B). Somit scheint die Transkription von P46 in *L. major*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft nicht zu variieren.

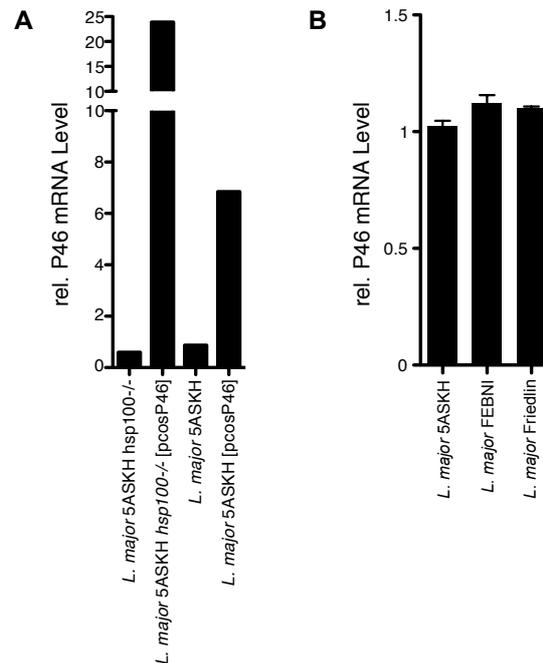


Abb. 8: Messung der mRNA Level verschiedener P46-Mutanten und *L. major* WT Stämme

Das relative P46-spezifische mRNA Level wurde durch *real-time* RT-PCR bestimmt. Die mRNA aus 3×10^7 Promastigoten von (A) *L. major* 5ASKH *hsp100*^{-/-}, *L. major* 5ASKH *hsp100*^{-/-} [pcosP46], *L. major* 5ASKH und *L. major* 5ASKH [pcosP46] bzw. (B) *L. major* 5ASKH, *L. major* FEBNI und *L. major* FRIEDLIN wurde isoliert, in cDNA umgewandelt und mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide in einer semi-quantitativen *real-time* RT-PCR amplifiziert. Die Ergebnisse sind als ein Vielfaches des *L. major* 5ASKH Expressionslevels angegeben. Als Referenzgen diente die Amplifizierung von Aktin. Die Experimente wurden in Duplikaten (A) bzw. Quadruplikaten (B) durchgeführt.

3.1.4. *In vivo* Studien der P46 Überexpression und deren Immunantwort

3.1.4.1. BALB/c Mauspassage

Linda Reiling konnte durch Komplementationsanalyse in der avirulenten *L. major hsp100*^{-/-} Mutante ein Cosmid selektieren, das die Virulenz dieser Parasiten wieder herstellte. Ob das auf dem pcosA13 Cosmid vorläufig identifizierte P46 Gen tatsächlich für die Aufhebung des Phänotyps der *hsp100*^{-/-} Mutante verantwortlich ist, sollte in weiteren Erregerpassagen untersucht werden. Dafür wurden BALB/c Mäuse mit *L. major hsp100*^{-/-} bzw. *L. major hsp100*^{-/-} [pcosP46] infiziert. Nachfolgend wurde der Infektionsverlauf anhand der Fußschwellung über mehrere Wochen verfolgt.

Tatsächlich führte die P46-Expression in *L. major hsp100*^{-/-} zur Wiederherstellung der Virulenz (Abb. 9A). Etwa 7 Wochen nach Infektion traten bei den mit *L. major hsp100*^{-/-} [pcosP46] infizierten Mäusen Fußschwellungen auf, die bis zum Versuchsende einen

Durchmesser von 3,5 mm erreichten. Erwartungsgemäß konnte in BALB/c Mäusen, die mit *L. major hsp100*^{-/-} infiziert wurden, keine Fußschwellung beobachtet werden. Eine Ausnahme bildete eine von fünf Mäusen, die nach neun Wochen eine beginnende Läsion an der Infektionsstelle aufwies. Hierbei könnte es sich um eine spontane Reversion des Phänotyps handeln, wie sie bereits früher beobachtet wurde (Reiling et al., 2006). Somit konnte gezeigt werden, dass der vorläufig identifizierte ORF4, der für P46 kodiert, tatsächlich für die Wiederherstellung der Virulenz des *L. major hsp100*^{-/-} verantwortlich ist.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob P46 das fehlende Hsp100 Gen komplementiert, oder allgemein die Virulenz steigert. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde P46 im *L. major* 5ASKH Wildtyp zur Überexpression gebracht. Anschließend erfolgten BALB/c Mauspassagen mit dem *L. major* 5ASKH Wildtyp bzw. dem *L. major* 5ASKH [pcosP46]. Abbildung 9B zeigt, dass P46 signifikante Effekte auch auf die Virulenz des Wildtyps hat. Während sowohl der *L. major* Wildtyp als auch der *L. major* 5ASKH [pcosP46] innerhalb von 3 Wochen eine Läsion in den Mäusen hervorriefen, rief die Infektion mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] eine wesentlich stärkere Läsion hervor (Abb. 9B). Auffallend war, dass trotz einer Läsionsgröße von bis zu 4 mm keine bei dieser Fußdicke sonst üblichen Ulzerationen auftraten.

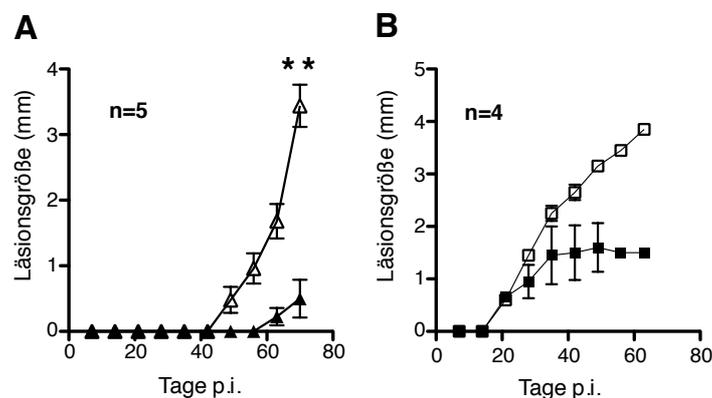


Abb. 9: BALB/c Mausinfektion mit P46-überexprimierenden Leishmanien.

(A) 1×10^7 spät-stationäre *L. major* 5ASKH *hsp100*^{-/-} (▲) oder *L. major* 5ASKH *hsp100*^{-/-} [pcosP46] (△) wurden in den Hinterlauf von BALB/c Mäusen (n=5) inokuliert. Die Fußschwellung wurde in wöchentlichen Intervallen gemessen. (B) BALB/c Mäuse (n=4) wurden mit 1×10^7 spät-stationären *L. major* 5ASKH (■) oder mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert (□). Die Fußschwellung wurde wöchentlich aufgezeichnet. Die Werte sind als Mittelwerte (\pm SEM) angegeben; **: $P \leq 0,01$.

Die Ergebnisse dieser BALB/c Mauspassage zeigen deutlich, dass P46 nicht nur das Fehlen des Hsp100 in den *hsp100*^{-/-} Parasiten kompensiert, sondern zudem die Virulenz des *L. major* 5ASKH Wildtyp signifikant steigert. Somit komplementiert P46 nicht die *hsp100*^{-/-} Mutante, sondern ist ein allgemeiner Virulenzfaktor.

3.1.4.2. Zytokinantwort im BALB/c Mausmodell

Da für die Entstehung einer Läsion das vorherrschende Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle spielt, sollte im Folgenden untersucht werden, wie das P46 die IL-4 und IFN γ Produktion der infizierten BALB/c Mäuse beeinflusst. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, entwickeln BALB/c Mäuse nach Infektion mit *L. major* üblicherweise eine IL-4 gestützte T_H2-Immunantwort. Zur Untersuchung der frühen Zytokinantwort in den drainierenden Lymphknoten der Mäuse wurden BALB/c Mäuse mit *L. major* 5ASKH Wildtyp bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Nach 17 Tagen wurden die poplietalen Lymphknoten entnommen, die Zellen über ein Zellsieb gerieben, aufgereinigt und gezählt. Dabei wiesen die Lymphknoten der mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infizierten BALB/c Mäuse eine signifikant ($P = 0,007$; *two-tailed* U-test) erhöhte Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 10A).

Die Zellen wurden für 72 h mit Medium (Negativ-Kontrolle), *L*-Ag oder anti-CD3 stimuliert und die Medium-Überstände anschließend auf IFN γ und IL-4 Produktion untersucht. Nur die anti-CD3 Stimulation zeigte eine signifikante ($P = 0,012$; *two-tailed* U-test) Induktion der IFN γ Produktion, während nach Stimulation mit *L*-Ag kaum IFN γ produziert wurde (Abb. 10B). Auch das Zytokin IL-4 konnte nur mit anti-CD3 stimuliert werden (Abb. 10C). Dabei war die Produktion in den Lymphknoten nach Infektion mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] signifikant erhöht ($P = 0,008$; *two-tailed* U-test). Insgesamt kam es zu einer sehr schwachen IL-4 Immunantwort.

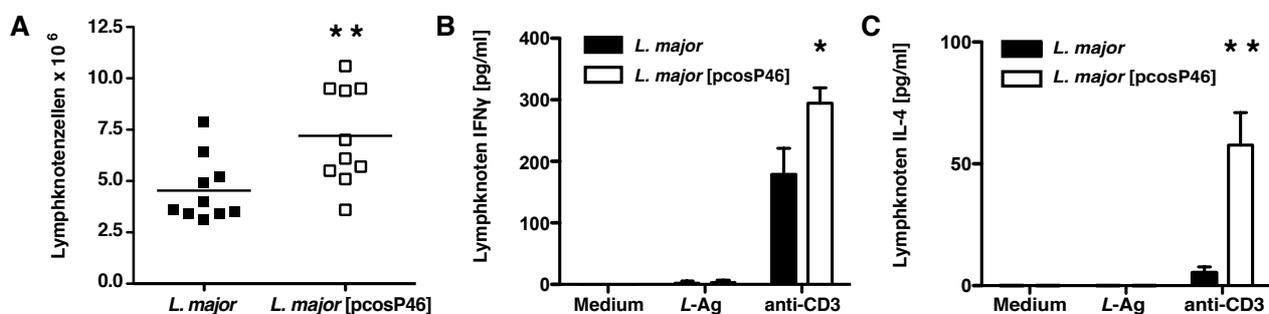


Abb. 10: Immunantwort in BALB/c Mäusen nach Infektion mit *L. major* 5ASKH bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46]

BALB/c Mäuse wurden mit 1×10^7 spät-stationären *L. major* 5ASKH oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Nach 17 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert. Die Lymphknotenzellen wurden gezählt (A) und in Triplikaten von je 3×10^5 Zellen mit anti-CD3 oder *L*-Ag stimuliert. Nach 72 h Kultivierung wurden die Überstände gesammelt und IFN γ (B) bzw. IL-4 (C) im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind das Ergebnis eines Experiments mit 10 Mäusen pro Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte (\pm SEM) angegeben; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$.

Somit kann festgehalten werden, dass es in BALB/c Mäusen nach Infektion mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] nicht zu einer Veränderung des Zytokinmilieus im Vergleich zum *L.*

major 5ASKH Wildtyp kommt. Es tritt lediglich eine leichte Erhöhung der Produktion von IFN γ und IL-4 auf, die allerdings nur mit anti-CD3 Stimulation beobachtet werden konnte.

3.1.4.3. P46 Überexpression im C57BL/6 Mausmodell

Der *L. major* 5ASKH [pcosP46] zeigte einen deutlichen Virulenz-steigernden Effekt im BALB/c Mausmodell. Daher stellte sich die Frage, ob die Wirkung von P46 auch in den *L. major*-resistenten C57BL/6 Mäusen zu beobachten ist. In diesen Mäusen sind die durch *L. major* 5ASKH induzierten Läsionen üblicherweise sehr schwach und die Infektion heilt binnen weniger Wochen aus.

C57BL/6 Mäuse wurden mit *L. major* 5ASKH Wildtyp bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Die Fußschwellungen wurden über einen Zeitraum von 15 Wochen beobachtet. Fünf Wochen nach Infektion entwickelten die Mäuse eine Läsion an der Infektionsstelle. Diese heilte binnen einer Woche in den Mäusen ab, die mit *L. major* 5ASKH infiziert waren (Abb. 11). Die mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infizierten Mäuse zeigten eine starke und anhaltende Schwellung, die sich bis zu einem Durchmesser von 2,5 mm entwickelte. Nach etwa 100 Tagen kam es zu einem Abschwellen der Läsion. Zusätzlich wurden nach 70 Tagen histologische Schnitte der Infektionsstellen angefertigt. Nach Infektion mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] konnten amastigote Leishmanien im infizierten Gewebe nachgewiesen werden (M. Krömer, unveröffentlichte Daten). Dies war nicht der Fall für Schnitte, die nach *L. major* 5ASKH Infektion hergestellt wurden. Somit geht die Schwellung der Infektionsstelle mit der Anwesenheit von Parasiten einher.

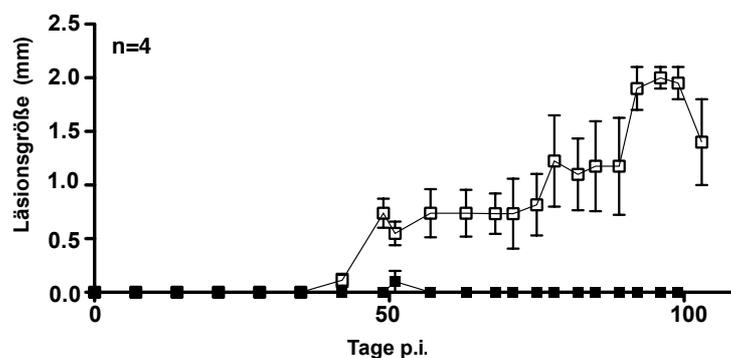


Abb. 11: C57BL/6 Mauspassage mit *L. major* 5ASKH bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46]

C57BL/6 Mäuse (n=4) wurden entweder mit 1×10^7 spät-stationären *L. major* 5ASKH (■) oder mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert (□). Die Fußschwellung wurde über einen Zeitraum von 110 Tagen gemessen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Infektion mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] zu einer starken und persistenten Läsion in den C57BL/6 Mäusen führt. Die Mäuse sind jedoch in der Lage, die Infektion letztlich zu kontrollieren. Dennoch ist der

L. major 5ASKH [pcosP46] offenbar in der Lage, die schützende Immunantwort der C57BL/6 Mäuse in der frühen Infektionsphase zu umgehen.

3.1.4.4. Zytokinantwort in der C57BL/6 Maus

Die Resistenz gegenüber einer *L. major* Infektion in C57BL/6 Mäusen ist normalerweise durch eine frühe T_H1 -Immunantwort gekennzeichnet. Wie bereits erwähnt, sind hierfür die Zytokine IFN γ , TNF α sowie IL-12 verantwortlich. Zudem kommt es zu einer Unterdrückung der IL-4 Synthese. Die starken Läsionen während der Infektion der C57BL/6 Mäuse mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] legen die Vermutung nahe, dass es zu einer veränderten Balance zwischen T_H1 - und T_H2 -Immunantwort in der frühen Infektionsphase kommt.

Um dies zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit *L. major* 5ASKH Wildtyp oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Nach 17 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen und die darin enthaltenen Zellen gezählt. Dabei wiesen die mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infizierten Mäuse eine signifikant höhere Zellzahl in den Lymphknoten auf ($P = 0,0006$), als die mit *L. major* 5ASKH infizierten Mäuse (Abb. 12A). Es kommt somit nach Infektion mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] zu einem vermehrten Influx von Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten.

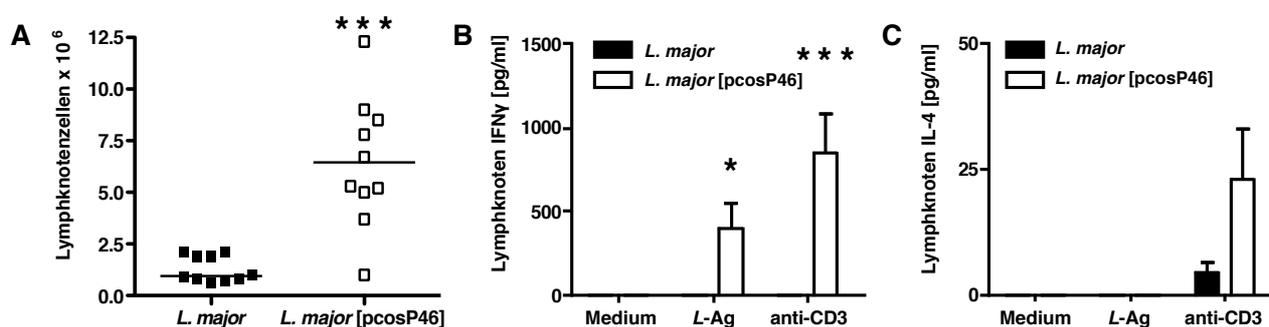


Abb. 12: Immunantwort in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *L. major* 5ASKH bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46]

C57BL/6 Mäuse wurden mit *L. major* 5ASKH oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Nach 17 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert. Die Lymphknotenzellen wurden gezählt (**A**) und in Triplikaten von je 3×10^5 Zellen mit anti-CD3 oder L-Ag stimuliert. Nach 72 h Kultivierung wurden die Überstände gesammelt und IFN γ (**B**) bzw. IL-4 (**C**) im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten mit 10 Mäusen pro Gruppe ist dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte (\pm SEM) angegeben. *: $P \leq 0,05$; ***: $P \leq 0,001$

Nach 72-stündiger Inkubation der Lymphknotenzellen mit L-Ag oder anti-CD3 wurden die gesammelten Mediumüberstände auf IFN γ und IL-4 untersucht. Die Infektion mit *L. major* 5ASKH führte erwartungsgemäß nicht zur IFN γ Induktion in den Lymphknoten (Abb. 12B). Im Gegensatz dazu induziert der *L. major* 5ASKH [pcosP46] eine starke IFN γ Produktion. Diese war nach Stimulation mit dem L-Ag signifikant erhöht ($P = 0,0233$) im Vergleich zur

Infektion mit dem Wildtyp. Noch deutlicher ist dieser Effekt nach Inkubation mit anti-CD3 ($P = 0,0007$). Die IL-4 Produktion konnte im Vergleich zur Infektion mit dem *L. major* 5ASKH nur schwach durch anti-CD3 induziert werden (Abb. 12C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass C57BL/6 Mäuse nach Infektion mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] eine verstärkte T_H1 -Immunantwort induzieren. Die Parasiten unterdrücken demnach nicht die vorherrschende T_H1 -Immunantwort, sondern scheinen resistent gegenüber T_H1 -Zytokinen wie IFN γ zu sein.

3.1.4.5. C57BL/6 Mauspassage mit *L. major* FEBNI

Um zu untersuchen, ob die Überexpression des P46 in einem anderen *L. major* Stamm ähnliche Effekte auf dessen Virulenz und Zytokinmilieu hat, wurde der *L. major* FEBNI Stamm mit dem pcosP46 transfiziert. *L. major* FEBNI ist im C57BL/6 Mausmodell deutlich virulenter als *L. major* 5ASKH und ruft eine stärkere T_H1 -Immunantwort hervor.

C57BL/6 Mäuse wurden mit *L. major* FEBNI bzw. *L. major* FEBNI [pcosP46] infiziert. Nach etwa 20 Tagen traten bereits Läsionen an der Infektionsstelle auf. Dies veranschaulicht deutlich die verstärkte Virulenz des *L. major* FEBNI. Der Infektionsverlauf in Abbildung 13 zeigt, dass die mit *L. major* FEBNI [pcosP46] infizierten Mäuse stärkere Läsionen aufwiesen als der Wildtyp. Allerdings konnte aufgrund der geringen Kohortengröße keine Aussage über die Signifikanz zwischen *L. major* FEBNI und *L. major* FEBNI [pcosP46] Infektion getroffen werden. Nach 40 Tagen waren die Mäuse in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. Es kam zu einer Abschwächung der Läsion und zum Ausheilen der Füße. Aufgrund der insgesamt höheren Virulenz des *L. major* FEBNI Stammes war durch Überexpression des P46 in diesen Parasiten nur eine leichte Erhöhung der Virulenz zu beobachten.

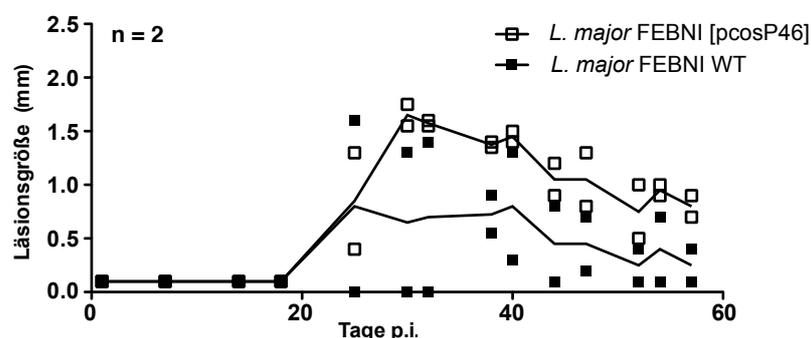


Abb. 13: C57BL/6 Mauspassage mit *L. major* FEBNI und *L. major* FEBNI [pcosP46]

C57BL/6 Mäuse ($n=2$) wurden mit *L. major* FEBNI (■) bzw. mit *L. major* FEBNI [pcosP46] infiziert (□). Die Fußschwellung wurde über einen Zeitraum von 60 Tagen verfolgt. Dargestellt sind sowohl die gemessenen Einzelwerte für die Fußschwellungen, als auch der Median für jeden *L. major* Stamm (schwarze Linie)

3.1.4.6. Zytokinantwort in C57BL/6 Maus nach *L. major* FEBNI Infektion

Für die Untersuchung der vorherrschenden Immunantwort in den mit *L. major* FEBNI bzw. *L. major* FEBNI [pcosP46] infizierten C57BL/6 Mäusen wurden die drainierenden Lymphknoten, wie in 3.1.4.2. bzw. 3.1.4.4. beschrieben, isoliert. Interessanterweise zeigte hier die Infektion mit dem Wildtyp eine signifikant ($P = 0,02$) erhöhte Zellzahl im Lymphknoten (Abb. 14A). Anschließend wurden die Zellen mit *L*-Ag bzw. anti-CD3 inkubiert und die Zellkulturüberstände nach 72 h abgenommen. Die Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA ergab keine Unterschiede im IFN γ Niveau zwischen den beiden *Leishmania* Stämmen (Abb. 14B). Im Gegensatz dazu kommt es nach anti-CD3 Stimulation bei Lymphknotenzellen, die nach Infektion mit *L. major* FEBNI [pcosP46] isoliert wurden, zu einer leichten Erhöhung der IL-4 Produktion (Abb. 14C; $P = 0,02$). Insgesamt ist die IL-4 Produktion jedoch sehr schwach.

Zusammenfassend können jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinexpression festgestellt werden. Auffallend ist die insgesamt starke IFN γ Produktion der Lymphknotenzellen nach Stimulation mit anti-CD3 (Vgl. Abb. 12B und 14B). Dies ist ein weiterer Hinweis für die höhere Virulenz des *L. major* FEBNI im Vergleich zum *L. major* 5ASKH.

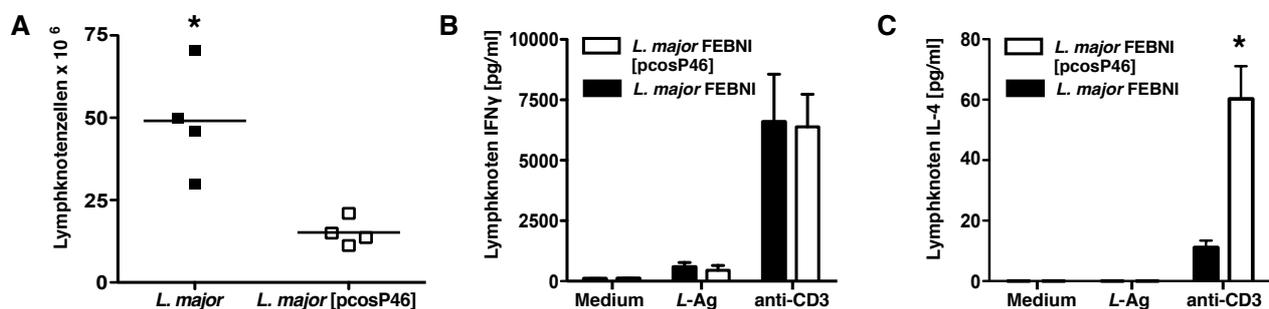


Abb. 14: Immunantwort in C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *L. major* FEBNI bzw. *L. major* FEBNI [pcosP46]

C57BL/6 Mäuse wurden mit 1×10^7 spät-stationären *L. major* FEBNI oder *L. major* FEBNI [pcosP46] infiziert. Nach 17 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert. Die Lymphknotenzellen wurden gezählt (A) und in Triplikaten von je 3×10^5 Zellen mit anti-CD3 oder *L*-Ag stimuliert. Nach 72 h Kultivierung wurden die Überstände gesammelt und IFN γ (B) bzw. IL-4 (C) im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind das Ergebnis eines Experiments mit 2 Mäusen pro Gruppe. Die Werte sind als Mittelwerte (\pm SEM) angegeben. *: $P \leq 0,05$.

Abschließend kann aus den Infektionsstudien geschlossen werden, dass sich die Zytokinexpression in den Mäusen als Folge der Überexpression des P46 in *L. major* nicht ändert. Vielmehr kommt es zu einem erhöhten Vorkommen von Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten und einer verstärkten T_H1-Immunantwort. Diese Ergebnisse

deuten darauf hin, dass P46 stromabwärts der Zytokinantwort gegen die Effektormechanismen des Makrophagen schützt.

3.1.5. Herstellung eines spezifischen Antiserums

3.1.5.1. Klonierung des pJC45 Expressionsvektors

Für die weitere Charakterisierung und den Nachweis des P46 Proteins in *L. major* ist die Herstellung eines spezifischen Antiserums von großer Bedeutung. Dafür kam das prokaryotische T7 RNA-Polymerase Expressionssystem (Studier et al., 1990) zur Anwendung, das eine effiziente Transkription von Genen unter der Kontrolle des T7-Promotors gewährleistet. Da für die Immunisierung große Mengen rekombinanten Proteins benötigt werden, ist von Vorteil, dass die T7 RNA-Polymerase eine fünffach höhere Elongationsrate als die *E. coli* RNA-Polymerase aufweist. Zur Herstellung des Expressionskonstrukts diente der Vektor pJC45 (Schlüter et al., 2000), der ein (His)₁₀-tag am N-Terminus des rekombinanten Proteins kodiert und so eine Reinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Der offene Leserahmen (ORF) des P46 wurde mit spezifischen Oligonukleotiden, die in 2.1.6. aufgelistet sind, mittels PCR amplifiziert, mit *Nde*I und *Eco*R1 geschnitten, und zwischen die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pJC45 ligiert. Anschließend wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung der korrekte Einbau des ORF überprüft. Es ist zu erwähnen, dass zur Zeit der Klonierung dieses Konstruktes der P46 ORF trotz eines offensichtlichen Stop-Codons in der Sequenz als ein 78 kDa Protein in der Datenbank annotiert war. Daher wurde in dieser Arbeit der verlängerte ORF des P46 in den pJC45 eingefügt. Es zeigte sich jedoch, dass an der angegebenen Stelle tatsächlich ein Stop-Codon vorliegt.

3.1.5.2. Antikörper Herstellung und Western Blot Analysen

Der Expressionsvektor pJC45-P46 wurde zunächst in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) [pAP/*lacI*^Q] transformiert. Die Transkription wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinexpression vor und nach IPTG Zugabe durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (Abb. 15, Spalte A). Der als Negativ-Kontrolle eingesetzte „leere“ pJC45-Vektor zeigte im SDS-Gel vor und nach Induktion identische Proteinmuster (nicht dargestellt), während in den Proben des pJC45-P46 Expressionsvektors nach Induktion (+IPTG) eine deutliche Überexpression des rekombinanten P46 zu erkennen war (Abb. 15, Spalte A). Das Protein wies das erwartete Molekulargewicht von 48 kDa (46 kDa plus (His)₁₀-tag) auf. Das rekombinante P46 Protein wurde, wie unter 2.2.4.2. beschrieben, extrahiert und durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach erfolgter Dialyse konnte das aufgereinigte und aufkonzentrierte rekombinante P46 (Abb. 15, Spalte B) für die Immunisierung von NMRI-Mäusen

verwendet werden. Nach Immunisierung und Boosterung wurde das gewonnene Antiserum im Western Blot auf seine Spezifität untersucht. Dafür wurden 500 ng rekombinantes P46 Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und in nachfolgendem Western Blot mit anti-P46 Serum nachgewiesen (Abb. 15, Spalte C). Im Gegensatz zum rekombinanten Protein war es trotz verschiedener Konzentrationen von *L. major* 5ASKH Lysat bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] Lysat nicht möglich, das endogene Protein nachzuweisen. Auch die Verwendung eines biotinylierten sekundären Antikörpers zur Signalverstärkung und eine verlängerte Inkubationszeit des primären Antikörpers über Nacht zeigten keine Wirkung.

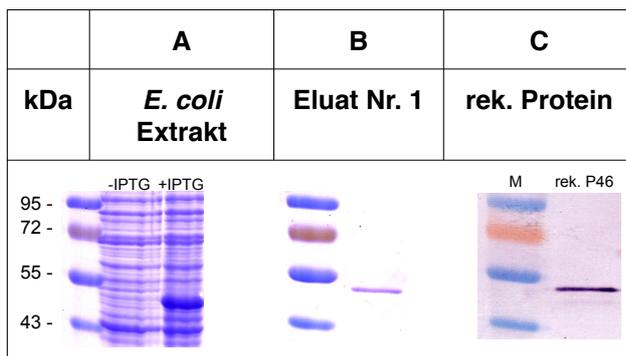


Abb. 15: Herstellung des P46 Antigens und Verifizierung des Serums

Spalte **A** zeigt einen Ausschnitt eines mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten 10%igen SDS-Gels, in dem mit pJC45-P46 transformiertes *E.coli* Zellextrakt vor und nach Zugabe von IPTG aufgetrennt wurde. Das aufgereinigte Eluat ist in Spalte **B** dargestellt. Spalte **C** zeigt einen Western Blot gegen rekombinantes P46. Als Marker (M) diente der *prestained* PageRuler (Fermentas).

3.1.6. Verifizierung des nativen Laufverhaltens von P46

Eine native Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese sollte Hinweise auf die biologisch relevante Konformation des Proteins liefern. Promastigote *L. major* 5ASKH bzw. *L. major* [pcosP46] wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen lysiert und die nativen Proteine in einem 4-18%igen Polyacrylamid-Gradienten-Gel bis zu ihrer Ausschlussgrenze aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF Membran. Die Proteine wurden mit dem P46-spezifischen Antiserum bzw. mit naivem Mausserum markiert (Abb. 16).

Das polyklonale P46 Antiserum markiert in beiden Proteinlysaten eine definierte Bande bei ca. 300 kDa (Abb. 16, Bahn 3, 4). Darüber hinaus tritt eine zweite Bande weit über der 669 kDa Markerbande auf, so dass die Größe nur auf 800-900 kDa geschätzt werden kann. Die mit naivem Mausserum behandelte Kontrolle (Abb. 16, Bahn 1, 2) weist keine Reaktion mit den Zelllysaten auf. Daraus ergibt sich, dass P46 in *L. major* in definierten Komplexen von 300 kDa und 800-900 kDa vorkommt. Ausserdem erkennt das Antiserum nach der nativen Elektrophorese effizient das P46 Antigen.

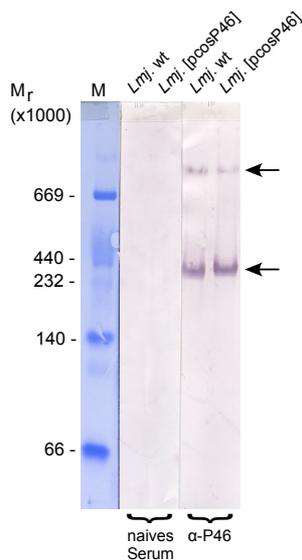


Abb. 16: Native Gradienten-Gelelektrophorese und Westernblot

2×10^7 *L. major* 5ASKH Promastigote oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert und die Lysate in einer 4-18%igen Gradienten Gelelektrophorese bis zum Erreichen ihres Äquilibrium aufgetrennt. Anschließend wurden die nativen Proteinkomplexe denaturiert, reduziert und auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde mit naivem Mause Serum bzw. mit anti-P46 Serum (α -P46) inkubiert. Die Spur des HMW Markers (M) wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Position der Markerproteine ist links angegeben. Die Pfeile zeigen auf die P46-spezifischen Banden.

3.1.7. Lokalisation des P46 in promastigoten *L. major* 5ASKH

Es ist bekannt, dass Oberflächenmoleküle von *L. major* eine wichtige Rolle bezüglich der Infektiosität des Parasiten spielen. Um zu untersuchen, ob das P46 möglicherweise auch auf der Oberfläche der Parasiten zu finden ist, sollte zunächst die Lokalisation des Proteins in den Promastigoten bestimmt werden. Hierfür wurden logarithmisch wachsende *L. major* 5ASKH Promastigote auf Objektträgern fixiert, mit dem polyklonalen P46 Antiserum inkubiert und anschließend mit einem anti-Maus Alexa 594 sekundär markiert. Die DNA-haltigen Kompartimente wurden mittels DAPI Färbung sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten fixierte Promastigote, die entweder mit dem sekundären Antikörper allein oder mit naivem Mause Serum inkubiert wurden.

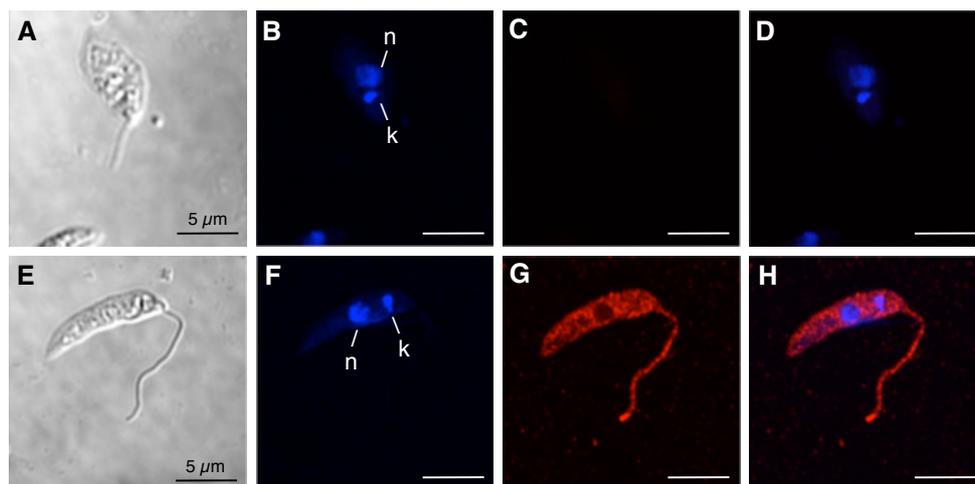


Abb. 17: P46 Lokalisation in Promastigoten mittels indirekter Immunfluoreszenz

L. major Promastigote wurden fixiert und ohne primären Antikörper als Kontrolle (A-D) bzw. mit anti-P46 Serum (E-H) gefärbt. Phasenkontrast (A, E); DAPI Färbung des Nukleus und Kinetoplasten (B, F); immunologischer Nachweis ohne (C) bzw. mit (G) anti-P46 Serum. D und H zeigen die Überlagerungen von B und C bzw. F und G.

Abbildung 17A-D zeigt die Negativ-Kontrolle, in der nur der sekundäre Antikörper zum Einsatz kam. Hier konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Ebenso zeigt die Inkubation mit dem naivem Mausserum keine Immunreaktion mit dem zweiten Antikörper (Daten nicht gezeigt). Das anti-P46 Serum markiert hingegen den gesamten Zellkörper des Parasiten inklusive der Geißel (Abb. 17G). Kinetoplast und Nukleus sind von der Färbung ausgeschlossen. Dies wird besonders deutlich in der Überlagerung der DAPI Färbung (Abb. 17F) mit dem sekundären Antikörper (Abb. 17H). Insgesamt zeigen diese Aufnahmen keine Hinweise auf eine Oberflächen-Lokalisation des P46 in Promastigoten.

Um die zytoplasmatische Lokalisation des P46 mit höherer Auflösung zu visualisieren, wurden immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von *L. major* 5ASKH Wildtyp Parasiten hergestellt. Dafür wurden die Leishmanien fixiert und nach Herstellung von Ultradünnschnitten mit naivem Mausserum bzw. anti-P46 Serum inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit anti-Maus-IgG aus Kaninchen und nachfolgend mit Protein-A-Goldpartikeln.

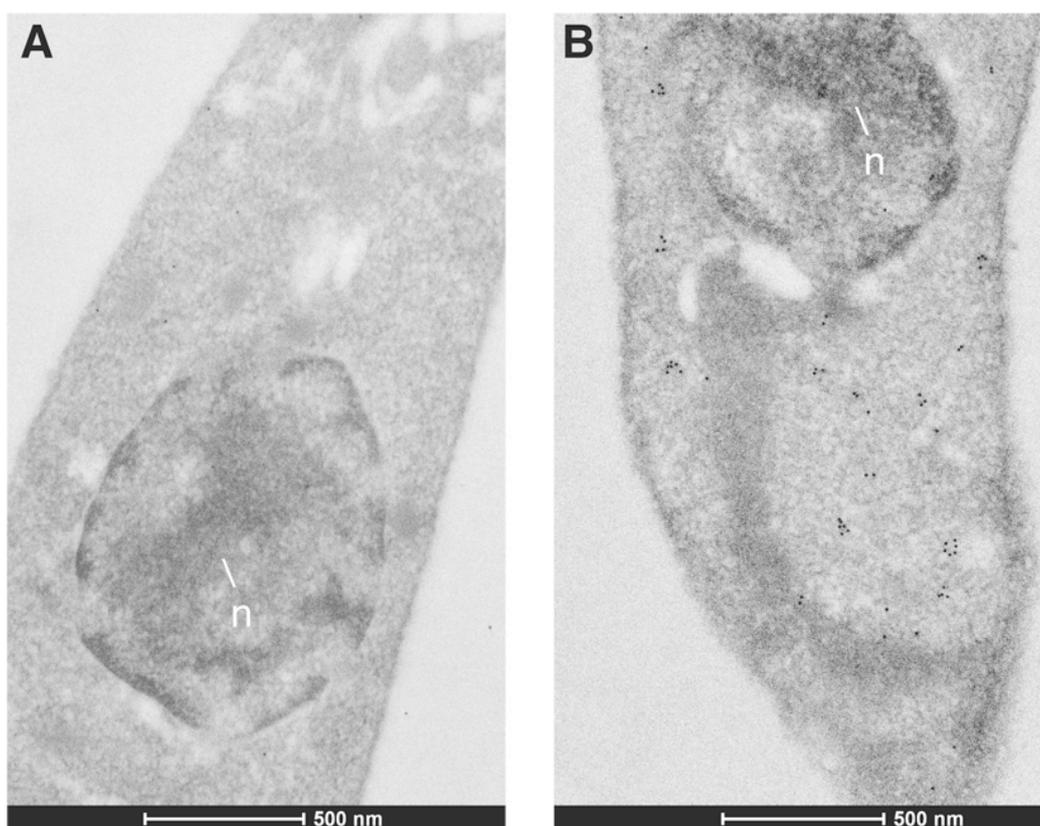


Abb. 18: Immunelektronenmikroskopische Analysen zur Lokalisation von P46 in Promastigoten

Promastigote *L. major* [pcosP46] wurden in Paraformaldehyd fixiert und in *LR-White*-Harz eingebettet, von dem Ultradünnschnitte hergestellt wurden. Nach Inkubation mit naivem Mausserum (A) oder anti-P46 Serum (B) erfolgte der Nachweis mit Protein-A-Goldpartikeln (10 nm). Die Länge der Balken entspricht 500 nm.

Wie aus Abbildung 18A ersichtlich wird, zeigt die Kontrolle mit naivem Mausserum keine Goldpartikel. Das P46-Antiserum erkennt hingegen distinkte Bereiche im Zytoplasma der Parasiten (Abb. 18B). Es war eine deutlich gebündelte Erscheinungsform der Goldpartikel in den Aufnahmen erkennbar. Dies könnte auf das Vorhandensein multimerer Komplexe hindeuten, was mit den Daten aus der nativen Gelelektrophorese übereinstimmen würde. Somit zeigt auch die Immunelektronenmikroskopie, dass es sich bei P46 in Promastigoten um ein zytoplasmatisches Protein handelt, das in Komplexen vorkommt.

3.1.8. Lokalisation des P46 in infizierten Knochenmarks-makrophagen

Die virulenzsteigernde Wirkung des P46 Proteins konnte während der *in vivo* Passage nachgewiesen werden. In dieser Phase des *Leishmania* Lebenszyklus liegen die Parasiten als Amastigote im Phagolysosom der Makrophagen vor. Um die Lokalisation des P46 in Amastigoten zu analysieren, sollten Immunfluoreszenzaufnahmen von infizierten Makrophagen hergestellt werden. Dafür wurden Knochenmarksmakrophagen (BMM) als geeignete Zielzellen ausgewählt. Diese weisen als charakteristisches Merkmal einen naiven Phänotyp auf, da sie im Gegensatz zu den häufig verwendeten Peritonealmakrophagen bisher keinen Kontakt zu anderen Immunzellen oder Antigenen hatten.

Die Makrophagen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit *L. major* 5ASKH Wildtyp bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit anti-P46 Serum, einem anti-Maus Alexa 594 Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. Als Negativ-Kontrolle diente die Inkubation mit naivem Mausserum. Sowohl in nicht infizierten Makrophagen, als auch in der Negativ-Kontrolle konnte keine P46 Färbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 19A-D zeigt das Ergebnis für die Infektion mit dem *L. major* 5ASKH Wildtyp. Die DAPI Färbung markiert neben den Nuklei und Kinetoplasten der Parasiten auch den Nukleus des Makrophagen (Abb. 19B). Das P46 Protein kann in distinkten Foci innerhalb des Zytoplasmas der Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 19C). Auffallend ist, dass die Färbung nicht mit der Lokalisation der Amastigoten übereinstimmt (Abb. 19D). Dies wird in den Abbildungen 19E-H noch deutlicher. Hier wurden BMM mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert. Die Fluoreszenz der P46 Färbung ist innerhalb dieser Makrophagen noch stärker. Sie ist zudem häufig in den Bereichen anzutreffen, in denen keine Amastigoten vorliegen (Abb. 19H).

In Makrophagen werden die aufgenommenen Leishmanien in so genannten Endosomen eingeschlossen, die aus Membranbestandteilen des Makrophagen bestehen. Teil dieser Membran ist das Glycoprotein *lysosomal-associated membrane protein 1* (Lamp1), das mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden kann. Um abzuklären, ob das P46 möglicherweise Bestandteil der Endosomen ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-P46 Serum und Lamp1 Antikörper durchgeführt. Es konnte jedoch keine Koloka-

localisation der beiden Marker festgestellt werden, was gegen eine Assoziation des P46 mit der parasitophoren Vakuole spricht (Daten nicht gezeigt).

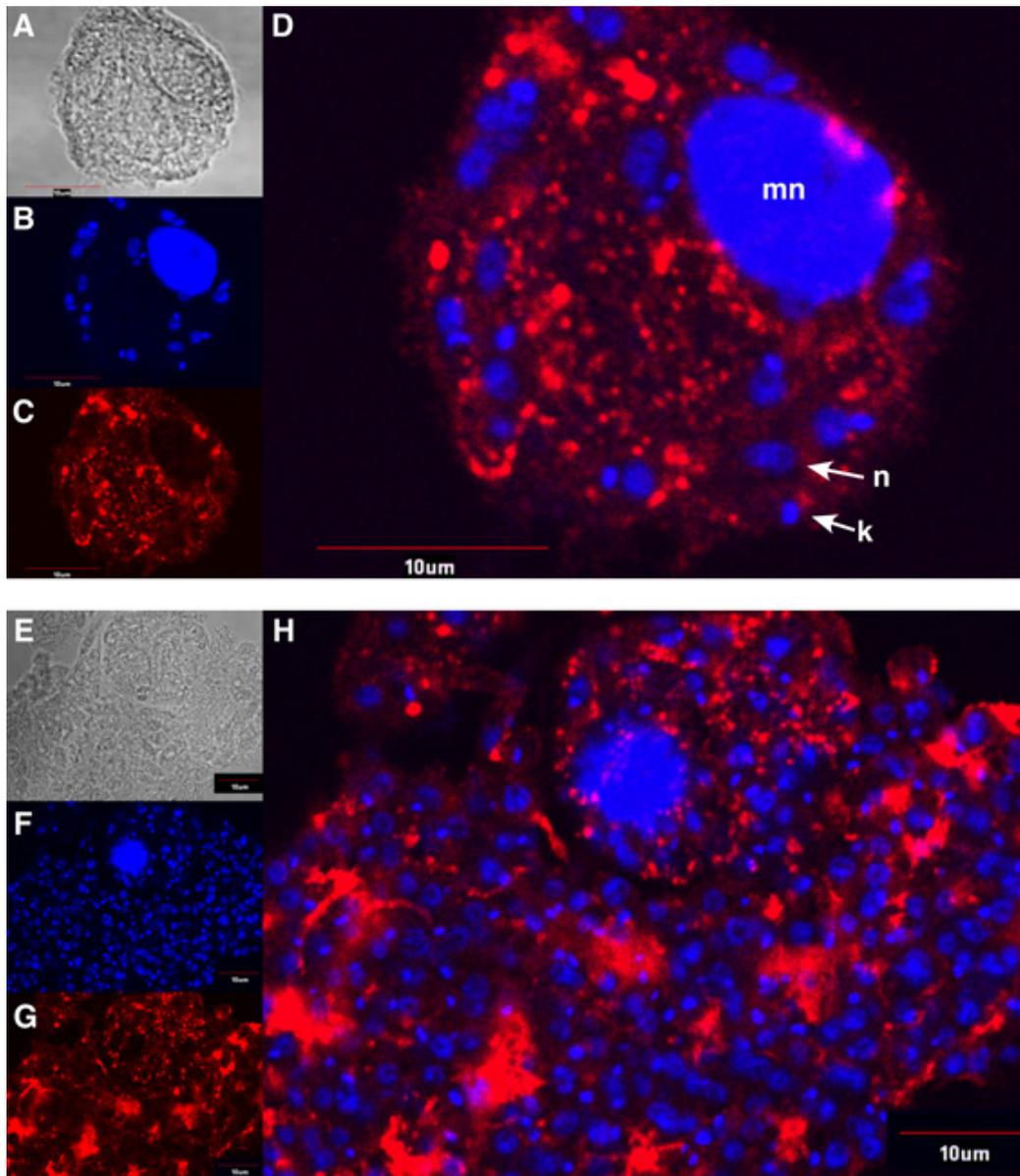


Abb. 19: P46 Lokalisation in infizierten Makrophagen

Knochenmarksmakrophagen wurden mit *L. major* 5ASKH (A-D) oder *L. major* 5ASKH [pcosP46] (E-H) in einem Verhältnis von 1:10 infiziert, fixiert und mit anti-P46 Serum und DAPI gefärbt. Zu sehen sind Durchlichtaufnahmen (A, E), DAPI Färbung (B, F) und anti-P46 Färbung (C, G). D und H zeigen DAPI und anti-P46 Überlagerungen. mn = Makrophagen Nukleus; k = Kinetoplast; n = Parasiten Nukleus.

Um die Lokalisation des P46 in infizierten Makrophagen mit höherer Auflösung untersuchen zu können, wurden immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infizierten Makrophagen erstellt. Dafür wurden nach Fixierung und Einbettung der infizierten Makrophagen Ultradünnschnitte hergestellt. Diese wurden anschließend mit naivem Mausserum oder mit P46 Antiserum inkubiert. Der Nachweis

erfolgte wiederum mit anti-Maus-IgG aus Kaninchen und Protein-A-Goldpartikeln. Die Kontrolle mit naivem Mausserum zeigte keine Goldpartikel auf den Schnitten (Abb. 20A). Im Gegensatz dazu zeigte die Markierung mit dem P46 Antiserum eine Verteilung des Proteins im Zytoplasma der Makrophagen (Abb. 20B). Ausserdem konnten Goldpartikel innerhalb der Amastigoten nachgewiesen werden. Diese Lokalisation war in der Immunfluoreszenz nicht zu erkennen. Grund hierfür könnte sein, dass das Antiserum in der Immunfluoreszenz mehrere Membranen passieren muss, bevor es auf die Amastigoten innerhalb der parasitophoren Vakuole trifft. Durch das Anschneiden der Parasiten in der Elektronenmikroskopie liegen die Zielproteine frei auf der Oberfläche, so dass das Antiserum leicht an das P46 binden kann.

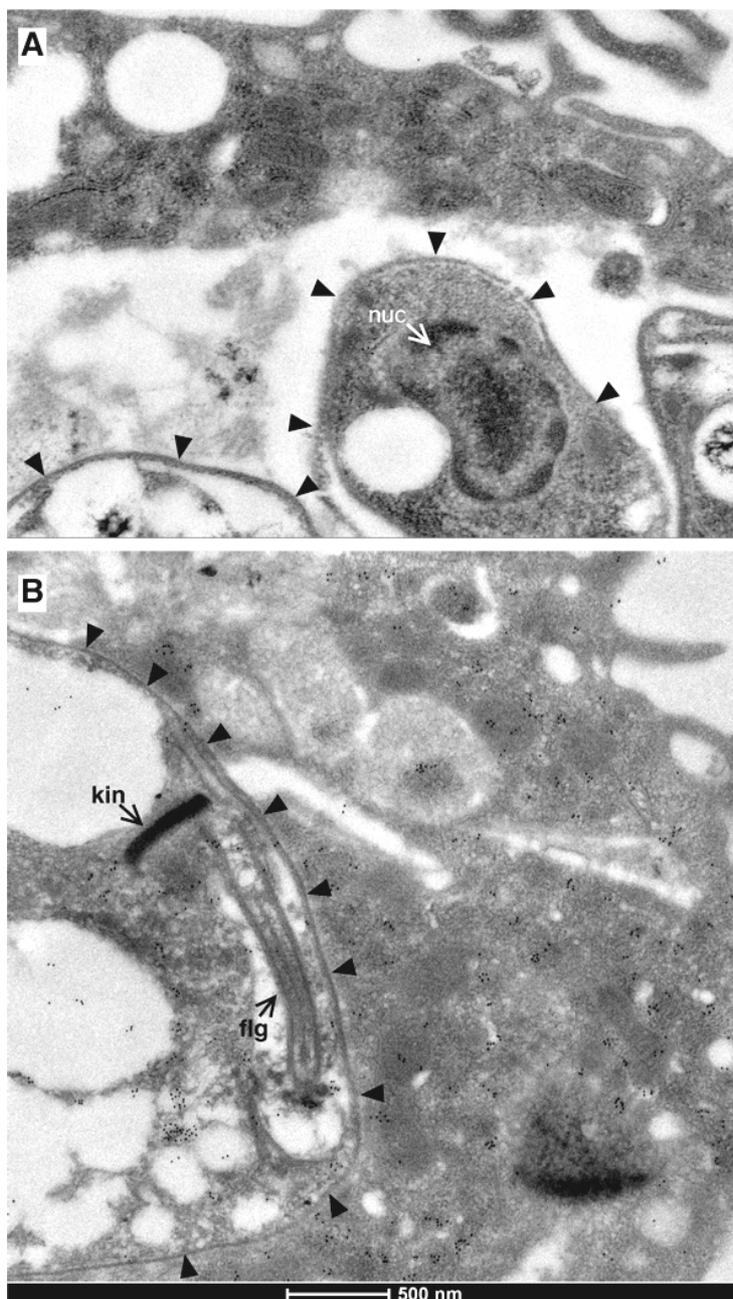


Abb. 20: Immunelektronenmikroskopische Analysen zur Lokalisation von P46 in infizierten Makrophagen

Knochenmarksmakrophagen wurden mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] in einem Verhältnis von 1:10 infiziert. Nach 24 h wurden die infizierten Zellen abgenommen, fixiert und in *LR-White* eingebettet. Ultradünnschnitte wurden hergestellt, die mit naivem Mausserum (A) bzw. anti-P46 Serum (B) inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine Protein-A-Goldmarkierung (10nm). Die Pfeilspitzen begrenzen die parasitophore Vakuolenmembran; kin = Kinetoplast; flg = Flagellum; nuc = Nukleus.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz, dass das P46 Protein nicht mit dem endosomalen Kompartiment der Parasiten assoziiert ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das P46 Protein auch innerhalb der Amastigoten vorliegt. Das Protein scheint somit auf bislang unbekannte Weise in das Zytosol der Makrophagen exportiert zu werden.

3.1.9. Infektionsraten und Parasitenlast infizierter Makrophagen

Bei näherer Betrachtung der indirekten Immunfluoreszenzaufnahmen (Abb. 19) wurde festgestellt, dass die mit *L. major* 5ASKH [pcosP46] infizierten Makrophagen deutlich mehr Parasiten enthalten als die mit dem Wildtyp infizierten Makrophagen. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen handelt, sollten Infektionsrate und Parasitenlast pro infiziertem Makrophage bestimmt werden.

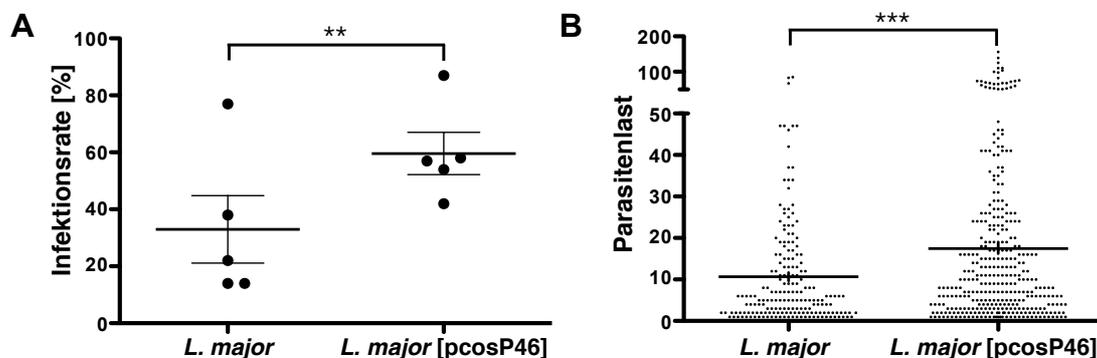


Abb. 21: Infektionsrate und Parasitenlast infizierter Makrophagen

Knochenmarksmakrophagen wurden mit *L. major* 5ASKH bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] in einem Verhältnis von 1:10 infiziert. Die Makrophagen (100-200 pro Probe) wurden bzgl. ihrer Parasiteninfektion ausgewertet. Die Infektionsrate als Prozent infizierter Makrophagen und die Parasitenlast als Anzahl Parasiten pro infiziertem Makrophage wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. **(A)** Scatter Blot der Infektionsrate (n=5). Die Signifikanz wurde durch einen *paired t*-test ermittelt; P (two-tailed) = 0,01. **(B)** Scatter Blot der Parasitenlast (n=600). P (two-tailed) = $5,9 \cdot 10^{-6}$, *U*-test.

Dazu wurden Knochenmarksmakrophagen mit *L. major* 5ASKH Wildtyp bzw. *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert und 24 h inkubiert. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 100-200 Makrophagen ausgewertet wurden. Die Bestimmung der Infektionsrate und der Parasitenlast erfolgte anhand der Auswertung der Zellkernfärbung mittels DAPI. Aus Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass aufgrund der P46 Überexpression die Infektionsraten der Makrophagen signifikant ($P = 0,01$) von ca. 33% auf ca. 60% anstiegen (Abb. 21A). Zusätzlich war die durchschnittliche Parasitenlast in den Makrophagen erhöht, die mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] infiziert waren (Abb. 21B). Auch dieser Unterschied ist hochsignifikant ($P < 0,0001$). Werden beide Effekte zusammen betrachtet, so lässt sich erkennen, dass in den Makrophagen nach *in vitro* Infektion mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] eine insgesamt 3fach höhere Parasitenlast

vorliegt. Daraus folgt, dass P46 dem Parasiten auch *in vitro* einen Vorteil innerhalb der Makrophagen verschafft, entsprechend der *in vivo* beobachteten Steigerung der Virulenz.

3.1.10. Herstellung von Genaustauschmutanten

Um die biologische Rolle und Funktion von Proteinen im Lebenszyklus von Leishmanien genauer untersuchen zu können, bietet sich als gängige Methode die Herstellung von Genaustauschmutanten an. Hierbei werden die zu deletierenden Gene, insofern es sich um *single copy genes* handelt, durch homologe Rekombination in zwei aufeinander folgenden Transfektionen gegen entsprechende DNA-Konstrukte ausgetauscht. Dabei enthalten die DNA-Genaustauschkonstrukte unterschiedliche Resistenzmarkergene, mit deren Hilfe eine anschließende Selektion auf positiv transfizierte Leishmanien ermöglicht wird. Den auf diese Weise erzeugten Genaustauschmutanten fehlt das entsprechende Gen und somit auch das Genprodukt. Eine nachfolgende Untersuchung des Phänotyps der entstandenen Mutanten lässt oftmals Rückschlüsse auf die Funktion und Rolle des Proteins zu. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die beiden Allele des P46-Gens gegen geeignete Selektionsmarkergene ausgetauscht werden.

3.1.10.1. Klonierung der Genaustauschkonstrukte und des *add back*

Um ein Gen durch einen Resistenzmarker austauschen zu können, muss dieser zunächst zwischen die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) des Zielgens kloniert werden, bevor das linearisierte Konstrukt mittels homologer Rekombination in das Genom des Parasiten integrieren kann.

Zu diesem Zweck wurden etwa 1.000 Nukleotide des 5'- bzw. 3'-UTR von P46 unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide, die unter Punkt 2.1.6. aufgelistet sind, amplifiziert. Als Matrize in der PCR diente genomische DNA des *L. major* 5ASKH Wildtyps. Nacheinander wurden der 5'-UTR über die Restriktionsschnittstellen *EcoR1* und *Acc651* und der 3'-UTR über die Restriktionsschnittstellen *Bgl2* und *Hind3* in den pUC19 Vektor ligiert. Anschließend wurde einer der Selektionsmarker über die Schnittstellen *Acc651* und *BamH1* zwischen den beiden UTRs integriert. Dabei wurde der Vektor mit *Bgl2* geöffnet, die Selektionsmarker aber mit *BamH1* in den Vektor ligiert, so dass die *BamH1* Schnittstelle zerstört wurde. Dies war notwendig, da sich im 3'-UTR des P46 eine weitere *BamH1* Schnittstelle befand. Im Rahmen dieser Versuche kamen die Resistenzmarkergene Phleomycintransferase (BleoR), Puromycinacetyltransferase (PuroAC), Neomycinphosphotransferase (Neo) und Hygromycinphosphotransferase (Hygro) zum Einsatz. Zur Verifizierung der korrekten Integration wurden die erhaltenen Plasmide einem analytischen Verdau unterzogen (nicht dargestellt). Positive Klone wurden anschließend zur partiellen Sequenzierung geschickt, um die Identität der UTR-Sequenzen abzugleichen. Die so entstandenen Genaustauschkonstrukte wurden mit dem Restriktionsenzym *Swa1* linearisiert,

bevor sie für die Transfektionen eingesetzt wurden. Abbildung 22 zeigt die Klonierung der verschiedenen Genaustauschkonstrukte für P46 auf Basis des pUC19 Vektors. Die für die Subklonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

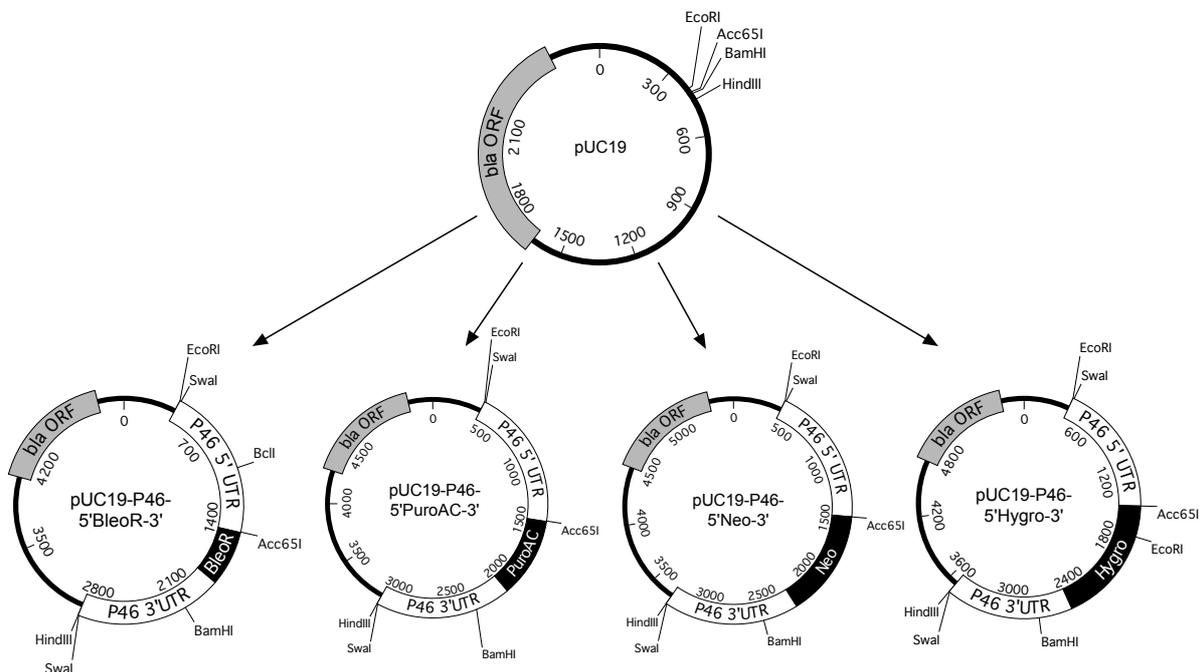


Abb. 22: Klonierungsstrategie für die Herstellung der Genaustauschkonstrukte für P46

Die 5'- und 3'-UTRs des P46-Gens wurden auf Basis der *L. major* 5ASKH Wildtyp DNA amplifiziert und nacheinander in den pUC19 Vektor ligiert. Anschließend wurden die verschiedenen Selektionsmarker integriert. Die Genaustauschkonstrukte wurden mit dem Restriktionsenzym *Swa1* linearisiert und jeweils in *L. major* Wildtyp Zellen transfiziert, wo sie mittels homologer Rekombination ins Genom integrieren konnten.

Für den Fall, dass es sich bei P46 um ein essenzielles Gen handelt, wodurch es nicht möglich wäre lebensfähige Nullmutanten zu erzeugen, sollte eine zusätzliche exogene Genkopie für die Expression des P46 sorgen. Bei dieser so genannten *gene add back*-Strategie wird eine zusätzliche Kopie des Gens durch homologe Rekombination in den Genlocus integriert, der für die kleine Untereinheit der rRNA (ssu rRNA) kodiert. Dieser Bereich wird in allen Parasitenstadien exprimiert. Durch die Transkription der RNA Polymerase I wird für ein hohes Transkriptionsniveau in den Leishmanien gesorgt (Lodes et al., 1995).

Für die Klonierung des P46 *add back* Konstrukts wurde zunächst der ORF des P46 zusammen mit dem 3'-UTR in einer PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *Xba1* und *Blg2* erfolgte die Ligation des PCR Produkts in den pIRmcs3+ Vektor (Hoyer et al., 2004). Dieser enthält neben den Sequenzen für die Integration in den ssu rRNA Locus auch die Sequenz für die Resistenz gegen Nourseothricin. Das erhaltene P46 *add back* Plasmid wurde anschließend mittels *Swa1* linearisiert.

3.1.10.2. Transfektion und Selektion

Für die Transfektion der linearisierten Genaustausch- und *gene add back*-Konstrukte wurde *L. major* 5ASKH Wildtyp verwendet. Zunächst wurde der P46 *add back* integriert, um diesen neben dem Wildtyp als Grundlage für die weiteren Transfektionen nutzen zu können. Promastigote, die sich unter Nourseothricin-Selektion vermehrten, wurden durch serielle Verdünnung vereinzelt. Anschließend erfolgte eine PCR-Analyse zur Verifizierung der Integration in den ssu rRNA Locus. Hierfür wurden die speziellen Oligonukleotide rDNAflank-3'rev und DHFR-TS-fwd zur korrekten Integration des 3'-Bereichs sowie rDNAflank-5'fwd und LST-IR-rev zur Integration des 5'-Bereichs eingesetzt. Nur wenn beide *primer*-Kombinationen positive PCR Produkte liefern, ist der *gene add back* richtig integriert.

Die Transfektion der Genaustauschmutanten sowohl in den *L. major* Wildtyp als auch in den erfolgreich transfizierten *L. major* P46 *add back* (^{+/+}) gestaltete sich als kompliziert. Trotz wiederholter Versuche war es nicht möglich, mittels der Puro- bzw. BleoR-Genaustauschkonstrukte ein Allel des P46 auszutauschen. Um auszuschließen, dass das Problem aufgrund der Resistenzmarkergene auftrat, wurden auch Konstrukte mit Neo bzw. Hygro verwendet. Allerdings brachte auch diese Transfektionsstrategie keine Einzelallel-Mutanten hervor. Da durch die Einführung des *add back* ausreichend P46 in der Zelle zur Verfügung steht, kann davon ausgegangen werden, dass das Problem nicht auf einer Notwendigkeit des P46 Gens für den Parasiten beruht. Vielmehr ist zu befürchten, dass die UTR-Sequenzen des P46 Gens keine hinreichende Expression der Selektionsmarker erlauben. Eine Alternative könnte darin bestehen, die Selektionsmarker zunächst mit getesteten 5'- bzw. 3'-UTRs zu umgeben, bevor sie zwischen die P46-UTRs kloniert werden

3.2. Charakterisierung des putativen Peptidasekomplexes HslIVU aus *Leishmania donovani*

Die HslIVU Proteine bilden in Prokaryoten einen aktiven Peptidasekomplex und übernehmen mit anderen, kleineren Komplexen die Aufgaben des Proteasoms der Eukaryoten. Durch die Verfügbarkeit der Genomsequenzen einer Reihe von Protozoa konnte 2002 erstmalig gezeigt werden, dass die Gene für die HslIVU Proteine auch in niederen Eukaryoten vorhanden sind (Couvreur et al., 2002). Die Tatsache, dass die Gene in höheren Eukaryoten nicht existieren, macht sie zu interessanten Zielstrukturen für neue Wirkstoffe.

Ziel dieser Arbeit war es, die HslIVU Proteine von *L. donovani* bezüglich ihrer Rolle im Lebenszyklus des Parasiten zu untersuchen und Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Hierfür wurden neben molekularbiologischen Methoden, auch Lokalisations- und Kollokalisationsstudien angewendet, sowie eine Komplementationsanalyse zur Annäherung an die Funktion der Proteine.

3.2.1. Herstellung von spezifischen Antiseren

3.2.1.1. Klonierung der Expressionsvektoren

Essenziell für den Nachweis der Expression der HslIVU Proteine in *Leishmania donovani*, sowie für weitere Charakterisierungen der Genprodukte auf Proteinebene sind spezifische Antikörper, die eigens hergestellt werden sollten. Hierzu wurde, wie bereits in 2.2.4.1. und 3.1.5.1. beschrieben, das prokaryotische T7 RNA-Polymerase Expressionssystem (Studier et al., 1990) verwendet.

Die offenen Leserahmen von HslIV, HslU1 und HslU2 wurden zunächst mit spezifischen Oligonukleotiden in einer PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den 5'-*primer* eine *Nde*I Restriktionsschnittstelle (CATATG) angehängt, in der das Startcodon der ORF bereits integriert ist. Der 3'-*primer* fügte eine *Eco*R1-Schnittstelle (GAATTC) unterhalb des Stop-Codons an. Nach Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen wurden die ORF in den linearisierten pJC45 ligiert und im Anschluss durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert.

3.2.1.2. Antigen-Aufreinigung, Immunisierung und Analyse des Antiserums

Die Expressionsvektoren pJC45-HslIV, pJC45-HslU1 und pJC45-HslU2 wurden in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)[pAP/*lac*^Q] transformiert, in dessen Genom das Gen für die T7 RNA-Polymerase integriert ist. Die Transkription und anschließende Überexpression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgender Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurden die Bakterienkulturen vor und nach IPTG Zugabe analysiert (Abb. 23, Spalte A). Als Negativ-

Kontrolle diente der „leere“ pJC45-Vektor. Dieser zeigte im SDS-Gel vor und nach Induktion identische Proteinmuster (nicht dargestellt), während in den Proben der Expressionsvektoren nach Induktion (+IPTG) eine deutliche Überexpression der rekombinanten Proteine zu erkennen war (Abb. 23, Spalte A).

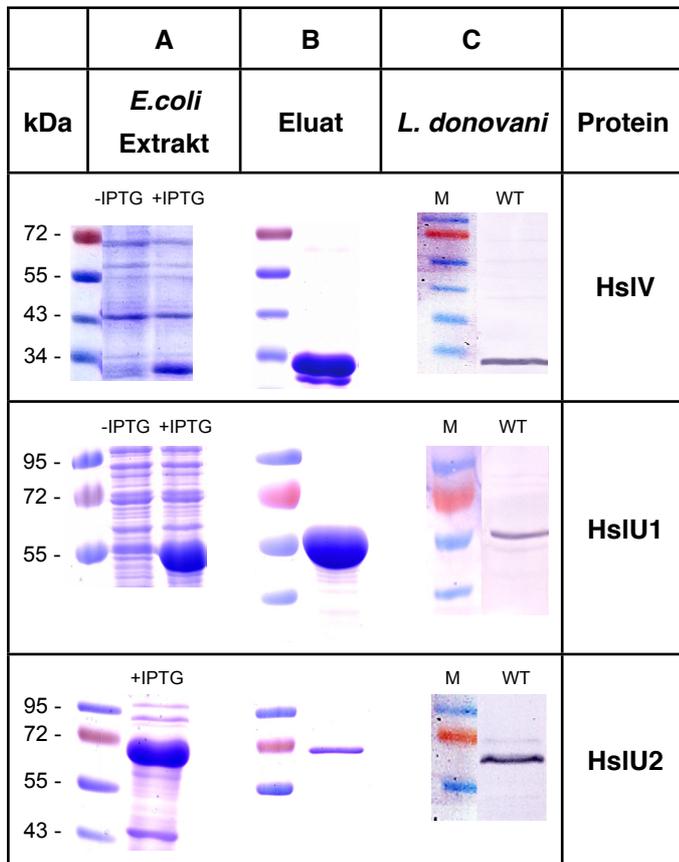


Abb. 23: Herstellung der Antigene und Verifizierung der Antisera

Kompetente *E. coli* BL21 (DE3)[pAP/*lacI*^Q] Zellen wurden mit den Plasmiden pJC45-HslV, pJC45-HslU1 oder pJC45-HslU2 transformiert. Die Expression der Proteine vor und nach Zugabe von IPTG wurde in 10% SDS-Gelen überprüft (Spalte **A**). Die Aufreinigung erfolgte über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie (Spalte **B**). Die gewonnenen polyklonalen Antisera wurden auf ihre Spezifität in Western Blots getestet (Spalte **C**). Dafür wurde das Lysat von 1×10^7 *L. donovani* Zellen nach Auftrennung in SDS-Gelen auf PVDF Membranen transferiert. Als Marker (M) diente der PageRuler Prestained (Fermentas).

Das errechnete Molekulargewicht der von den verschiedenen ORF abgeleiteten Aminosäuresequenzen beträgt inklusive His-tag für HslV 26,6 kDa, HslU1 50 kDa und für HslU2 58,2 kDa. Zur Isolierung der rekombinanten Proteine aus den Bakterienzellen wurden diese durch Ultraschall aufgeschlossen, deren lösliche Bestandteile abgetrennt und die Sedimente inklusive der *inclusion bodies* in einem Harnstoff-haltigen Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine mittels ihrer His-tags an eine Nickel-Chelat Säule gebunden und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch niedrige Imidazol-Konzentrationen von der Säule entfernt. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend mit hoher Imidazol-Konzentration eluiert. Abbildung 23 (Spalte B) zeigt die Eluate der aufgereinigten rekombinanten Proteine im SDS-Gel. Neben den jeweiligen Hauptbanden der Genprodukte sind teilweise Banden niedrigerer Molekulargewichte zu erkennen, welche auf Abbauprodukte bzw. unvollständige Translationsprodukte hindeuten.

Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden zur Immunisierung von NMRI-Mäusen verwendet. Nach Isolierung der Antisera wurden diese in Western Blot Analysen auf ihre Spezifität untersucht. Je 1×10^7 *L. donovani* Promastigote wurden lysiert und mittels SDS-

PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF Membran erfolgte die Inkubation mit den polyklonalen Antiseren. Als sekundäre Antikörper dienten ein Biotin-konjugierter anti-Maus Antikörper, an den ein Streptavidin-AP-konjugierter Antikörper binden konnte, bzw. ein direkt markierter anti-Maus AP. Der colorimetrische Nachweis erfolgte mit Alkalischer Phosphatase. Alle polyklonalen Seren reagierten spezifisch sowohl mit dem jeweiligen rekombinanten Protein (nicht dargestellt), als auch mit einem entsprechenden Protein im *L. donovani* Gesamtzellextrakt (Abb. 23, Spalte C). Die hier verifizierten Antikörper konnten nun zur weiteren Charakterisierung der HsIV und HsIU Proteine aus *L. donovani* eingesetzt werden.

3.2.2. Expression während der Stadiendifferenzierung

Die Differenzierung von *L. donovani* Promastigoten zu Amastigoten lässt sich *in vitro* mittels höherer Temperaturen und Ansäuerung des Mediums nachstellen. Um untersuchen zu können, ob die HsIVU Proteine während des Differenzierungsprozesses unterschiedliche Expressionslevel aufweisen, wurde die Expressionskinetik der drei Proteine analysiert. Hierfür wurden *L. donovani* Promastigote, wie unter 2.2.1.5. beschrieben, in Amastigote umgewandelt. Die täglich entnommenen Proteinproben wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Der Nachweis der Stadiendifferenzierung erfolgte sowohl anhand mikroskopischer Beobachtungen (Abb. 24A), als auch durch den Nachweis der amastigoten spezifischen A2-Proteine (Abb. 24B). Die HsIV und HsIU Proteine wurden durch die spezifischen Antiseren (Abb. 24C) nachgewiesen. Während des Differenzierungsprozesses wiesen die Proteine HsIV und HsIU2 kein erhöhtes Expressionslevel auf. Hingegen kam es in Folge des Hitzeschocks und der Ansäuerung des Mediums zu einem leichten Anstieg der HsIU1 Proteinexpression. Diese Ergebnisse bestätigen kürzlich veröffentlichte *proteomics* Daten, in denen ebenfalls die Expressionslevel dieser drei Proteine während des Differenzierungsprozesses aufgenommen wurden (Rosenzweig et al., 2008b). Rosenzweig et al. konnten zeigen, dass es 24 h nach Umwandlung zu einem leichten Anstieg der Expression des HsIU1 Proteins kommt, wohingegen HsIV und HsIU2 zu diesem Zeitpunkt auf Promastigoten-Niveau exprimiert wurden. Etwa 144 h nach Differenzierung zeigte HsIV allerdings eine deutliche Expressionserhöhung. Daher ist anzunehmen, dass eine Expressionserhöhung des HsIV erst 24 h nach der Umwandlung beginnt. Zusammenfassend konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass der Differenzierungsprozess nur geringe Auswirkungen auf die Expressionsniveaus der untersuchten Proteine hat.

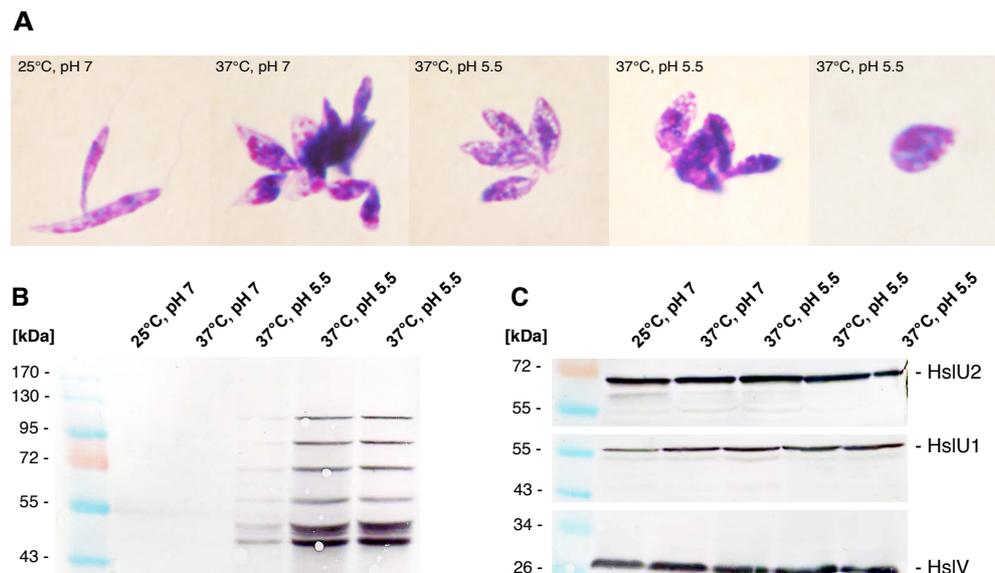


Abb. 24: Expression der HslV und HslIU Proteine während der *in vitro* Stadiendifferenzierung

Promastigote *L. donovani* Wildtyp Zellen wurden bei 25°C inkubiert und anschließend für 24 h einer Temperatur von 37°C ausgesetzt. Nach Ansäuern des Mediums wurden die Zellen für weitere drei Tage kultiviert. Während des Differenzierungsprozesses wurden täglich Zellproben für die Mikroskopie und Western Blot Analyse abgenommen. Die Verifizierung der Stadienumwandlung erfolgte sowohl mittels Mikroskopie (**A**) als auch mittels Nachweis der amastigoten spezifischen A2-Proteine (**B**). (**C**) zeigt die Proteinexpression von HslU2 (obere Abb.), HslU1 (mittlere Abb.) und HslV (untere Abb.) während der *in vitro* Umwandlung in Amastigote. Die Positionen der Markerproteine sind jeweils links angegeben, die Position der HslV und HslIU Proteine sind auf der rechten Seite angezeigt.

3.2.3. Native PAGE zur Verifizierung oligomerer Strukturen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, bilden bakterielle HslVU Proteine heterooligomere Komplexe, die unter anderem für den Abbau von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle verantwortlich sind. Um herauszufinden, ob die *Leishmania* Sequenzanaloge auch oligomere Proteinkomplexe bilden und zur Untersuchung ihrer biologisch relevanten Konformation, wurde eine native Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden Proteine im elektrischen Feld aufgrund der von der ansteigenden Polyacrylamid-Konzentration vorgegebenen Porengrößen bis zu ihrer Ausschlussgröße aufgetrennt. Zelllysate von promastigoten *L. donovani* wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen hergestellt und in einem nativen Gradientengel separiert. Nach einer Denaturierung folgte der Proteintransfer auf eine PVDF Membran. Im anschließenden Western Blot wurden die Proteine mit Hilfe der spezifischen Antiseren markiert (Abb. 25).

Das polyklonale HslV Antiserum markiert im Western Blot eine gut definierte Bande bei ca. 170 kDa. Der HslU2 Antikörper erkennt hingegen einen Komplex von ca. 500 kDa. Trotz wiederholter Versuche konnte mit dem HslU1 Antiserum kein Protein bzw. definierter Proteinkomplex nachgewiesen werden. Zusammenfassend wird aus dieser Analyse ersichtlich, dass HslV und HslU2 jeweils in sehr großen Komplexen vorliegen, aber offen-

sichtlich keinen gemeinsamen Komplex bilden. Über einen Komplex des HsIV mit HsIU1 kann aufgrund der fehlenden HsIU1 Immunreaktion keine Aussage getroffen werden. Dieser Fragestellung sollte mit Hilfe von Lokalisationsstudien und Koloalisationsstudien weiter nachgegangen werden.

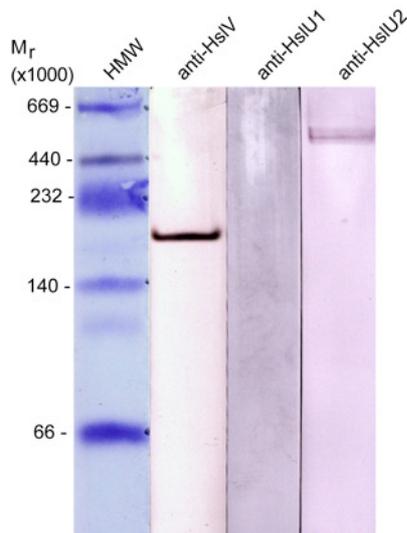


Abb. 25: Immunologischer Nachweis oligomerer Proteinkomplexe in *L. donovani* Promastigoten

L. donovani Promastigote wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen lysiert und in einer nativen 4-18%igen Gradienten-Gelelektrophorese bis zum Erreichen ihres Äquilibrium separiert. Die nativen Proteinkomplexe wurden im Anschluss denaturiert, reduziert und auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde mit den Antiseren gegen HsIV, HsIU1 bzw. HsIU2 inkubiert. Die Spur des HMW Markers wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Größen der Markerproteine sind links angegeben.

3.2.4. Subzelluläre Lokalisation der HsIV und HsIU Proteine in Promastigoten

Für die Untersuchung der Funktion von Proteinen sowie für die eventuelle Komplexbildung mehrerer Proteine kann die subzelluläre Lokalisation wichtige Hinweise geben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Lokalisation der HsIV und HsIU Proteine aus *L. donovani* sowohl mittels direkter als auch mittels indirekter Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Zudem ermöglicht eine Kombination dieser Methoden aufschlussreiche Koloalisationsstudien.

3.2.4.1. Herstellung von GFP-Fusionsproteinen

Für *in vivo* Untersuchungen der drei Proteine mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie wurden transgene Leishmanien generiert. Hierfür wurden zunächst die offenen Leserahmen von HsIV, HsIU1 und HsIU2 mit Hilfe der entsprechenden Restriktionschnittstellen in den pTLv3::eGFP- bzw. pTLv4::eGFP-Vektor kloniert, so dass die Konstrukte pTLv3-HsIV::eGFP, pTLv3-HsIU1::eGFP und pTLv4-HsIU2::eGFP entstanden (D. Gutzke, A. Nagel, unveröffentlicht). Diese wurden anschließend in promastigote *L. donovani* Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente der pTLv3::eGFP. Die Leishmanien exprimieren somit je eines der Proteine, an das eine C-terminale GFP (*green fluorescent protein*)-Domäne gekoppelt ist. Die mit den verschiedenen eGFP-Vektoren transfizierten Leishmanien wurden im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm untersucht. GFP eignet sich sehr gut als Marker für Protein-Lokalisationen, da für die Ausbildung des Fluorophors keine Kofaktoren benötigt werden. Das hier verwendete

eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gehört zur Klasse 2 der GFP-Varianten und wird aufgrund seiner starken Leuchtkraft häufig genutzt (Tsien, 1998). Da das relativ große GFP-Protein (26 kDa), welches als Fusionsprotein an eines der HsIVU Proteine gekoppelt ist, bei der nativen Faltung der Proteine sterisch hinderlich sein könnte, und somit nicht der realen Lokalisation des Proteins entsprechen würde, wurden die Lokalisationsstudien auch indirekt mittels der spezifischen Antikörper durchgeführt.

3.2.4.2. Lokalisation des HsIV Proteins in *L. donovani* Promastigoten

Für die Lokalisation des HsIV in Promastigoten wurden sowohl *L. donovani*, die mit dem GFP-Fusionsprotein transfiziert wurden (HsIV::eGFP), als auch *L. donovani* Wildtyp Zellen verwendet. Die Parasiten wurden fixiert und im Falle der Fusionsproteine direkt mikroskopisch ausgewertet. Die Wildtyp Zellen wurden nach der Fixierung permeabilisiert, und mit dem HsIV Antiserum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung mit dem sekundären anti-Maus Alexa 594 Antikörper und DAPI.

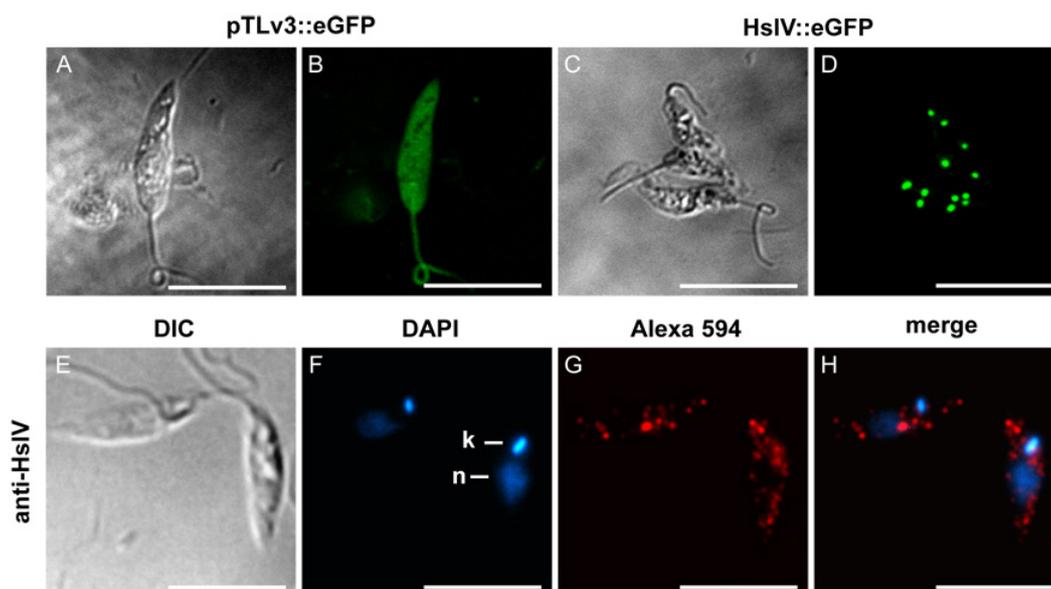


Abb. 26: Subzelluläre Lokalisation des HsIV Proteins mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz

(A-D) Spät-logarithmische *L. donovani*-pTLv3::eGFP (A, B) und *L. donovani*-pTLv3-HsIV::eGFP (C, D) Promastigote wurden fixiert und am Epi-Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich des Phasenkontrast (A, C) und ihrer GFP Fluoreszenz (B, D) untersucht. (E-H) *L. donovani* Promastigote wurden fixiert und mit anti-HsIV Serum gefärbt. Phasenkontrast (E), DAPI Färbung des Nukleus und Kinetoplasten (F), immunologischer Nachweis mit anti-HsIV Serum (G). H zeigt die Überlagerung von DAPI mit der spezifischen anti-HsIV Färbung. Der Balken entspricht einer Länge von 5 µM. k = Kinetoplast; n = Nukleus.

Wie in Abbildung 26 (A, B) zu erkennen ist, zeigt die mit dem pTLv3::eGFP transfizierte Kontrolle (pTLv3::eGFP) eine grüne Fluoreszenz, die über die gesamte Zelle verteilt ist,

ohne Spezifität für ein subzelluläres Kompartiment. Auch die Geißel weist deutlich grüne Fluoreszenz auf. Im Vergleich dazu stellt das Bild der mit dem pTLv3-HsIV::eGFP transfizierten Parasiten (Abb. 26C+D; HsIV::eGFP) eine deutlich andere Lokalisation dar. Die grüne Fluoreszenz tritt hier an distinkten Stellen im Zytoplasma auf, die häufig auch entlang der Plasmamembran zu finden ist. Diese Ergebnisse konnten mittels indirekter Immunfluoreszenz bestätigt werden (Abb. 26E-H). Zusätzlich konnte durch die DAPI Färbung in der indirekten Fluoreszenz die Information gewonnen werden, dass HsIV nicht im Kern oder Kinetoplasten lokalisiert ist. Dies ist vor allem im Vergleich der Sekundärfärbung (Abb. 26G) mit dem *merge* Bild (Abb. 26H) deutlich zu sehen. Auch die Geißel war weder in den HsIV::eGFP Leishmanien noch in den indirekt markierten Parasiten gefärbt.

Um die Lokalisation des HsIV noch detaillierter nachzuweisen, wurden Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Nach Einbettung der *L. donovani* Wildtyp Zellen, wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Die Proben wurden mit naivem Mausserum (Abb. 27A) bzw. mit spezifischem HsIV Antiserum (Abb. 27B) inkubiert und anschließend mit anti-Maus Goldpartikeln markiert. Die Negativ-Kontrolle weist keine Markierung mit Goldpartikeln auf. Dies spricht für die Spezifität des HsIV-Serums auf Promastigoten.

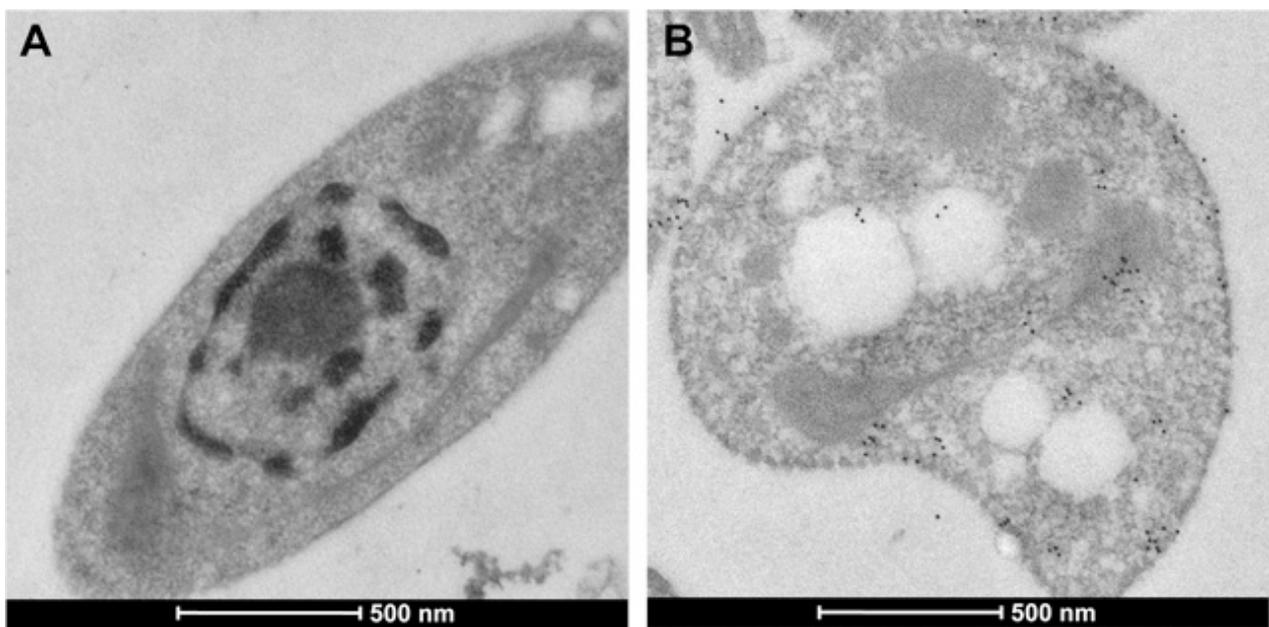


Abb. 27: Immunelektronenmikroskopische Analysen zur Lokalisation von HsIV in Promastigoten *L. donovani*

Promastigote *L. donovani* wurden in Paraformaldehyd fixiert und in *LR-White*-Harz eingebettet, von dem Ultradünnschnitte hergestellt wurden. Nach Inkubation mit naivem Mausserum (A) oder anti-HsIV Serum (B) erfolgte der Nachweis mit Protein-A-Goldpartikeln (10 nm). Die Länge der Balken entspricht 500 nm.

Nach Inkubation mit dem HsIV Antiserum ist eine punktuelle Verteilung des HsIV im Zytoplasma der Parasiten zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse der direkten und indirekten Immunfluoreszenz. Weiterhin wird aus den Aufnahmen ersichtlich, dass HsIV

scheinbar auch im Komplex mit sich selber auftritt, da die Goldpartikel fast immer gruppiert vorliegen. Dieses Ergebnis stützt die Daten aus der nativen PAGE, wo mit dem HslV Serum ein offensichtlich oligomerer Komplex von ca. 170 kDa verifiziert werden konnte.

Zusammenfassend konnte für HslV eine fokale, exklusiv zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden, die häufig randständig ist, aber nicht Kern, Kinetoplast oder Geißel einschließt.

3.2.4.3. Lokalisation der HslU Proteine in *L. donovani* Promastigoten

Um die Lokalisation der HslU Proteine aus *L. donovani* zu untersuchen, wurden ebenfalls verschiedene Methoden angewendet. Für HslU1 standen neben den spezifischen Antikörpern auch mit dem HslU1::eGFP Fusionsprotein transfizierte *L. donovani* zur Verfügung. Dies war nicht der Fall für HslU2. Hier war es bisher nicht möglich, transgene *L. donovani* mit dem HslU2::eGFP Fusionsprotein zu erzeugen. Daher konnten im Rahmen dieser Arbeit nur spezifische Antikörper Hinweise auf die Lokalisation geben.

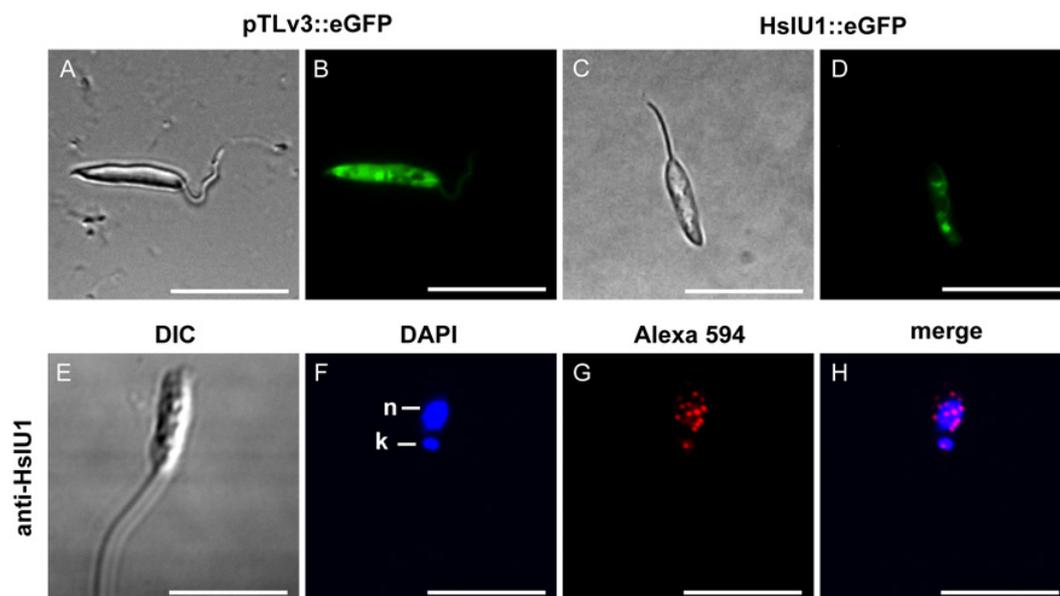


Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation des HslU1 Proteins mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz

(A-D) Spät-logarithmische *L. donovani*-pTLv3::eGFP (A, B) und *L. donovani*-HslU1::eGFP (C, D) Promastigoten wurden fixiert und am Epi-Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich des Phasenkontrast (A, C) und ihrer GFP Fluoreszenz (B, D) untersucht. (E-H) *L. donovani* Promastigote wurden fixiert und mit anti-HslU1 Serum gefärbt. Phasenkontrast (E), DAPI Färbung des Nukleus und Kinetoplasten (F), immunologischer Nachweis mit anti-HslU1 Serum (G). H zeigt die Überlagerung von DAPI mit der spezifischen anti-HslU1 Färbung. Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ M. k = Kinetoplast; n = Nukleus.

Die Parasiten wurden, wie in 3.2.4.2. bereits beschrieben, fixiert, mit den jeweiligen Antisera gefärbt und mikroskopiert. Die mit pTLv3::eGFP transfizierten Kontrollzellen zeigten eine Fluoreszenz, die den gesamten Zellkörper inklusive Geißel abdeckte (Abb. 28A+B). In Abbildung 28D ist zu erkennen, dass HslU1 eine spezifische Lokalisation im Parasiten einnimmt. Aufgrund der sehr schwachen eGFP-Fluoreszenz und einer geringen Prozentzahl an leuchtenden Parasiten, war es schwer, die Lokalisation genauer zu definieren. Dies war mittels indirekter Fluoreszenz besser möglich. Hier zeigte sich, dass HslU1 nahezu Deckungsgleich mit der DAPI Fluoreszenz vorliegt (Abb. 28H). Teilweise war die rote Fluoreszenz aber auch nur in der Nähe des Zellkerns oder Kinetoplasten zu beobachten. Für HslU2 ergab die Mikroskopie eine Verteilung des Proteins im gesamten Zytoplast der Zelle inklusive der Geißel (Abb. 29). Häufig traten verstärkte Fluoreszenz-Signale an der vorderen Geißeltasche auf. Nukleus und Kinetoplast hingegen wurden durch den sekundären Antikörper nicht markiert, wie im Vergleich von Abb. 29B und 29C gut zu erkennen ist.

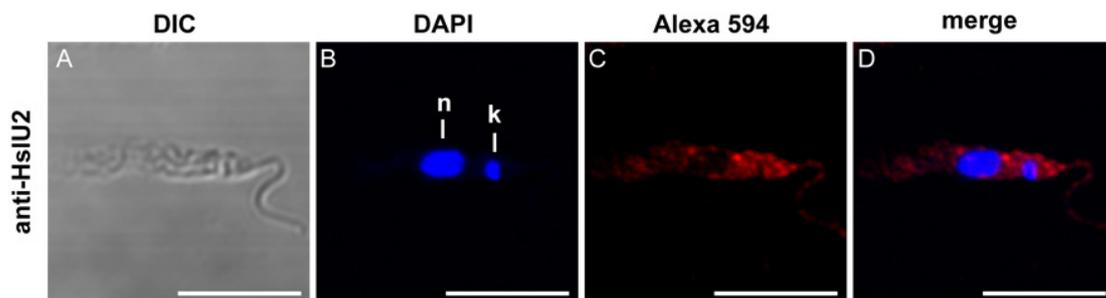


Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation des HslU2 Proteins mittels Indirekter Immunfluoreszenz

(A-D) *L. donovani* Promastigote wurden fixiert und mit anti-HslU2 Serum gefärbt. Phasenkontrast (E), DAPI Färbung des Nukleus und Kinetoplasten (F), immunologischer Nachweis mit anti-HslU2 Serum (G). H zeigt die Überlagerung von DAPI mit der spezifischen anti-HslU2 Färbung. Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ M. k = Kinetoplast; n = Nukleus.

Durch die Verfügbarkeit von spezifischen Antisera war es in beiden Fällen möglich, zusätzlich immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen durchzuführen. Diese wurden wie in 3.2.4.2. beschrieben durchgeführt. Abbildung 30 zeigt die Färbung der Ultradünnschnitte mit dem spezifischen HslU1 Antiserum (A) bzw. dem HslU2 Antiserum (B). Als Negativ-Kontrolle diente ebenfalls natives Mausserum (Vgl. Abb. 27A). In Abbildung 30A sind sich teilende *L. donovani*-Promastigote zu sehen, die mittig je einen Zellkern aufweisen (Pfeilspitzen). In diesem Bereich sind punktuell Goldpartikel zu erkennen. Aber auch außerhalb des Zellkerns finden sich vereinzelt Ansammlungen von 1-3 Goldpartikeln. Für HslU2 ergibt sich ein ähnliches Bild wie in der Immunfluoreszenz. Das Protein ist über das gesamte Zytoplast verteilt, häufig in kleineren Grüppchen (Abb. 30B). In einigen Aufnahmen konnten auch vermehrt Goldpartikel an oder in der Nähe der Geißeltasche beobachtet werden. Eine Besonderheit der immunoelektronenmikroskopischen Aufnahmen

des HslU2 war, dass das Protein zusätzlich auch außerhalb der Zellen verteilt vorlag. Dies stand im Kontrast zu den gleichzeitig vom gleichen Block hergestellten Grids, die mit HslU1 bzw. HslV Antiseren markiert wurden, so dass von einer Signifikanz dieser Beobachtung ausgegangen werden kann. Es könnte somit sein, dass HslU2 über die Geißeltasche aus der Zelle ausgeschleust wird. Für eine weiterführende Untersuchung dieses Phänomens könnten fraktionierende Analysen des Zellpellets und Überstandes der Parasiten hilfreich sein.

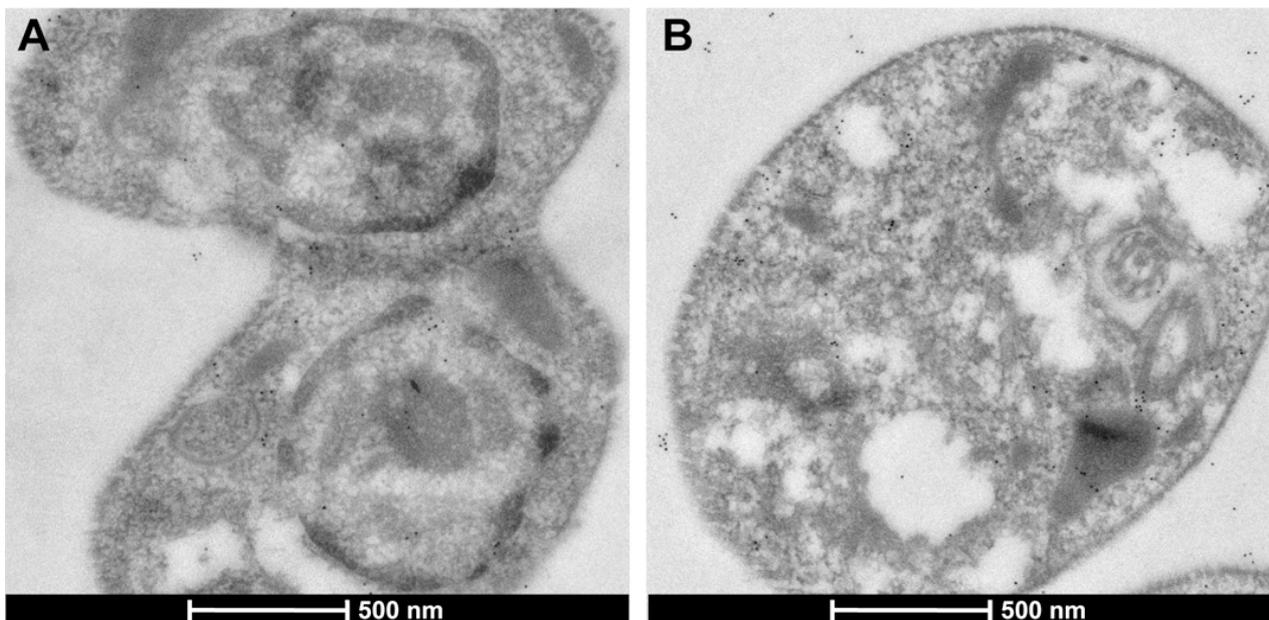


Abb. 30: Immunelektronenmikroskopische Analysen zur Lokalisation von HslU1 und HslU2 in Promastigoten *L. donovani*

Promastigote *L. donovani* wurden in Paraformaldehyd fixiert und in *LR-White*-Harz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit anti-HslU1 Serum (A) oder anti-HslU2 Serum (B) markiert. Die Visualisierung erfolgte mit Kaninchen-anti-Maus Serum und Protein-A-Goldpartikeln (10nm). Die Länge der Balken entspricht 500 nm; Pfeilspitzen markieren Zellkern (A) bzw. Geißeltasche (B).

Anhand der Daten aus der direkten und indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie sowie der immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen kann festgehalten werden, dass HslU1 in *L. donovani* vermehrt im bzw. um Nukleus und Kinetoplast auftritt, wohingegen HslU2 im gesamten Zytosol des Parasiten zu finden ist. Darüber hinaus deutet die Immunelektronenmikroskopie auf eine mögliche Ausschleusung des HslU2 aus der Zelle hin. Ob dies durch das Ausschleusen von Exosomen (Silverman et al., 2010) oder ähnlichen Kompartimenten über die Geißeltasche abläuft, muss in weitergehenden Studien untersucht werden.

3.2.4.4. Kolokalisation in Promastigoten

Um abzuklären, ob HslV mit einem der beiden HslU einen Komplex bildet, wurde eine Kombination aus direkter und indirekter Fluoreszenzmikroskopie angewendet. In diesen

Kolokalisationsstudien kann zugleich die subzelluläre Lokalisation zweier Proteine analysiert werden. Dabei erscheint das eGFP-Fusionsprotein bei Deckungsgleichheit mit dem rot fluoreszierenden Signal des sekundären Antikörpers gelb.

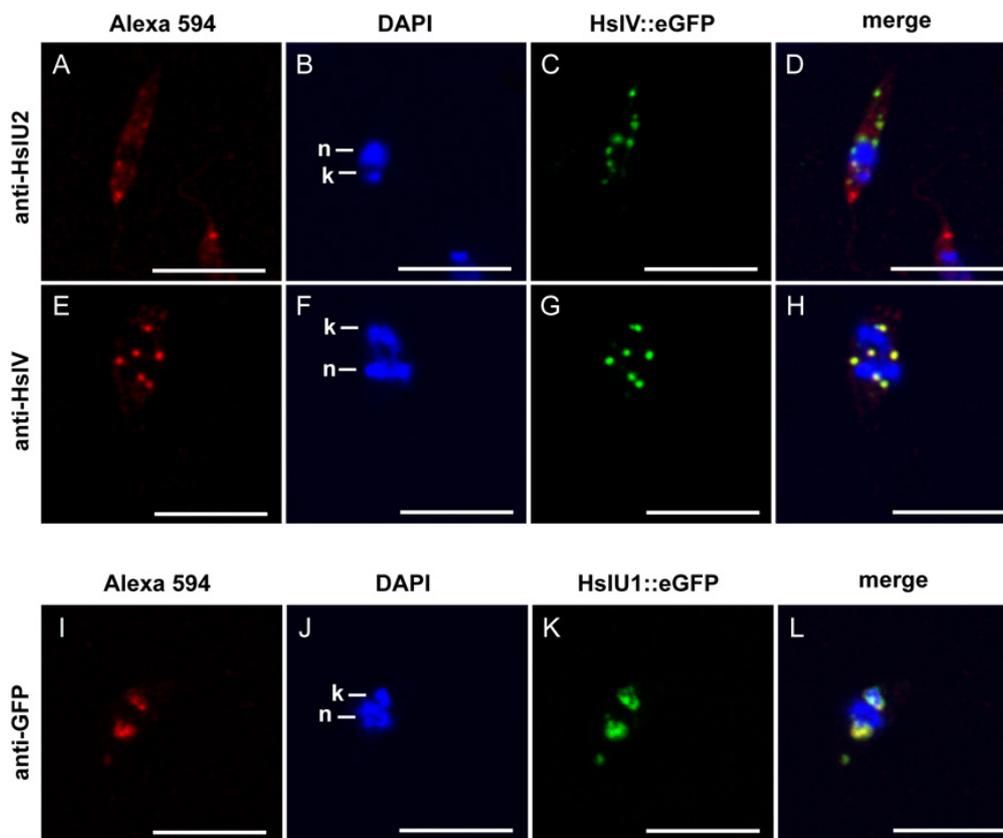


Abb. 31: Kolokalisationsstudien auf Basis der HslV::eGFP und HslU1::eGFP exprimierenden Promastigoten

Fixierte transgene *L. donovani*-pTLv3-HslV::eGFP (A-H) oder *L. donovani*-pTLv3-HslU1::eGFP (I-L) Promastigoten wurden mit spezifischen Antiseren inkubiert. A-D zeigt die Kolokalisation des HslV::eGFP mit dem HslU2 spezifischem Antiserum, in E-H ist die Kolokalisation mit dem spezifischen HslV Antiserum dargestellt. Die Kolokalisation des anti-GFP Antikörpers mit dem HslU1::eGFP ist in I-L gezeigt. Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ M. k = Kinetoplast; n = Nukleus.

Abbildung 31 zeigt die Kolokalisationsstudie von transgenen *L. donovani* Promastigoten, die entweder das HslV::eGFP (Abb. 31A-H) oder das HslU1::eGFP-Fusionsprotein (Abb. 31I-L) exprimieren. Hierfür wurden die Parasiten zunächst fixiert, permeabilisiert und mit den spezifischen Antiseren gegen HslU2 (Abb. 31A-D), HslV (Abb. 31E-H) oder GFP (Abb. 31I-L) gefärbt. Anschließend wurden der Alexa 594-konjugierte sekundäre Antikörper sowie DAPI appliziert. Die *merge* Abbildungen (Abb. 31D, H, L) zeigen die Überlagerung aller drei Farbkanäle (Alexa 594, DAPI, GFP). In Abbildung 31D ist zu erkennen, dass HslV, wie bereits in den Lokalisationsstudien gezeigt, in distinkten Foci vorliegt, wohingegen HslU2 punktuell über die Zelle verteilt ist, mit Schwerpunkt am apikalen Ende. Beide Signale überlagern sich nicht. Somit bilden HslV und HslU2 keine gemeinsamen

Komplexe in Promastigoten. Dies bestätigt die Ergebnisse der nativen PAGE. Abbildung 31H zeigt eine vollkommene Überlagerung des HsIV::eGFP Signals mit dem sekundären Antikörper. Diese Positiv-Kontrolle verifiziert, dass der spezifische Antikörper die selben HsIV Komplexe markiert wie das Fusionsprotein. Eine Kolokalisationsstudie des HsIV::eGFP mit dem HsIU1 Antikörper war bisher nicht erfolgreich. Dies ist in erster Linie auf das HsIU1 Antiserum zurückzuführen, mit dem es bereits in der nativen PAGE nicht möglich war, das HsIU1 Protein nachzuweisen. Möglicherweise ist das native HsIU1 in einen bisher unbekanntem Komplex eingebunden und ist daher nicht zugänglich für das HsIU1 Antiserum.

In Abbildung 31I-L sind die ersten Ergebnisse der Kolokalisationsstudien basierend auf den *L. donovani* [pTLv3- HsIU1::eGFP] dargestellt. Da die Expression des HsIU1::eGFP sehr schwach ist, konnten bisher keine erfolgreichen Kolokalisationsstudien mit den HsIV bzw. HsIU2 Antiseren durchgeführt werden. Nur in der Färbung mit einem GFP Antikörper waren beide Fluoreszenzen ausreichend stark, um für diese Arbeit Verwendung zu finden. In Abbildung 31L kommt es zu einer vollständigen Überlagerung des HsIU1::eGFP mit dem sekundären Antikörper. Dies bestätigt in erster Linie die Echtheit der GFP Fluoreszenz, was für weitere Untersuchungen ein wichtiger Hinweis ist.

Abschließend lässt sich aus den Lokalisations- und Kolokalisationsstudien zusammenfassen, dass HsIV punktuell und häufig randständig in den Promastigoten vorzufinden ist, wohingegen HsIU2 im gesamten Zytosol des Parasiten auftritt. Darüber hinaus zeigten die Aufnahmen, dass HsIU1 in räumlicher Nähe des Nukleus und Kinetoplasten vorliegt, möglicherweise sogar mit diesen Kompartimenten überlagert. Ebenso konnten durch die Identifizierung der subzellulären Lokalisation der HsIV und HsIU Proteine weitere Hinweise bezüglich der Komplexbildung gewonnen werden.

3.2.5. Reverse Genetik zur Analyse der HsIV und HsIU Gene

Zur näheren Untersuchung der biologischen Funktion von Proteinen bietet sich die Herstellung von Genaustauschmutanten an. Da es sich bei HsIV, HsIU1 und HsIU2 um so genannte *single copy* Gene handelt, ist eine Transfektion mit entsprechenden DNA-Genaustauschkonstrukten zur Herstellung von Nullmutanten möglich. Eine anschließende Untersuchung des Phänotyps der Mutanten sollte weitere Rückschlüsse auf die Funktion und Rolle der Proteine geben.

Aus früheren Arbeiten von Sabine Lorenz war bereits eine HsIU2-Genaustauschmutante hervorgegangen (Daten unveröffentlicht), deren Herstellung und phänotypische Analyse später erläutert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Gene für HsIV und HsIU1 in *L. donovani* durch zwei Selektionsmarker ersetzt werden.

3.2.5.1. Klonierung der Genaustauschkonstrukte

Da *Leishmania spp.* diploide Genome aufweisen (Cruz, and Beverley, 1990), müssen die zu deletierenden Gene in zwei aufeinander folgenden Transfektionsexperimenten gegen entsprechende DNA-Konstrukte ausgetauscht werden, die verschiedene Selektionsmarker enthalten. Für diesen Genaustausch werden die Resistenzmarkergene anstelle des Zielgens zwischen die 5'- und 3'-UTRs des Gens kloniert. Nach Linearisierung des Konstruktes, kann dieses mittels homologer Rekombination in das Genom des Parasiten integrieren. In diesem Versuch wurden die Selektionsmarker BleoR und PuroAC eingesetzt, die Resistenz gegenüber Bleomycin bzw. Puromycin verleihen.

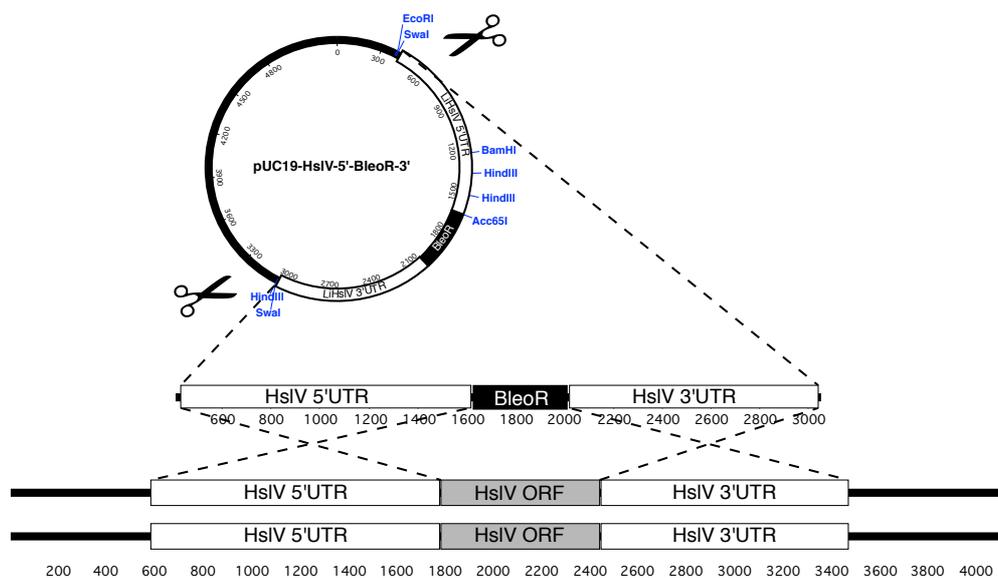


Abb. 32: pUC19-HsIV-5'-BleoR-3' Vektor und Integration der Genaustauschkonstrukte in den Genlokus

Als Matrize bei der Amplifizierung der 5'- und 3'-UTRs des HsIV Gens diente *L. donovani* Wildtyp (WT) DNA. Die UTRs wurden zusammen mit dem Selektionsmarkergenen BleoR in den pUC19 Vektor ligiert. Nach Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzym *Swa1* wurde das Genaustauschkonstrukt in promastigote WT Zellen transfiziert, wo es mittels homologer Rekombination ins Genom integrieren kann. Die so erzeugten Mutanten werden als Einzelallel-Genaustauschmutanten (+/-) bezeichnet, da nur ein Allel ausgetauscht wurde.

Für die Herstellung der DNA-Konstrukte wurden etwa 1.000 Nucleotide der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen von HsIV bzw. HsIU1 mittels PCR von genomischer *L. donovani* Wildtyp DNA amplifiziert. Als *primer* kamen die unter Punkt 2.1.6. aufgelisteten Oligonucleotide zum Einsatz. Die PCR Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und nacheinander in den pUC19 Vektor ligiert. Dabei wurde im Falle von HsIU1 zunächst über die Restriktionsschnittstellen *EcoR1* und *Kpn1* der 5'-UTR integriert, gefolgt von der Integration des 3'-UTR über die Schnittstellen *BamH1* und *Hind3*. Abschließend wurde je eines der beiden Selektionsmarkergene zwischen den *Kpn1* und *BamH1* Schnittstellen eingebaut. Da das HsIV im 5'-UTR sowohl Restriktionsschnittstellen

für *BamH1*, als auch für *Hind3* aufweist, musste hier zunächst der 3'-UTR über die Schnittstellen *Kpn1* und *Bgl2* ligiert werden, bevor der 5'-UTR mit den Restriktionsschnittstellen *Kpn1* und *EcoR1* in den Vektor integriert werden konnte. Das so erhaltene Plasmid pUC19-HsIV-5'3'-UTR wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn1* und *Bgl2* geöffnet, um die mit *Kpn1* und *BamH1* geschnittenen Selektionsmarkergene zu integrieren. Die Fusion von *BamH1* bzw. *Bgl2* geschnittenen DNA-Fragmenten über die kompatiblen Enden führte zum Verlust beider Schnittstellen im fertigen Konstrukt. Abbildung 32 zeigt exemplarisch das Genaustauschkonstrukt des HsIV Gens inklusive relevanter Restriktionsschnittstellen. Darunter ist schematisch die Integration des linearisierten DNA-Konstruktes in den Genloкус gezeigt. Die korrekte Integration der UTR-Sequenzen wurde mittels analytischem Verdau und abschließender Sequenzierung der Plasmide verifiziert (nicht dargestellt). Nach Linearisierung der Genaustauschkonstrukte durch *Swa1* konnten diese für die Transfektionen verwendet werden.

3.2.5.2. Klonierung der *gene add back* Konstrukte

Werden Gene ausgetauscht oder deletiert, die für den Parasiten lebensnotwendig sind, resultiert dies in nicht-lebensfähigen Zellen. Ist es wiederholt nicht möglich, Nullmutanten zu erzeugen, wird dies als Beweis für die lebenswichtige Bedeutung eines Gens angesehen. Ebenso kann die Anzucht von Nullmutanten scheitern, wenn die Genaustauschkonstrukte nicht integrieren und somit keine Antibiotika-Resistenz vermittelt wird. Um letzteres auszuschließen, sollten so genannte *gene add back* Konstrukte hergestellt werden. Hierbei wird eine zusätzliche Kopie des Gens durch homologe Rekombination in einen Genloкус integriert, der für ein hohes Transkriptionsniveau in den Parasiten sorgt (vgl. Punkt 3.1.10.1.). Vor diesem *add back* Hintergrund sollte es dann möglich sein, beide natürlichen Allele gegen die Selektionsmarkergene zu tauschen.

Für die Herstellung der DNA-Konstrukte wurden die ORF inklusive des anschließenden 3'-UTR mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamH1* und *Xba1* (für HsIV) bzw. *Bcl1* und *Xba1* (für HsIU1) in den pIRmcs3+ Vektor (Hoyer et al., 2004) ligiert. Nach Untersuchung auf korrekten Einbau der DNA mittels Sequenzierung wurden die Plasmide mit *Swa1* linearisiert.

3.2.5.3. Transfektion und Selektion

Die Transfektion der linearisierten Genaustausch- und *gene add back*-Konstrukte erfolgte in *L. donovani* Wildtyp Zellen. Promastigote, die sich unter Selektion des jeweiligen Antibiotikums vermehrten, wurden durch serielle Verdünnung kloniert und anschließend mittels PCR-Analysen verifiziert. Dafür wurden verschiedene *primer*-Kombinationen verwendet, die exemplarisch für HsIV in Abbildung 33 dargestellt sind. Zur Verifizierung der korrekten Integration des *gene add back* in den 5'- bzw. 3'-Bereich des ssu rRNA Gens kamen die

primer-Kombinationen rDNAflank-5'fwd/LST-IR-rev bzw. rDNAflank-3'rev/DHFR-TS-fwd zur Anwendung.

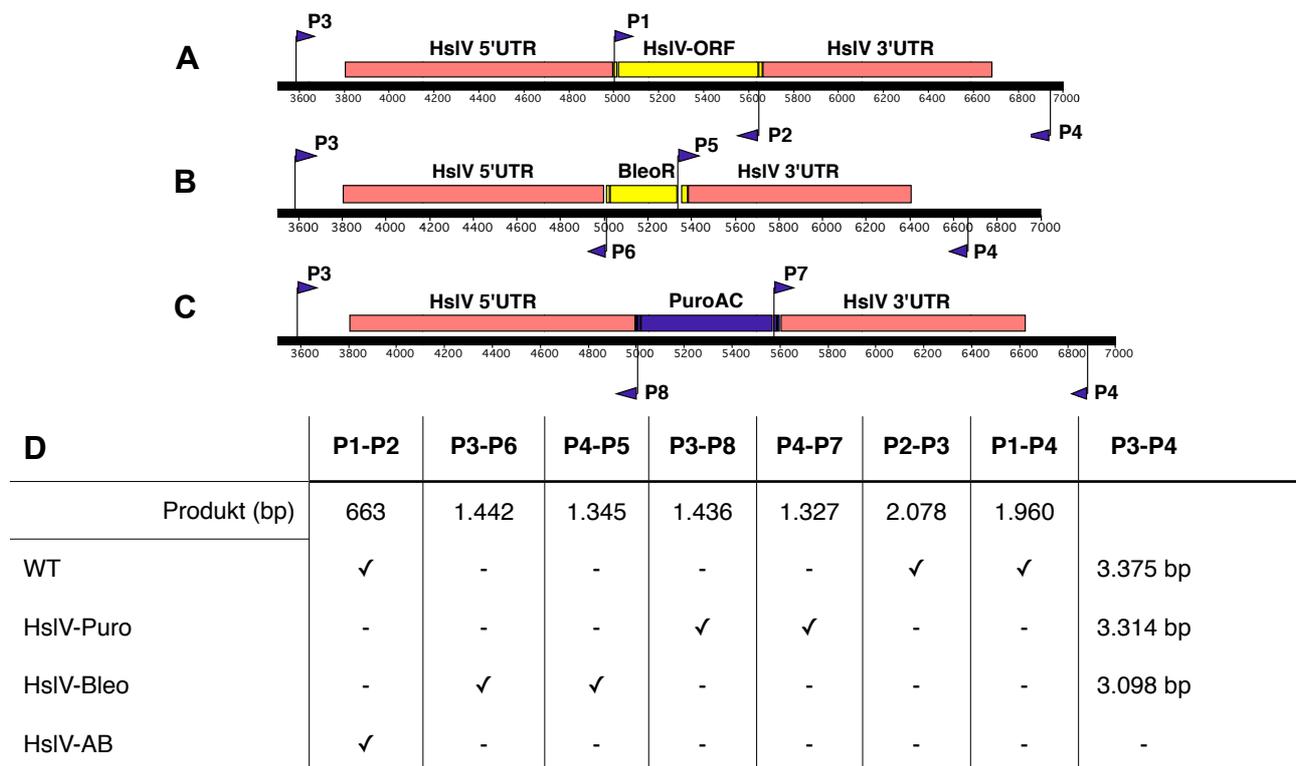


Abb. 33: PCR Strategie zur Identifizierung von HsIV-rekombinanten Parasiten

Schematische Darstellung des HsIV-ORF inklusive der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen (A). Abbildung (B) und (C) zeigen die Einzelallele mit den integrierten Selektionsmarkern Bleo (B) bzw. Puro (C). Die Positionen für die verschiedenen *primer* sind mit **P1-P8** angegeben. Die Pfeile geben die jeweilige Richtung der *primer* an. Die *primer*-Kombination **P3-P4** stellt eine PCR über den gesamten HsIV-Lokus dar, der durch Einbringen der Resistenzgene verkürzt wird. Die Oligonukleotide **P1/P2** amplifizieren den ORF des Gens. (D) Tabellarische Darstellung verschiedener *primer*-Kombinationen für HsIV PCRs. Die Größen der PCR Produkte für die verschiedenen Allele sind in bp angegeben. Positive PCR-Signale sind mit ✓ gekennzeichnet, negative PCR-Signale mit -. WT: *L. donovani* Wildtyp; HsIVPuro: HsIV-PuromycinAC; HsIV-Bleo: HsIV-Bleomycin; HsIV-AB: HsIV *add back*.

Es war sowohl für HsIV als auch für HsIU1 möglich, die *gene add back* Konstrukte zu integrieren, so dass so genannte *knock-in*-Mutanten entstanden (+/+). Diese konnten neben dem *L. donovani* Wildtyp als Grundlage für die Transfektionen mit den Genaustauschkonstrukten eingesetzt werden.

Für HsIU1 war es trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, Nullmutanten zu erzeugen. Ein häufig auftretendes Problem war, dass zwar wiederholt doppelt-resistente Promastigoten sowohl im *L. donovani* Wildtyp als auch im *L. donovani* HsIU1^{+/+} Hintergrund selektiert werden konnten, diese aber in den anschließenden PCR Analysen falsch-positiv waren. Die Mutanten besaßen also trotz der Integration beider Selektionsmarkergene noch das ursprüngliche HsIU1 Gen. Es ist bekannt, dass Leishmanien in der Lage sind, ganze

Genabschnitte im Genom zu duplizieren (Cruz et al., 1993). Auch ein Wechsel der Transfektionsstrategie auf die gleichzeitige Integration der Selektionsmarkergene, wie es kürzlich beschrieben wurde (Ommen et al., 2009b), erbrachte keine besseren Resultate. Das Austauschen eines HslV Allels war hingegen im ersten Schritt erfolgreich. Allerdings war es nicht möglich, lebensfähige Nullmutanten zu erzeugen. Der Austausch des zweiten natürlichen Allels gelang nur in den *L. donovani*, die eine zusätzliche Genkopie des HslV besaßen, so dass HslV^{-/+} Mutanten entstanden.

3.2.6. Verifizierung und Charakterisierung der Genaustauschmutanten

Zur Verifizierung und Charakterisierung der verschiedenen erzeugten Mutanten kamen sowohl PCR Analysen, als auch Untersuchungen auf Proteinebene zum Einsatz. Ebenso wurde der Phänotyp der entstandenen Mutanten mittels Wachstumskurven und Mikroskopie untersucht.

3.2.6.1. Untersuchungen des HslU2 Gens

Die Herstellung der HslU2 Genaustauschkonstrukte und *knock-in* Mutanten erfolgte analog der in 3.2.5. beschriebenen Vorgehensweise für HslU1. Lediglich die Integration des HslU2 ORF in das *gene add back* Konstrukt erfolgte mit *BamH1* statt *Bcl1*. Die Transfektions- und Selektionsstrategie entsprach ebenso der des HslU1, mit der Ausnahme, dass lebensfähige Nullmutanten generiert werden konnten. Diese wurden bereits erfolgreich von Sabine Lorenz auf DNA-Ebene verifiziert und phänotypisch weitestgehend charakterisiert (Daten unveröffentlicht). Sie konnte in PCR Analysen zeigen (Abb. 34A), dass das Gen für HslU2 durch die verkürzten Genaustauschkonstrukte ersetzt war. Die von ihr verwendeten Oligonukleotide P3/P4 binden spezifisch in den 5'-UTR bzw. 3'-UTR-flankierenden Bereichen des HslU2 Gens, außerhalb der Genaustauschkonstrukte. Dabei entstehen durch Integration eines Genaustauschkonstruktes jeweils verkürzte PCR-Produkte (Abb. 34A). Durch die gewählte *primer*-Kombination ist eine Amplifizierung des *add back* nicht möglich (Vgl. Abb. 33).

Eine weitergehende morphologische Untersuchung mittels Giemsa-Färbung zeigte keine Unterschiede zwischen den Deletions- bzw. *gene add back*-Mutanten und dem *L. donovani* Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss der Gendeletion auf das Zellwachstum zu untersuchen wurde eine *in vitro* Proliferationsstudie bei 25°C durchgeführt (Abb. 34B). Hierfür wurden 1x10⁶ Zellen/ml aus der logarithmischen Wachstumsphase ausgesät und das Zellwachstum über 3 Tage aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass das Wachstum der HslU2^{-/-} Mutante signifikant geringer war als das des Wildtyps. Darüber hinaus konnten die Parasiten nicht die Zelldichte des Wildtyps erreichen. Dieser Effekt konnte durch die *gene add back* Mutante HslU2^{-/+} nahezu aufgehoben werden (Abb. 34B).

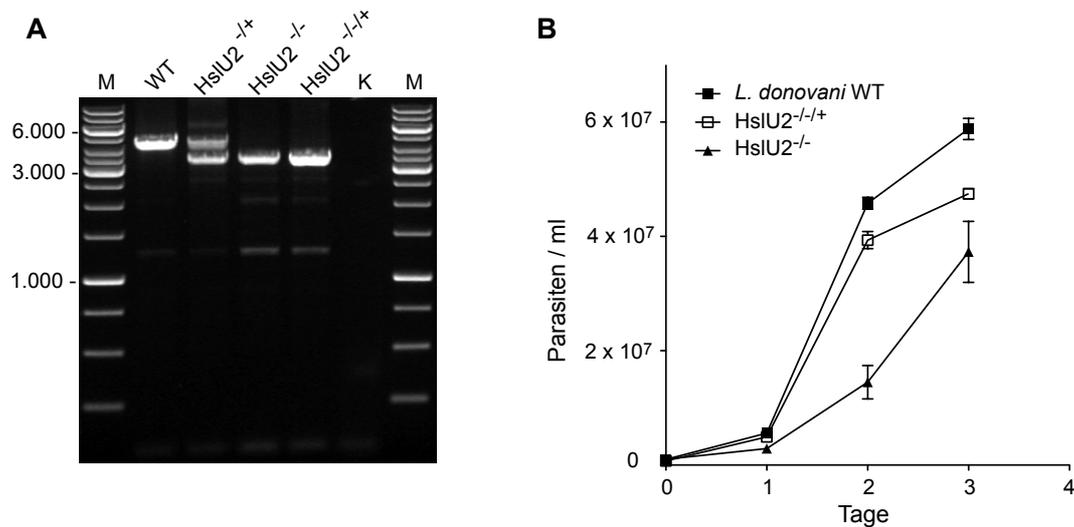


Abb. 34: PCR-Nachweis der HslU2 Genaustauschmutante und phänotypische Analyse

(A) PCR Ergebnis mit genomischer DNA von *L. donovani* Wildtyp (WT), *HslU2*^{-/+}, *HslU2*^{-/-} und *HslU2*^{-/-/+} Parasiten sowie einer Negativ-Kontrolle (K). Es wurden die 5'- und 3'-flankierenden *HslU2* primer P3 und P4 verwendet. (B) Wachstumskinetik (n=4) des *L. donovani* Wildtyp (■) und der Mutanten *HslU2*^{-/-} (▲) und *HslU2*^{-/-/+} (□). Promastigote wurden mit 1×10⁶ Zellen/ml ausgesät und das Zellwachstum über 3 Tage verfolgt. Die Fehlerbalken geben den *standard error of means* an (SEM).

In Ermangelung von Antikörpern konnte die Nullmutante zum damaligen Zeitpunkt nicht auf Proteinebene verifiziert werden. Dies konnte nun im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt werden. Dazu wurde Gesamtzellextrakt aus 1×10⁷ *L. donovani* Wildtyp, *L. donovani* *HslU2*^{-/-}, *L. donovani* *HslU2*^{-/-/+}, sowie *L. donovani* *HslU2*^{+/+} in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit dem *HslU2* Antiserum nachgewiesen.

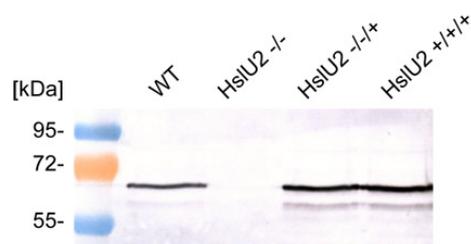


Abb. 35: Western Blot zur Verifizierung der HslU2 Genaustauschmutante

In 10%igem SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 1×10⁷ Promastigote von *L. donovani* Wildtyp, *L. donovani* *HslU2*^{-/-}, *L. donovani* *HslU2*^{-/-/+} und *L. donovani* *HslU2*^{+/+} nach Lyse aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit spezifischem *HslU2* Antiserum. Nicht dargestellt ist das Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte Kontrollgel. Die Größen des 1 kb Marker sind links dargestellt.

Wie die Abbildung 35 zeigt, ist in der *HslU2* Genaustauschmutante kein *HslU2* Protein mehr nachweisbar. Hingegen nimmt die Intensität der *HslU2* Proteinbande in den *gene*

add back Klonen (HslU2^{-/+}, HslU2^{+/+}) im Vergleich zum Wildtyp um das doppelte bis dreifache zu. Dies beruht auf der Integration des *add back* in den *ssu rRNA* Locus, wo es zu einer deutlichen Überexpression des Proteins kommt.

Zusammengefasst handelt es sich beim HslU2 nicht um ein essenzielles Gen des Parasiten *L. donovani*, da eine lebensfähige Nullmutante erzeugt werden konnte. Die Deletion des HslU2 hemmt jedoch das Wachstum der Parasiten *in vitro*, was durch Integration einer zusätzlichen Genkopie partiell aufgehoben werden konnte.

3.2.6.2. Untersuchungen des HslV Gens

Aus der Transfektion und Selektion der HslV Genaustauschkonstrukte in den *L. donovani* Wildtyp bzw. HslV^{+/+} gingen mehrere putative HslV^{-/-} bzw. HslV^{-/+} Einzelklone hervor, die im Weiteren mittels PCR Analysen untersucht wurden.

Abbildung 36 zeigt die PCR Ergebnisse zur Verifizierung der putativen HslV^{-/-} Nullmutanten. Hierfür wurde genomische DNA (gDNA) von *L. donovani* Wildtyp, HslV^{-/+}, HslV^{+/+} und acht putativen Einzelklonen HslV^{-/-} eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente Aqua bidest an Stelle der gDNA. Die korrekte Integration der Puro- bzw. Bleo-Genaustauschkonstrukte in den putativen HslV^{-/-} war zuvor mittels PCR-Analysen verifiziert worden (nicht dargestellt).

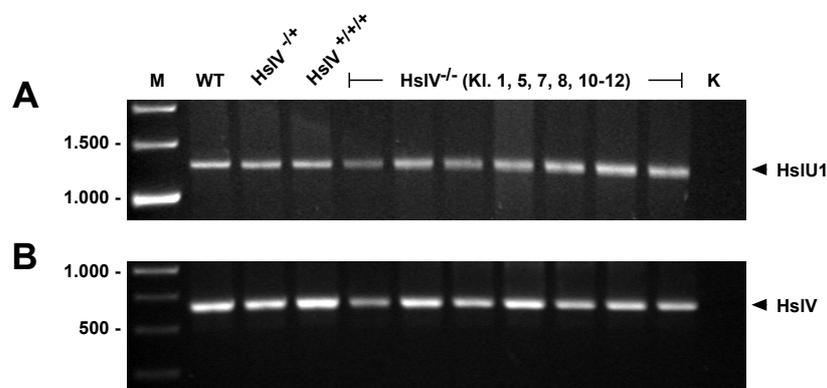


Abb. 36: PCR Analysen von putativen HslV-Nullmutanten

Genomische DNA von *L. donovani* Wildtyp (WT), HslV^{-/+}, HslV^{+/+}, sowie 8 Einzelklonen von putativen HslV^{-/-} Mutanten wurde als Matrize in den PCRs eingesetzt. Amplifiziert wurde der HslU1 ORF mit den genspezifischen HslU1 Oligonukleotiden P1/P2 (A) und der HslV ORF mit den genspezifischen HslV Oligonukleotiden P1/P2 (B). Dabei entstehen PCR Produkte von 1.272 bp (HslU1) bzw. 663 bp (HslV). M: 1 kb Marker, K: Negativ-Kontrolle (H₂O als *Template*).

Eine PCR mit den HslU1 genspezifischen Oligonukleotiden P1/P2 wurde durchgeführt, um die verwendete gDNA zu kontrollieren. Mit jeder eingesetzten gDNA konnte das HslU1 Gen nahezu gleich stark amplifiziert werden (Abb. 36A). Darüber hinaus erbrachte die PCR auf den ORF des HslV mit den HslV genspezifischen Oligonukleotiden P1/P2 ebenso

ein Amplifikat (Abb. 36B). Obwohl die HsIV^{-/-} Klone unter Bleo- und Puro-Selektion anwachsen, wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass sie das HsIV Gen noch besitzen und somit als falsch-positiv anzusehen sind.

Die Selektion der Genaustauschmutanten brachte jedoch auch HsIV^{-/+} Mutanten hervor. Diese wurden ebenso auf korrekte Integration der Puro- bzw. Bleo-Genaustauschkonstrukte mittels PCR untersucht (Daten nicht dargestellt). Anschließend erfolgte eine spezifische 5'3'-flank PCR mit den Oligonukleotiden P3/P4 auf den gesamten HsIV-Lokus. Dabei binden die *primer* außerhalb der für die Genaustauschkonstrukte verwendeten 5'- bzw. 3'-UTR-Bereiche und amplifizieren somit den HsIV Genlocus samt flankierender Sequenzen. In dieser PCR wurde genomische DNA von *L. donovani* Wildtyp, HsIV^{-/+}, HsIV^{+/+} und HsIV^{-/+} eingesetzt. Folglich entsteht mit Wildtyp gDNA ein 3.375 bp großes Produkt, Parasiten mit integriertem Puro-Genaustauschkonstrukt weisen zusätzlich eine 3.314 bp große Bande auf, die mit Bleo transfizierten Leishmanien zeigen eine Bande bei 3.098 bp (Vgl. Abb. 33). Somit muss HsIV^{-/+} Mutanten, bei denen beide HsIV Allele erfolgreich ausgetauscht wurden, die Bande bei 3.375 bp fehlen. Dies war bei dem in Abbildung 37 eingesetzten Einzelklon von HsIV^{-/+} der Fall.

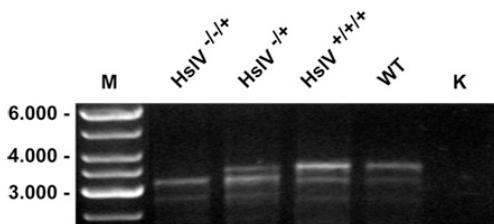


Abb. 37: PCR Analyse der HsIV^{-/+} Mutanten

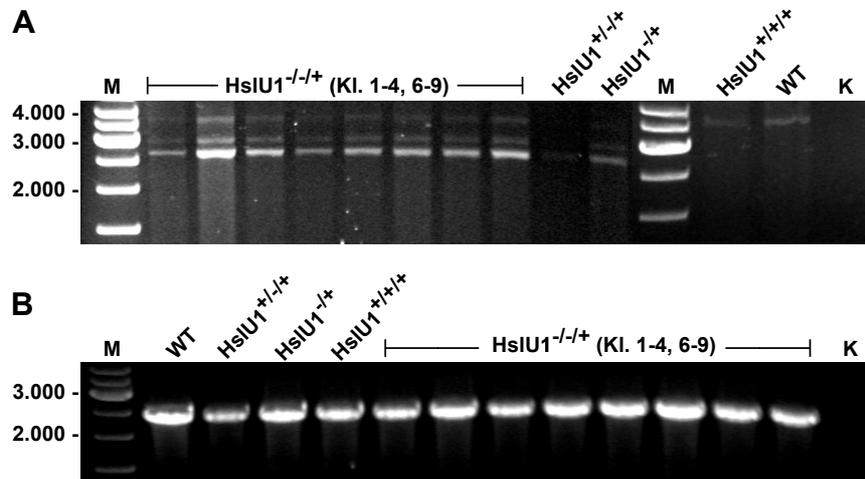
Genomische DNA von *L. donovani* WT, HsIV^{-/+}, HsIV^{+/+} und einer putativen HsIV^{-/+} Mutante dienten als Matrize in der PCR. Mittels 5'- und 3'-HsIV *flank primer* (P3/P4) wurde der gesamte HsIV-Lokus amplifiziert, der durch das Einbringen der Resistenzgene verkürzt vorliegt. M: 1 kb Marker, K: Negativ-Kontrolle (H₂O als *Template*).

Für die Analyse des HsIV ergibt sich damit, dass es zwar nicht möglich war, lebensfähige Nullmutanten zu erzeugen, wohl aber, auf Basis des *gene add back* beide HsIV Allele auszutauschen. Dies belegt, dass es sich bei HsIV um ein essenzielles Gen für *L. donovani* handelt.

3.2.6.3. Untersuchungen des HsIU1 Gens

Für die Untersuchung von HsIU1 war es trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, lebensfähige Nullmutanten zu erzeugen. Putativ erzeugte Nullmutanten von Sabine Lorenz stellten sich im Nachhinein als falsch positiv heraus (Daten nicht dargestellt). Es war im Laufe dieser Arbeit jedoch möglich, HsIU1 Genaustauschmutanten auf Basis der HsIU1^{+/+} Mutante zu erstellen, welche im Weiteren mittels PCR-Analyse charakterisiert wurden. Der korrekte Einbau der Puro- bzw. Bleo-Genaustauschkonstrukte konnte mittels spezifischer PCR-Analysen verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Mittels der *primer*-Kombination P3/P4 wurde, wie bereits in 3.2.6.2. beschrieben, der gesamte HsIU1-Genlocus amplifiziert. Als genomische DNA wurde in dieser PCR der *L. donovani* Wildtyp

eingesetzt, ebenso wie HslU1^{+/+/+}, HslU1^{+/-}, HslU1^{-/-+} und acht Einzelklone des putativen HslU1^{-/-+}. Als Negativ-Kontrolle diente erneut dH₂O. Die dabei entstehenden Amplifikate entsprechen 3.771 bp (WT Genlokus), 2.890 bp (Puro Integration) und 2.674 bp (Bleo Integration).



C	P1-P2	P3-P6	P4-P5	P3-P8	P4-P7	P2-P3	P1-P4	P3-P4
Produkt (bp)	1.272	1.089	1.274	1.083	1.256	2.504	2.539	
WT	✓	-	-	-	-	✓	✓	3.771 bp
HslU1-Puro	-	-	-	✓	✓	-	-	2.890 bp
HslU1-Bleo	-	✓	✓	-	-	-	-	2.674 bp
HslU1-AB	✓	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 38: PCR Analysen und Strategie zur Identifizierung von HslU1 Genaustauschmutanten

(A) PCR Analyse des HslU1 Genlokus inklusive der 5'- und 3'-UTRs mit der *primer*-Kombination P3-P4. Durch das Einbringen der Resistenzgene in den ORF wird das PCR Produkt verkürzt. Als *template* diente genomische DNA von *L. donovani* Wildtyp (WT), acht putativen HslU1^{-/-+} Klonen und Einzelklonen von HslU1^{+/+/+}, HslU1^{+/-} und HslU1^{-/-+}. (B) Die selbe genomische DNA wie unter (A) diente hier zur Amplifizierung des HslU1 ORF inklusive dem 3'-UTR. Eingesetzt wurde die *primer*-Kombination P1-P4. (C) Tabellarische Darstellung verschiedener *primer*-Kombinationen für HslU1 PCRs. Die Größen der PCR Produkte für die verschiedenen Allele sind in bp angegeben. Positive PCR-Signale sind mit ✓ gekennzeichnet, negative PCR-Signale mit -. WT: *L. donovani* Wildtyp; HslU1Puro: HslU1-PuromycinAC; HslU1-Bleo: HslU1-Bleomycin; HslU1-AB: HslU1 *add back*. Als Größenstandard (M) diente ein 1 kb DNA-Marker, der in (A) und (B) links angezeigt ist.

Wie aus Abbildung 38A zu entnehmen ist, amplifizieren die *primer* in allen HslU1^{-/-+} Klonen neben den Banden für Puro und Bleo auch ein Bande für den Wildtyp Genlokus. Es scheint, als ob die Leishmanien neben den korrekt eingebauten Puro- bzw. Bleo-Genaustauschkonstrukten zusätzlich den ORF des HslU1 Gens kopiert hätten. Wie bereits erwähnt, sind Leishmanien durchaus in der Lage, ganze Genabschnitte zu kopieren. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden P1 und P4 durch-

geführt. Diese *primer* binden spezifisch am Startcodon des HslU1 Gens und außerhalb des 3'-UTR des HslU1 Gens, der für die Genaustauschkonstrukte Verwendung fand (Vgl. Abb. 33). Mit dieser PCR entsteht nur ein Konstrukt, wenn das Wildtyp Allel in den Parasiten noch vorhanden ist, nicht aber durch Einführung des *gene add back*. Abbildung 38B zeigt, dass bei allen HslU1^{-/-+} Mutanten ein Produkt entstand. Daher sind diese HslU1^{-/-+} Einzelklone als falsch-positiv anzusehen. Es bleibt somit weiterhin offen, welche Rolle HslU1 im Lebenszyklus von *L. donovani* spielt.

3.2.7. Komplementationsanalyse der HslV und HslU Proteine

Zur weiteren Funktionsaufklärung der HslV und HslU Proteine wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt, in der die *Leishmania* Proteine in entsprechenden Nullmutanten von *E. coli* zur Expression gebracht werden sollten.

Einer von Kanemori et al. (Kanemori et al., 1997) hergestellten *E. coli* Mutante (KY2266) fehlen die Gene *hslVU*, *lon* und *clpXP*. Anstelle dieser Gene sind Resistenzgene gegen die Antibiotika Chloramphenicol (*cat*) und Tetrazyklin (*tet*) eingesetzt worden. Diese Mutante, die auf Basis des *E. coli* Wildtyp MC4100 entstanden ist, weist einen hitzesensitiven Phänotyp auf (Kanemori et al., 1999). Die Idee bestand darin, die *L. donovani* HslV und HslU Sequenzanaloge in der Triple-*knock out*-Mutante zur Expression zu bringen. Dadurch sollte geklärt werden, ob die *Leishmania* Gene die Funktion des *E. coli* HslVU übernehmen können, also funktionell homolog sind. Als Kontrolle wurde die Mutante auch mit den natürlichen *E. coli* *hslVU* Genen exprimiert, die den hitzesensitiven Phänotyp aufheben sollte.

Dafür mussten die Gene zunächst kloniert und in einem Vektor zur Überexpression gebracht werden. Hierbei lag das Augenmerk vor allem auf einem möglichst natürlichen Expressionsniveau der Gene. Um dies zu bewerkstelligen, wurde das *low copy* Plasmid pET16b gewählt, das den Bakterien durch das integrierte *bla*-Gen eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt. Darüber hinaus wurde an Stelle des T7-Promotors der natürliche Promotor des *hslvu* Operons aus *E. coli* verwendet. Hiermit sollte ebenso eine dem nativen Gen so ähnlich wie mögliche Expression erreicht werden.

3.2.7.1. Klonierung der Komplementationsplasmide

Für die Konstruktion der Komplementationsplasmide sollte der 5.711 bp große pET16b als Basis verwendet werden. Da durch das Einbringen der verschiedenen Gene der Vektor deutlich größer werden würde, als für eine erfolgreiche Transformation in *E. coli* sinnvoll ist, wurde das Plasmid zunächst um ca. 1.500 bp verkleinert. Nach Linearisierung mit den Restriktionsschnittstellen *Eco*N1 und *Nru*1 und anschließender Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym, wurde der Vektor zum 4.144 bp Plasmid pMC01 religiert (Abb. 39). Um eine natürliche Expression der Gene zu gewährleisten, wurde der *E. coli* HslVU Promotor in

einer PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *Bgl*2 und *Xba*1 in das pMC01 Plasmid ligiert. Das daraus resultierende pMC02 Plasmid, welches als Grundlage für alle weiteren Klonierungsschritte diente, wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung auf korrekten Einbau des Promotors analysiert.

Im Anschluss erfolgte die Amplifizierung und Integration der einzelnen Gene in das pMC02 Plasmid. Hierzu wurde zunächst das *E. coli* HslVU mittels spezifischer *primer* amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Pml*1 und *Bam*H1 verdaut und in das pMC02 Plasmid integriert. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liegen das HslV und HslU in *E. coli* in einem Operon vor. Somit konnten beide Gene gemeinsam in einer PCR amplifiziert werden.

Dagegen befinden sich die analogen Gene aus *L. donovani* auf verschiedenen Chromosomen und mussten folglich nacheinander in das Plasmid kloniert werden. Weiterhin ist zu beachten, dass das *L. donovani* HslV Protein am N-Terminus etwa 20 Aminosäuren länger ist, als das *E.coli* HslV. Um zu untersuchen, ob diese zusätzliche Domäne einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat, wurden sowohl eine verkürzte Variante (HslVshort), als auch die native, lange Version des Gens (HslVlong) mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *Pml*1 und *Bam*H1 in das pMC02 Plasmid ligiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der HslU1 und HslU2 Gene mit den spezifischen Oligonukleotiden und die nachfolgende Integration in das pMC02-HslVshort bzw. pMC02-HslVlong Plasmid über die Restriktionsschnittstellen *Nde*1 und *Bam*H1. Um zusätzlich die Funktion der einzelnen Proteine untersuchen zu können, wurden abschließend die HslU1 bzw. HslU2 Gene amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *Pml*1 bzw. *Bam*H1 in das pMC02 Plasmid integriert. Dabei wurde die intergenische Sequenz aus dem HslVU-Operon von *E. coli* zwischen die Gene eingefügt, um Vergleichbarkeit mit dem *E. coli* HslVU Gencluster zu erzielen.

Die Klonierung und Orientierung der integrierten Gene in den pMC02 Vektor wurde durch verschiedene Restriktionsverdau und anschließende analytische Agarosegelelektrophorese überprüft. Ebenso erfolgte eine Sequenzierung der einzelnen Plasmide. Ein schematischer Ablauf der Klonierung inklusive aller relevanter Restriktionsschnittstellen ist in Abbildung 39 dargestellt.

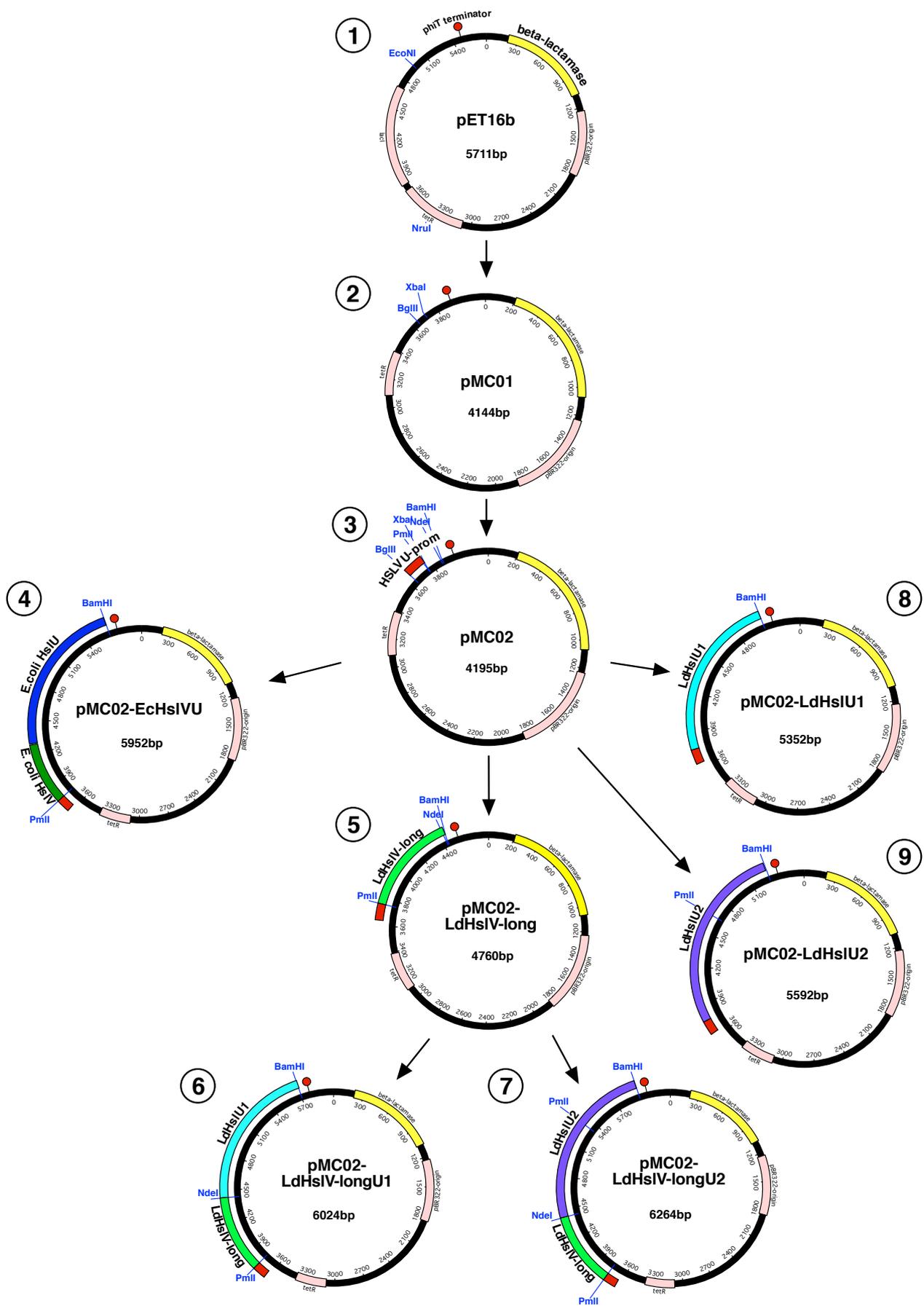


Abb. 39: Klonierungsschema der Komplementationsplasmide

Für die Herstellung der Komplementationsplasmide diente der pET16b Vektor (①) als Ausgangskonstrukt. Nach Verkleinerung des Plasmids um ca. 1.500 bp über die Restriktionsschnittstellen *Eco*NI und *Nru*I entstand das Plasmid pMC01 (②). Für die Konstruktion des pMC02 wurde der *E. coli* HslVU Promotor über die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Xba*I in den pMC01 Vektor ligiert (③). Anschließend erfolgte die Integration der einzelnen Gene, beginnend mit dem *E. coli* HslVU (EcHslVU) bzw. dem gesamten *L. donovani* HslV (LdHslVlong) über die Schnittstellen *Pml*I und *Bam*HI (④, ⑤). Für die Einzelgen-Plasmide wurden die *L. donovani* HslU1 (LdHslU1) bzw. HslU2 (LdHslU2) über die gleichen Schnittstellen in das pMC02 Plasmid ligiert (⑧, ⑨). Als letzter Schritt erfolgte die Ligation des HslU1 bzw. HslU2 in das bereits existierende HslVlong Plasmid über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI (⑥, ⑦). Nicht dargestellt sind die Konstrukte mit dem verkürzten HslV (HslVshort), da sie analog zu den HslVlong Versionen hergestellt wurden.

3.2.7.2. Transformation und Expressionsnachweis der pMC02 Plasmide

Für die Komplementationsanalyse wurden alle unter 3.2.7.1. klonierten Plasmide in kompetente Zellen der Triple-*knock out*-Mutante KY2266 transformiert. Erhaltene Einzelkolonien wurden durch Mini-Präparation und nachfolgenden analytischen Restriktionsverdau analysiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Jeweils ein positiver Klon wurde für weitere Untersuchungen verwendet. Um zu überprüfen, ob die klonierten Gene in der KY2266 Mutante exprimiert werden, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Bakterien wurden bis zu einer OD von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte von *E.coli* MC4100 Wildtyp, KY2266 und allen KY2266 Mutanten in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Proteintransfer auf eine PVDF Membran erfolgte der Nachweis der Proteine mit den spezifischen Antisera für HslV, HslU1 und HslU2 (Abb. 40).

Das HslV Antiserum erkennt ausschließlich die *Leishmania* HslV Proteine (Abb. 40A). Im MC4100 Wildtyp, in der KY2266 Mutante, sowie in den transformierten KY2266 mit pMC02, EcHSLVU, HslU1 und HslU2 kann kein HslV nachgewiesen werden. Sowohl in den HslVlong, als auch in den HslVshort Konstrukten treten Banden mit dem HslV Antikörper auf. Dabei ist in den HslVshort Plasmiden die erwartete Bande bei ca. 24 kDa vorhanden. Die Plasmide, die das HslVlong Konstrukt beinhalten, weisen zwei Banden auf. Grund hierfür sind möglicherweise zwei alternative Startcodons zu Beginn des HslVlong Leserahmens. *E. coli* ist in der Lage, neben der üblichen Startsequenz ATG auch ein alternatives Startcodon zu nutzen (GTG). Dadurch entsteht beim HslVlong ein um etwa 2 kDa verkürztes Produkt.

Das HslU1 wird in allen Stämmen erkannt, die Konstrukte für das HslU1 beinhalten (Abb. 40B). Darüber hinaus wird eine in der Größe leicht abweichende Bande im Stamm mit dem EcHslVU-Konstrukt erkannt. Hierbei könnte es sich um eine schwache Kreuzreaktion mit dem *E. coli* HslU handeln, das etwa 49,6 kDa groß ist. Ein Fehlen der möglichen

kreuzreagierenden Bande im MC4100 Wildtyp könnte durch die geringere Expression des HslU in diesem Stamm erklärt werden. In allen anderen Mutanten ist kein HslU1 nachweisbar. Aufgrund von Unstimmigkeiten in der Sequenz des pMC02-HslU1 Plasmids wurde die KY2266-pMC02-HslU1 Mutante nicht für die Komplementationsanalyse verwendet.

Auch HslU2 konnte in allen HslU2-exprimierenden Mutanten verifiziert werden (Abb. 40C). Ähnlich wie beim HslV traten in den HslVshortU2 und HslVlongU2 Konstrukten zwei spezifische Banden auf. Dies ist erneut auf ein alternatives Startcodon in der HslU2 Sequenz zurückzuführen. Durch Sequenzanalysen des pMC02-HslU2 Plasmids konnte geklärt werden, dass ein Fehlen der größeren und richtigen ~57 kDa Bande auf das Fehlen des Startcodons inkl. 7 Basen zurückzuführen ist. Dadurch beginnt die HslU2 Transkription in dieser Mutante erst ab dem alternativen Start. Aufgrund dieser Sequenziererergebnisse wurde auch die KY2266+pMC02-HslU2 Mutante von der Komplementationsanalyse ausgeschlossen.

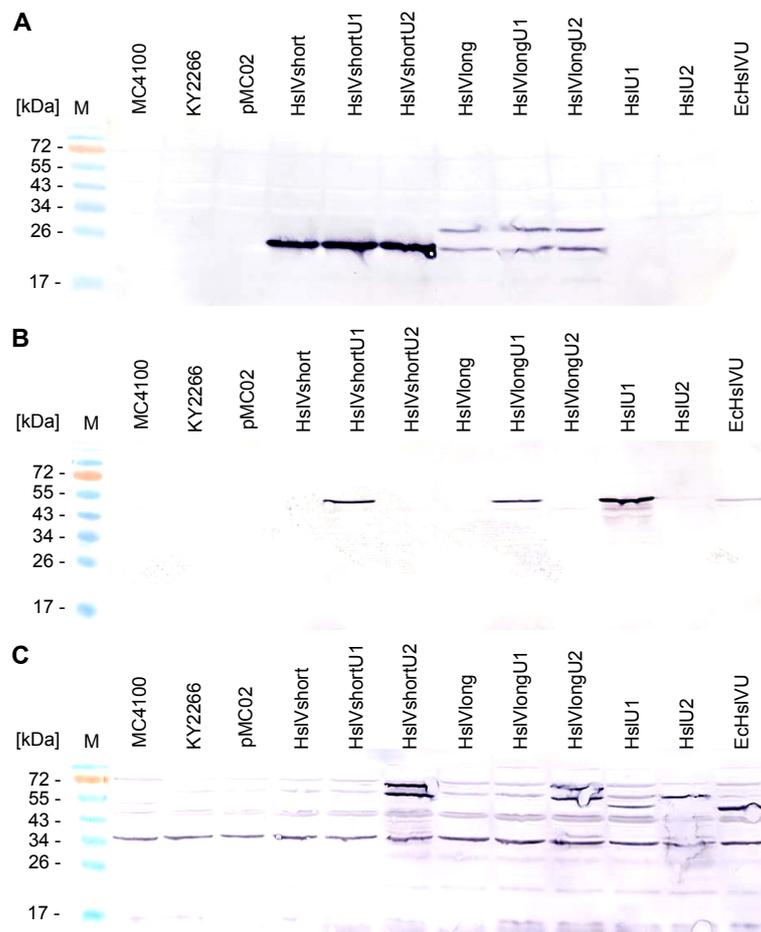


Abb. 40: Expressionsnachweis der Komplementationskonstrukte in der KY2266 Mutante

Die Bakterien wurden bis zu einer OD von 0,5 angezogen, lysiert und das Gesamtproteinextrakt in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF Membran erfolgte der Nachweis mit *Leishmania* spezifischem HslV Antiserum (A), HslU1 Antiserum (B) bzw. HslU2 Antiserum (C). M = 1 kb DNA Marker, Markerbanden sind links angegeben.

3.2.7.3. Wachstumskurven der Komplementationsplasmide

Die KY2266 Mutante weist, wie bereits beschrieben, bei erhöhter Temperatur ein reduziertes Wachstum auf. Durch Einbringen der verschiedenen Komplementationsplasmide sollte überprüft werden, ob diese Reduktion durch die kodierten Genprodukte aufgehoben werden kann. Dazu wurden Wachstumskurven von *E. coli* MC4100 Wildtyp, KY2266 Mutante und Komplementationsmutanten durchgeführt. Für die Komplementationsanalysen wurden Übernachtskulturen der verwendeten Bakterien in LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum angelegt. Es kamen die Bakterienstämme *E. coli* MC4100, KY2266, KY2266+pMC02, KY2266+pMC02-EcHsIVU, KY2266+pMC02-LdHsIVlong, KY2266+pMC02-LdHsIVlongU1, KY2266+pMC02-LdHsIVlongU2, KY2266+pMC02-LdHsIVshort, KY2266+pMC02-LdHsIVshortU1 und KY2266+pMC02-LdHsIVshortU2 zum Einsatz. Vor Beginn der Wachstumsmessung wurden alle Bakterien auf eine OD von 0,5 eingestellt, um einen gleichzeitigen Wachstumsstart aller Bakterien zu gewährleisten. Anschließend wurden 100 ml LB Medium mit 1 ml der eingestellten Kulturen angeimpft. Dem Medium wurde, falls notwendig, ausschließlich Ampicillin als Selektionsmittel hinzugefügt, um einen Einfluss anderer Antibiotika auf das Zellwachstum auszuschließen. Während der Inkubation der Bakterien bei 37°C und 46°C wurde die Zelldichte stündlich anhand der OD₆₀₀ über einen Zeitraum von 6 Stunden bestimmt.

Bei 37°C wuchsen alle verwendeten Stämme auf Niveau des Wildtyps (Abb. 41A). Dies zeigt, dass auch die KY2266 Mutanten bei normaler Temperatur in der Lage sind anzuwachsen. Das Wachstum des *E. coli* MC4100 Wildtyp ist, wie zu erwarten, auch bei 46°C logarithmisch. Hingegen konnten die KY2266 Mutante und die KY2266+pMC02 Mutante bei dieser Temperatur nicht mehr anwachsen. Dies bestätigt den hitzesensitiven Phänotyp der Dreifach-Mutante (Abb. 41B) und garantiert, dass jegliche Wachstumseffekte der Komplementationsmutanten ausschließlich aufgrund der zusätzlich exprimierten Gene zustande kommen. Mit dem Einbringen des EcHsIVU in die KY2266 Mutante sind die Bakterien wieder in der Lage, bei 46°C anzuwachsen. Allerdings kann die Zelldichte des Wildtyps nicht ganz erreicht werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der KY2266 Mutante neben dem HsIVU Gen noch zwei weitere wichtige Peptidasen fehlen, die ebenso für den hitzesensitiven Phänotyp der Mutante verantwortlich sind. Demnach hebt das EcHsIVU Plasmid den Phänotyp der Mutante partiell auf. Werden jedoch die *Leishmania* HsIVU in der KY2266 Mutante exprimiert, kommt es nicht zur Wiederherstellung des Zellwachstums bei 46°C (Abb. 41B+C). Nur das pMC02-HsIVlongU2 zeigte in einem von zwei Versuchen ein geringes Wachstum in der KY2266 Mutante. Da dieser Effekt weder mit dem pMC02-HsIVlong Plasmid (Abb. 41B) noch mit dem pMC02-HsIVshortU2 Plasmid (Abb. 41C) auftrat, kann nur eine Kombination von HsIVlong und HsIVU2 für die mögliche Wiederherstellung des Wachstums verantwortlich sein. Bereits in zwei Vorexperimenten, die nicht in diese Grafik mit aufgenommen werden

konnten, war dieses Phänomen beobachtet worden. Daher müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob dieser Effekt reproduzierbar ist.

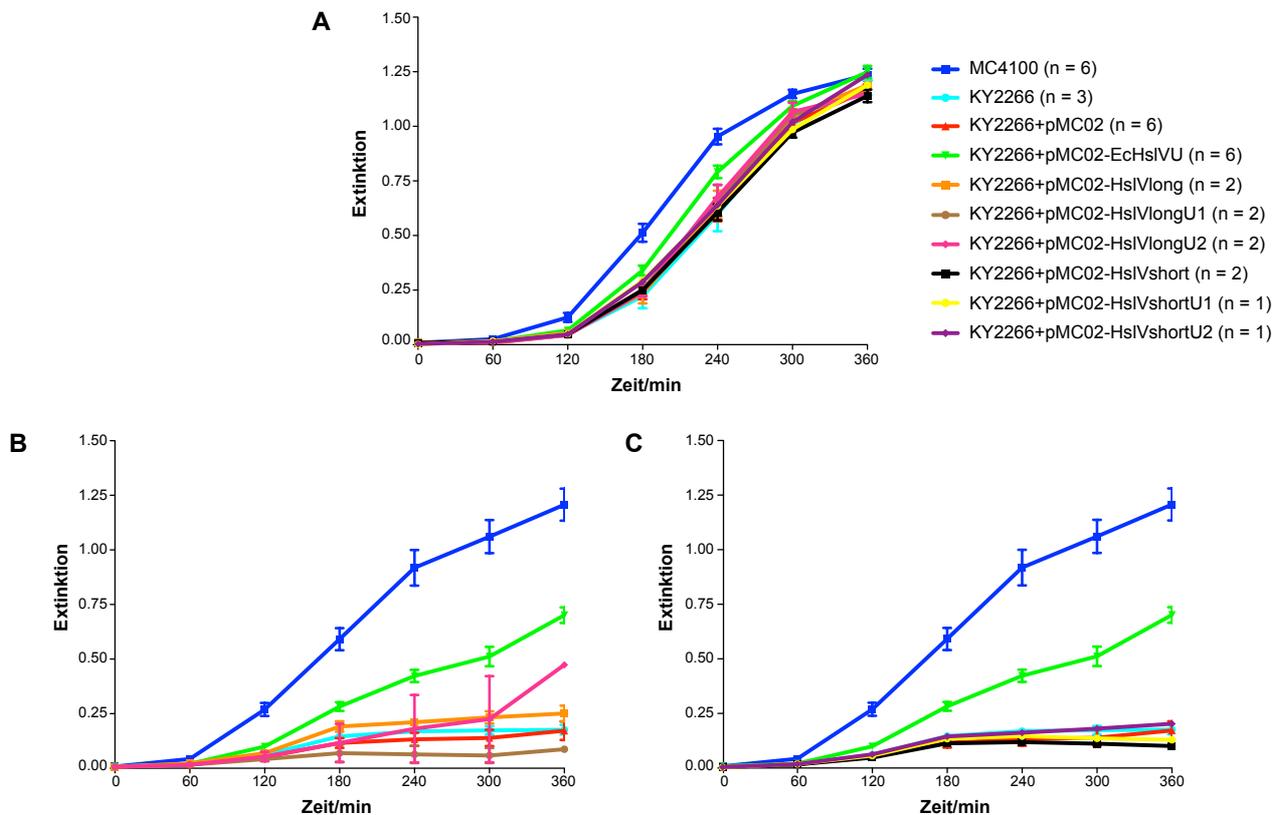


Abb. 41: Wachstumsverhalten der Komplementationsmutanten bei 37°C und 46°C

Wachstumskurven der unter (A) angegebenen Bakterien und Komplementationsmutanten wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden bei 37°C (A) und 46°C (B+C) aufgezeichnet. Dargestellt ist die Zusammenfassung von bis zu sechs unabhängig durchgeführten Experimenten. Die genaue Anzahl (n) der Experimente ist für jeden Stamm in der Legende angegeben. (A) zeigt das Wachstumsverhalten aller Bakterien bei 37°C. (B) stellt das Wachstumsverhalten von Wildtyp MC4100, Triple-KO-Mutante KY2266 (mit und ohne pMC02 Plasmid) und KY2266+pMC02-EcHsIVU im Vergleich zu den KY2266+pMC02-HsIVlong Mutanten dar. (C) zeigt die unter (B) genannten Bakterien im Vergleich zu den KY2266+pMC02-HsIVshort-Konstrukten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Sequenzanaloge aus *L. donovani*, mit der möglichen Ausnahme des HsIVlongU2, nicht in der Lage sind, die Funktion des *E. coli* HsIVU in der Zelle zu übernehmen. Die reine Annotierung von Proteinfunktionen aufgrund struktureller Verwandtschaft zu Proteinen anderer Pro- bzw. Eukaryoten ist daher nicht zwangsläufig mit einer Funktionsanalogie der Proteine gleichzusetzen.

4. Diskussion

Leishmaniasis wird durch protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* übertragen. Die Infektion führt im Menschen zu verschiedenen Krankheitsbildern, die von selbstheilender, kutaner Leishmaniase bis hin zur lebensbedrohenden, viszeralen Leishmaniase reichen. Mehr als 12 Millionen Menschen sind weltweit mit der Krankheit infiziert, etwa 350 Millionen leben mit dem Risiko einer Infektion (Chappuis et al., 2007). Derzeit gibt es keine Impfstoffe gegen die Erreger und die Chemotherapie beruht häufig noch auf veralteten Antimonderivaten. Aufgrund zunehmender Resistenzen gegen vorhandene Therapeutika, sind neue Medikamente und Behandlungsstrategien dringend nötig. Die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen ist der erste Schritt, um neue *Anti-Leishmania*-Wirkstoffe zu entwickeln.

Zur Ermittlung neuer Zielstrukturen in *Leishmania spp.*, gibt es verschiedene Strategien. Die Identifizierung von Zielstrukturen durch *functional cloning* stellt eine Möglichkeit dar. Mit dieser Methode konnten in *Leishmania spp.* in der Vergangenheit bereits viele neue und unbekannte Gene entdeckt werden (Beverley, and Turco, 1995, Choudhury et al., 2008, Coelho et al., 2003, Ryan et al., 1993, Turco et al., 1994). Im Gegensatz zur reversen Genetik, i.e. Genaustausch mit nachfolgender Phänotyp-Analyse, liegt der größte Vorteil dieser Methode darin, dass Gene aufgrund ihrer Funktion selektiert werden. Dabei muss nichts über die Eigenschaften der Gene bekannt sein. Die Ergebnisoffenheit der Komplementationgenetik ermöglicht es, bislang unbekannte Gene und Proteine zu identifizieren und diese in zelluläre Funktionen und Strukturen einzuordnen. Somit können auch solche Gene in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden, die nicht zu den "üblichen Verdächtigen" gehören.

Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung neuer Zielstrukturen bietet die vergleichende Genomanalyse. Dabei sind Gene von Interesse, die spezifisch für den Parasiten sind, nicht aber im Säugetierwirt vorkommen. Die Suche beschränkt sich vorwiegend auf solche Gene, deren Produkte bereits in anderen Organismen ausführlich studiert wurden. Für diese Methode werden Proteine aufgrund ihrer vermuteten Funktion und Analogie zu anderen Spezies ausgewählt. Eine anschließende Untersuchung der Kandidatengene durch reverse Genetik muss dann Aufschluss über deren tatsächliche Funktion und Bedeutung bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten beide Strategien verfolgt werden. Dabei ist es gelungen, das durch Komplementationgenetik vorläufig identifizierte P46 Gen als allgemeinen Virulenzfaktor von *L. major* zu bestätigen und zu charakterisieren. So konnte dem P46-Produkt eine schützende Funktion gegen Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort zugeordnet werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die

als HsIV und HsIU annotierten Gene aus *L. donovani* nicht in einem gemeinsamen Komplex vorliegen, wie dies für andere Organismen postuliert wird (Kang et al., 2001, Rohrwild et al., 1996). Zudem scheinen die Proteine nicht funktionelle Homologe zu ihren bakteriellen Gegenstücken zu sein. Dennoch sind zwei der Gene essenziell für die Lebensfähigkeit von *Leishmania donovani*. Somit sind P46, aber auch HsIV und HsIU1 als Zielstrukturen qualifiziert.

4.1. Charakterisierung des Virulenzfaktors P46 aus *L. major*

In einem vorangegangenen Promotionsprojekt wurde durch die Verwendung des avirulenten *L. major* Stammes, *L. major hsp100^{-/-}*, eine genomische DNA Bank nach Genen durchsucht, die die Virulenz des Stammes wieder herstellen (Reiling, 2005, Reiling et al., 2010). Tatsächlich konnte nach Infektion von BALB/c Mäusen eine begrenzte Anzahl von Cosmiden reisoliert werden, die dieses Merkmal vermittelten. Es ist bezeichnend, dass keines der selektierten Cosmide eines der *Leishmania* Hitzeschockgene trug. Im Hefemodell *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Verlust des Hsp100 Orthologs, Hsp104, durch eine Überexpression des Hsp70 partiell komplementiert (Sanchez et al., 1993). In *L. major* existieren mehrere Mitglieder der Hsp70 Genfamilie. Keines dieser Gene wurde in der Komplementationsanalyse selektiert, um den Verlust des Hsp100 zu kompensieren. Dies bestätigt einmal mehr, dass die Induktion von Thermotoleranz, eine der am besten charakterisierten Funktionen des Hefe Hsp104, nicht die Schlüsselrolle des *Leishmania* Hsp100 ist (Krobitsch, and Clos, 1999). In der Komplementationsanalyse mit dem *L. major hsp100^{-/-}* dominierten drei isolierte Cosmide die *in vivo* Selektion. Nach weiteren Analysen konnte die virulenzsteigernde Wirkung auf einen einzigen ORF (LmjF33.3060) reduziert werden, der für ein 46 kDa Protein kodiert, das im Weiteren als P46 bezeichnet wurde.

4.1.1. Sequenzanalysen des P46

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die P46 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit Hilfe von BLAST-Suchen und Peptid-Motif-Suchen analysiert. Es konnte keine strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Proteinen in den Datenbanken ermittelt werden. Ebenso enthält die Aminosäuresequenz des Proteins keine bekannten funktionellen Domänen, Motive oder Signalsequenzen. Homologe Sequenzen im *L. infantum* und *L. mexicana mexicana* Genom wiesen einen stark verkleinerten ORF auf, kein ORF konnte in der genomischen Region des *L. braziliensis* identifiziert werden. Insgesamt lag die Sequenzkonservierung des P46 innerhalb der *Leishmania* Spezies bei <40%. Dies ist ungewöhnlich niedrig, da innerhalb der Leishmanien normalerweise eine Sequenzkonservierung von mehr als 90% vorliegt (Peacock et al., 2007). Innerhalb der verschiedenen *L. major* Stämme (MHOM/SU/73/5ASKH), (MHOM/IL/81/FEBNI) und (MHOM/IL/80/FRIEDLIN) konnten hingegen keine Unterschiede in der Sequenz gefunden werden (Daten nicht gezeigt), obwohl diese aus verschiedenen geographischen Gebieten isoliert

wurden (Al-Jawabreh et al., 2008). Somit scheint P46 spezifisch für *L. major* zu sein. Es ist denkbar, dieses Protein als molekularen Marker zur Differenzierung von Alte Welt *Leishmaniae* einzusetzen. Dafür bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen mit verschiedenen *Leishmaniae* aus der Alten Welt.

4.1.2. *In vivo* Mausinfektionen

Um den virulenzsteigernden Effekt des Proteins zu bestätigen, wurde P46 zunächst im attenuierten *L. major hsp100^{-/-}* zur Überexpression gebracht. In einer anschließenden BALB/c Mausinfektion stellte das P46 Protein tatsächlich die Virulenz des *L. major hsp100^{-/-}* teilweise wieder her. Interessanterweise war dieser Effekt aber nicht auf die avirulente Mutante beschränkt, sondern konnte auch im Hintergrund des *L. major* 5ASKH Wildtyps nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Überexpression des P46 nicht um eine funktionelle Komplementation des Hsp100 handelt, sondern um eine Kompensation des attenuierten Phänotyps.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass spontane genetische Veränderungen den Phänotyp eines attenuierten *L. major* umkehren können (Reiling et al., 2006, Späth et al., 2004). In einer anderen Studie wiesen zwei etablierte Laborstämme, *L. major* FRIEDLIN und *L. major* FEBNI, unterschiedliche Infektionsverläufe in TNF-defizienten Mäusen auf (Ritter et al., 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die TNF-abhängige Kontrolle der *L. major* Infektion vom infizierenden Parasitenstamm abhängt. Gleichmaßen wurde in einer früheren Arbeit gezeigt, dass verschiedene Klone innerhalb einer infizierenden Population von *L. infantum* unterschiedliche Virulenz und Tropismus aufweisen (Garin et al., 2001). Demnach können spontane klonale Variationen den Ausgang einer Infektion beeinflussen, auch unabhängig von der immunologischen Veranlagung des Wirts.

Die molekularen Grundlagen für diese Vorgänge sind bisher noch unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die geringe Überexpression eines einzigen Gens die Virulenz einer Mutante wieder herstellen kann. Eine fünffache Überexpression des P46 im *L. major* 5ASKH Wildtyp verschlimmert die Pathologie in BALB/c Mäusen und führt darüber hinaus in normalerweise resistenten C57BL/6 Mäusen zu einer fortschreitenden und anhaltenden Infektion. Auch die Überexpression des P46 im bereits stark virulenten *L. major* FEBNI führt zu einer leicht erhöhten Virulenz in C57BL/6 Mäusen. Im Gegensatz zu den Erwartungen kam es in keiner der C57BL/6 Mausinfektionen zu einer Umkehr von T_H1- zu T_H2-Immunität, sondern vielmehr zu einer Erhöhung der bereits vorherrschenden IFN γ Produktion. Vor allem bei Infektion mit dem ansonsten schwach virulenten *L. major* 5ASKH wurde dies besonders deutlich. Die Tatsache, dass der *L. major* 5ASKH [pcosP46] in Gegenwart einer starken IFN γ Induktion existieren kann, deutet auf einen Schutz durch P46 gegen Effektormechanismen des Makrophagen hin.

Ähnliche Ergebnisse konnten bereits 2006 mit spontanen *escape*-Varianten des *L. major hsp100*^{-/-} erzielt werden (Reiling et al., 2006). Es ist bekannt, dass *L. major* die Expression verschiedener Wirtsgene induzieren oder unterdrücken kann (Racoosin, and Beverley, 1997). In einer aktuellen Studie wurde die Genexpression von Makrophagen nach Infektion mit *L. major* bzw. *L. donovani* verglichen (Gregory et al., 2008). Dabei zeigte sich, dass die beiden Spezies sehr ähnliche Effekte auf die Genexpression ausüben, jedoch in der Lage sind, etwa 60 Gene des Makrophagen stark zu induzieren bzw. zu unterdrücken. Es könnte interessant sein zu untersuchen, welche Unterschiede die Infektion mit *L. major* bzw. *L. major* [pcosP46] auf die Genexpression der Makrophagen hat. Die Ergebnisse könnten weitere Hinweise auf mögliche immunmodulatorische Mechanismen des P46 liefern.

4.1.3. *In vitro* Makrophageninfektion

Die Erkenntnisse aus den Infektionsversuchen werden durch die Ergebnisse der *in vitro* Makrophagen Infektionen gestützt. Dabei kam es im Vergleich zum Wildtyp nach Infektion mit dem *L. major* 5ASKH [pcosP46] zu einer stärkeren Infektiosität und Parasitenlast. Die Addition beider Effekte führte insgesamt zu einer 3-fach verstärkten Parasitenlast in den infizierten Makrophagen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass für diesen Effekt nicht die effizientere Aufnahme durch die Makrophagen verantwortlich ist, sondern vielmehr eine verstärkte Vermehrung bzw. ein verbessertes Überleben der Parasiten (M. Chrobak, unveröffentlichte Daten). Mit diesen *in vitro* Ergebnissen können die Effekte im Mausmodell belegt und erklärt werden. So führt die erhöhte Parasitenzahl in den Makrophagen höchstwahrscheinlich zu einer Expansion der infizierten Zellen, was einen starken Influx weiterer Immunzellen nach sich zieht. Starke Fußschwellungen, wie auch die beobachtete erhöhte IFN γ Produktion wären die Folge.

4.1.4. Reverse Genetik

Auf welche Weise kann aber das P46 die intrazelluläre Proliferation bzw. das intrazelluläre Überleben der Parasiten verstärken? Um dies zu untersuchen sollten P46 Nullmutanten generiert werden. Dabei war die Frage, welchen Effekt ein Fehlen des P46 Proteins auf die Parasiten bzw. deren Infektiosität *in vitro* und *in vivo* hat. Leider war es auch nach mehrfacher Wiederholung nicht möglich, P46 Genaustauschmutanten herzustellen. Weder Einzelallel- noch Doppelallel- Genaustauschmutanten wuchsen unter Selektionsdruck an. Auch das Einbringen einer zusätzlichen Genkopie erlaubte nicht den Austausch von P46-Allelen. Aber auch der Versuch, durch den Austausch der Selektionsmarkergene Mutanten zu erzeugen, blieb erfolglos. Es sind zwei Erklärungen für das Scheitern dieser Versuche denkbar. Zum einen könnte die Expression der Selektionsmarkergene, die durch die UTRs des P46 gesteuert wird, zu schwach sein, um eine Resistenz gegenüber den Antibiotika zu produzieren. Eine weitere Überlegung ist, dass die Expression des P46 für ein effizientes

Wachstum der Parasiten notwendig ist. Jedoch spricht die Tatsache, dass nicht einmal Einzelallel-Genaustauschmutanten erzeugt werden konnten, gegen diese zweite Theorie. Da vermutet wird, dass für eine hohe Expressionsrate von Genen die 5'- und 3'-UTRs eine entscheidende Rolle spielen (El Fakhry et al., 2002, LeBowitz et al., 1993, Zilka et al., 2001), könnte eine Alternative zur Erstellung von P46-Genaustauschmutanten darin bestehen, die Selektionsmarker zunächst mit bekannten, wirkungsvollen 5'- bzw. 3'-UTRs zu umgeben, bevor sie zur Integration zwischen die P46-UTRs kloniert werden.

4.1.5. Lokalisationsstudien in Promastigoten und infizierten Makrophagen

Um weitere Informationen über das P46 Protein und dessen mögliche Wirkungsorte im Parasiten zu erhalten, wurden Lokalisationsstudien in Promastigoten und infizierten Makrophagen durchgeführt. Das P46 ist in Promastigoten zytoplasmatisch verteilt, wobei DNA-haltige Kompartimente, wie Zellkern und Kinetoplast, ausgespart waren. Nach Infektion von Makrophagen zeigte sich, dass das P46 nicht auf die Amastigoten beschränkt war, sondern vielmehr auch im Zytosol der Makrophagen nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch höher auflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt. Darüber hinaus lag das Protein vorwiegend eng gruppiert vor. Dies spiegelt die Ergebnisse der nativen PAGE wieder, in der das Protein in Komplexen von etwa 300 kDa und 800-900 kDa nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu *L. amazonensis* oder *L. mexicana* sind *L. major* Parasiten im Makrophagen einzeln von einer parasitophoren Vakuole (PV) umgeben (Real et al., 2008). Teil der Vakuolenmembran sind Proteine wie rab7, Macrosialin, MHC I- und MHC II-Moleküle, sowie die Glycoproteine Lamp1 und Lamp2 (Courret et al., 2002, de Souza, 2005). Eine Kolokalisationsstudie von infizierten Makrophagen mit den Antikörpern für Lamp1 und P46 zeigte jedoch, dass diese Proteine nicht miteinander assoziiert sind (Daten nicht gezeigt). Somit kann eine Assoziation des P46 mit der PV ausgeschlossen werden. Dies wurde auch aus der elektronenmikroskopischen Analyse deutlich.

Da für *L. major* bisher keine Stadiendifferenzierung *in vitro* existiert, ist es nicht möglich zu untersuchen, wie sich die Verteilung des Proteins während der Umwandlung verändert. Für diesen Prozess wäre eine stadienspezifische Prozessierung oder ein Amastigoten-spezifischer Transportweg notwendig. Die Analyse der Peptidsequenz ergab jedoch keine bekannten Signalsequenzen für P46. In neueren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass diese in *Leishmania* für den Export von Proteinen nicht zwingend notwendig sind (Silverman et al., 2008). Leishmanien nutzen dafür eher unkonventionelle Sekretionswege, wie die Exosomen, um Proteine aus der Zelle in die parasitäre Umgebung zu schleusen (Silverman et al., 2010). Inhalt dieser Organelle sind vor allem Chaperone, wie Hsp70, Hsp90 und Hsp100. Weitere Analysen der von *L. major* ausgeschleusten Vesikel könnten klären, ob P46 zu den Proteinen gehört, die Teil der Exosomen-Beladung sind.

Wie bereits erwähnt, fehlt für *L. major* 5ASKH ein geeignetes *in vitro* Differenzierungssystem. Somit ist es nicht möglich, Untersuchungen zur Migration des P46 während der Stadiumumwandlung durchzuführen. Es ist jedoch vor kurzem gelungen, die Stämme *L. major* FEBNI und *L. major* FRIEDLIN *in vitro* in Amastigote umzuwandeln (G. v. Zandbergen, persönliche Mitteilung). Da die P46 Proteinsequenz innerhalb der *L. major* Stämme nicht divergiert, wäre es möglich *L. major* FEBNI oder *L. major* FRIEDLIN für P46 Analysen während des Differenzierungsprozesses zu nutzen. Ein weiteres Mittel den Transport von P46 während der Umwandlung zu verfolgen, bietet die Nutzung von so genannten eGFP-Chimären. Erste Infektionen von Makrophagen mit *L. major* P46-eGFP zeigten aber, dass das chimäre Protein nur schwach in infizierten Makrophagen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei eGFP um ein relativ großes Protein handelt, ist nicht auszuschließen, dass es zu sterischen Behinderungen bei der Bildung der P46 Proteinkomplexe kommt. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, könnten in Zukunft kleinere Markierungsdomänen, wie der HA-tag oder das flag-tag, für die Synthese chimärer P46 Proteine eingesetzt werden.

4.1.6. Zusammenfassung

Bisher gibt es einige Proteine, die als so genannte Virulenzfaktoren identifiziert wurden (Descoteaux et al., 2002, McGwire et al., 2002, Mottram et al., 2004). Dabei handelt es sich jedoch meist um Proteine, die entweder den attenuierten Phänotyp einer Mutante wieder herstellen (Späth et al., 2000) oder deren Reduktion zu einem Verlust der Virulenz führt (Zhang, and Matlashewski, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten mal ein *L. major* spezifischer Virulenzfaktor identifiziert werden, der nicht nur in der Lage ist, das Fehlen eines Gens zu kompensieren, sondern darüber hinaus auch die Virulenz des Wildtyps erhöht. Somit handelt es sich bei P46 um einen allgemeinen Virulenzfaktor. Die in den *in vivo* Infektionsversuchen erzielten Ergebnisse spiegeln sich auch in den *in vitro* Daten wieder, in denen eine verstärkte Parasitenlast in infizierten Makrophagen nachgewiesen werden konnte. Die Lokalisation des Proteins im Zytoplasma des Makrophagen lässt vermuten, dass P46 möglicherweise vor Effektormechanismen des Makrophagen schützt bzw. diese verändert. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass bereits eine geringe Veränderung der Genexpression in *L. major* den Ausgang einer Infektion unabhängig von der genetischen Prädisposition des Wirts beeinflussen kann.

4.1.7. Ausblick

Aus den hier diskutierten Ergebnissen wird deutlich, dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind, um die Rolle und Funktion des P46 im Infektionsverlauf zu klären. Insbesondere dessen Funktion im Hinblick auf schützende Mechanismen vor der Immunantwort im Makrophagen sollte untersucht werden. Dazu würde sich eine Analyse der Genexpression infizierter Makrophagen eignen. Alternativ kann P46 durch transiente

Transfektion in Makrophagen direkt exprimiert werden. So könnte der Einfluss von P46 auf antimikrobizide Mechanismen des Makrophagen überprüft werden. Auch die phylogenetische Verteilung des P46 innerhalb der kutanotropen Alte Welt Leishmanien sollte weiter untersucht werden, um mögliche Korrelationen mit geographischen oder klinischen Parametern zu etablieren. Ebenso müssen neue Versuche zur Generierung von P46 Genaustauschmutanten unter Verwendung angepasster Bedingungen gestartet werden. Die Tatsache, dass P46 spezifisch für *L. major* zu sein scheint, schränkt den Einsatz dieses Proteins als Zielstruktur zur Wirkstoffentwicklung zunächst ein. Es ist allerdings nicht bekannt, ob das *L. infantum* Homolog ähnliche Effekte zeigt. Erst ein besseres Wissen über die Bedeutung des Gens für den Parasiten während der Infektion erlaubt eine Aussage, ob sich P46 als neue Zielstruktur eignet.

4.2. Charakterisierung von HsIV und HsIU aus *L. donovani*

Das *L. donovani* Genom beinhaltet neben homologen Genen für das Proteasom auch homologe Gene für den bakteriellen Peptidasekomplex HsIVU (Gille et al., 2003, Ruiz-Gonzalez, and Marin, 2006). Das *Leishmania* HsIV Homolog (LinJ36_V3.4180) besitzt 55% Sequenzidentität mit dem bakteriellen HsIV. Es wurden zwei HsIU Homologe in der *Leishmania* Genbank gefunden, HsIU1 (LinJ15_V3.0090) und HsIU2 (LinJ09_V3.0380), die ~64% bzw. ~52% Sequenzidentität zum *E.coli* HsIU aufweisen, aber nur ~56% untereinander. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die HsIV und HsIU Gene und Genprodukte mittels reverser Genetik und proteinbiochemischer Methoden zu untersuchen und zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte eine Komplementationsanalyse erste Hinweise über deren Funktion in *L. donovani* liefern.

4.2.1. Proteinnachweis und differenzielle Expression während der Stadienkonversion

Da zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt war, ob die Proteine in den Parasiten exprimiert werden, wurde zunächst die Expression der Proteine überprüft. Bereits 2002 konnten *HsIV* und *HsIU* erstmals als mRNA nachgewiesen werden (Couvreux et al., 2002). Allerdings wurde in der vorliegenden Studie nicht zwischen HsIU1 und HsIU2 differenziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dar, dass alle drei Proteine in *L. donovani* zur Expression kommen. Dabei war das apparente Molekulargewicht von HsIU1 und HsIU2 jeweils um ca. 5 kDa größer als das errechnete Molekulargewicht. Dies ist möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen (PTM) zurückzuführen, von denen bekannt ist, dass sie bei der Regulation von Proteinfunktionen und Proteinstabilität eine wichtige Rolle spielen. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass insbesondere während der Stadienkonversion von *L. donovani* PTMs wie Acetylierung, Methylierung oder Glycosylierung auftreten (Rosenzweig et al., 2008a). Dies wirkt sich letztendlich auf das tatsächliche Molekulargewicht der Proteine aus.

Die Stadiendifferenzierung führt neben morphologischen Veränderungen der Parasiten auch zu Veränderungen in der Genexpression, was durch eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expression der jeweiligen Gene zu erkennen ist (Bente et al., 2003, Saxena et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass HsIV, HsIU1 und HsIU2 kaum Veränderungen in der Expression während der Umwandlung aufwiesen. Lediglich bei HsIU1 konnte im Western Blot eine leicht verstärkte Expression während des Differenzierungsprozesses beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit einer kürzlich veröffentlichten *proteomics* Studie überein, in der die Expression von >1700 Proteinen während der Stadienumwandlung untersucht wurde (Rosenzweig et al., 2008b). Dabei wies das HsIU1 Protein 24 h nach Umwandlung eine etwa 1,25-fach erhöhte Expression auf, die auf das 1,2-fache nach 144 h absank. Das HsIU2 Protein zeigte keine veränderte Expression während der Umwandlung. Eine 1,4-fach verstärkte Proteinexpression trat 144 h nach Umwandlung bei HsIV auf, wobei in den davor gemessenen Zeitpunkten 0, 2,5, 5, 10, 15 und 24 h kein Unterschied zum Promastigotenniveau nachweisbar war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messdaten im 24 Stunden Rhythmus erhoben. Da der letzte gemessene Wert bei 72 h lag, ist es möglich, dass die leichte Expressionserhöhung von HsIV zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachzuweisen war.

4.2.2. Lokalisationsstudien in Promastigoten

Mit Hilfe des Analyseprogramms SignalP können mögliche Signalpeptide innerhalb einer Aminosäuresequenz gefunden werden, die eine hypothetische Lokalisation des Proteins postulieren. Für das HsIV Protein ergab die Peptidsequenz-Untersuchung eine mitochondriale Lokalisation des Proteins (Daten nicht gezeigt). Dies wurde bereits in einer früheren Studie diskutiert (Couvreur et al., 2002). Für die *T. brucei* HsIVU Homologe wurde ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation postuliert. Dieses Ergebnis beruhte auf der Expression von HA-tag Proteinen und anschließender indirekter Immunfluoreszenz, sowie Kollokalisierungen mit *Mitotracker*-Reagenz (Li et al., 2008).

Eigene Lokalisationsstudien des HsIV Proteins in *L. donovani* durch indirekte Immunfluoreszenz bzw. Expression von HsIV::eGFP Chimären zeigten jedoch, dass HsIV in Promastigoten an distinkten Stellen im Zytosol vorliegt. Dabei trat es häufig randständig in der Nähe der Plasmamembran auf, war aber nicht in Kern, Kinetoplast oder Geißel nachzuweisen.

Die Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz konnten zudem durch immunelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Dabei fanden sich keine Goldpartikel in den schlauchförmigen Mitochondrien. In früheren Studien wiesen typisch mitochondriale *Leishmania* Proteine, wie Cpn10 und Cpn60, in EM-Analysen ausschließlich Goldmarkierungen innerhalb des Mitochondriums auf (Schlüter et al., 2000, Zamora-Veyl et al.,

2005). Somit kann eine mitochondriale Lokalisation des HslV, wie es für das *Trypanosoma* Homolog postuliert wurde, ausgeschlossen werden.

In einer aktuellen Studie wurde das *P. falciparum* HslV Homolog (PfHslV) in Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen ebenfalls im Zytosol der Parasiten nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte eine Fraktionierung, dass PfHslV nicht mit membrangebundenen Vesikeln assoziiert war (Ramasamy et al., 2007). Dies stützt unsere Beobachtungen.

Für HslU war 2002 sowohl eine mitochondriale Lokalisation, als auch eine Sekretion des Proteins prognostiziert worden (Couvreux et al., 2002). Eine Wiederholung der SignalP Analysen ergab hingegen für HslU1 keine voraussagbare Lokalisation. Für das HslU2 konnte ein putatives Signalpeptid für einen sekretorischen Transportweg identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten das HslU1 Protein vermehrt im bzw. um Nukleus und Kinetoplasten herum. Dies konnte sowohl mit dem HslU1 Antiserum, als auch mit den HslU1::eGFP Chimären gezeigt werden. Auch in *T. brucei* waren die HslU Proteine in unmittelbarer Nähe des Kinetoplasten nachgewiesen worden. Weitere Untersuchungen durch siRNA *knock-down* ließen vermuten, dass das TbHslU an der Replikation oder Segregation des kDNA Netzwerkes beteiligt sein könnte (Li et al., 2008). Auch in *Leishmania* ist eine ähnliche Funktion für das HslU1 möglich.

Im Gegensatz zu HslU1 trat das HslU2 vorwiegend im Zytosol und der Geißel von Promastigoten auf. Zudem zeigte sich eine Anhäufung der Fluoreszenzsignale nahe der Geißeltasche, was auf Sekretion der Proteine hindeutet. Tatsächlich konnten die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen diese Vermutung bestätigen. Hier fanden sich Goldpartikel im Zytoplasma aber auch außerhalb der Parasiten. Eine unspezifische Markierung konnte durch entsprechende Negativ-Kontrollen ausgeschlossen werden. Das in SignalP Analysen identifizierte sekretorische Signalpeptid könnte somit tatsächlich das Protein für den klassischen Exportweg über Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat qualifizieren. Allerdings konnte vor kurzem auch gezeigt werden, dass ein Großteil der exportierten Proteine über Exosomen aus der Zelle geschleust wird (Silverman et al., 2010). Auch dieser Weg wäre für HslU2 denkbar.

4.2.3. Proteininteraktionsstudien

In *E. coli* bilden HslV und HslU einen ATP-abhängigen Peptidasekomplex (Rohrwild et al., 1996). Dabei bildet das HslV ein Dodekamer aus zwei übereinander liegenden hexameren Ringen, das von hexameren HslU Ringen eingerahmt wird (Bochtler et al., 2000, Wang et al., 2001). Die Frage, ob die *Leishmania* HslV und HslU Proteine auch derartige Komplexe bilden, wurde in Kolokalisationsstudien und durch native Größenausschluss-Gelelektrophorese untersucht. Dabei war aus den Ergebnissen der Lokalisationsstudien bereits ersichtlich, dass die Proteine unterschiedlich lokalisieren, was eine Komplexbildung zweifel-

haft erscheinen lässt. Die Kolokalisationsstudie des HslV::eGFP mit dem HslU2 Antiserum bestätigte diese Beobachtung. Es kam zu keiner Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der nativen PAGE zumindest die Bildung eines gemeinsamen Komplexes von HslV und HslU2 ausgeschlossen werden. Das HslV trat in einem Komplex von etwa 170 kDa auf, wohingegen HslU2 in einem Komplex von ca. 500 kDa vorlag. Das HslU1 Protein war weder in einer Kolokalisationsstudie mit HslV::eGFP, noch in der nativen PAGE nachweisbar, so dass keine fundierten Ergebnisse über eine mögliche Komplexbildung dieser beiden Proteine vorliegen. Da die Lokalisationsstudien von HslV und HslU1 aber eine vollkommen unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der Proteine zeigten, scheint ein gemeinsamer Komplex unwahrscheinlich.

In Kolokalisationsstudien werden lediglich subzelluläre Verteilungsmuster verglichen, jedoch können keine Informationen über direkte Protein-Protein-Interaktionen gewonnen werden. Zur Untersuchung mutmaßlicher Komplexparker des HslV wurde das HslV::eGFP daher in einem GFP-Trap Experiment eingesetzt. Hierbei ist es möglich, Interaktionspartner von GFP-Fusionsproteinen aus Proteingemischen mit Hilfe der GFP-Trap *beads* (Chromotek) zu präzipitieren (Ommen et al., 2009a). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass HslV zumindest teilweise in einem homo-oligomeren Komplex vorliegt, da auch das natürliche HslV mit präzipitiert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis, wenngleich noch nicht abschließend, bestätigt die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese, in denen HslV als ~170 kDa-Komplex vorlag. Diese Ergebnisse schließen allerdings nicht die Einbindung weiterer Komplexparker aus.

4.2.4. Funktionsanalyse durch Komplementation

In *E. coli* ist HslVU eine ATP-abhängige Peptidase, die aus der AAA⁺-ATPase HslU und der Peptidase HslV besteht (Seong et al., 2000, Yoo et al., 1996). Obwohl die HslV und HslU Proteine aus *Leishmania* keinen gemeinsamen Komplex zu bilden scheinen, stellt sich die Frage ob sie trotzdem funktionelle Homologe zu den bakteriellen Gegenstücken sind. Zu diesem Zweck wurde eine hitzesensitive *E. coli* Mutante verwendet, der die wichtigen Proteasen ClpXP, Lon und HslVU fehlen (Kanemori et al., 1997, Katayama et al., 1996). Durch das Einbringen der *Leishmania* HslVU sollte untersucht werden, ob diese in der Lage sind, den hitzesensitiven Phänotyp der *Triple*-Mutante zu komplementieren. Für die Analysen wurden verschiedene Komplementationsplasmide kloniert, so dass jede Kombination von HslV und HslU1 bzw. HslU2 entstand. Die Ergebnisse zeigten, dass keine der Kombinationen aus *Leishmania* Homologen den Phänotyp der Mutante aufheben konnte. Das als Positiv-Kontrolle transformierte *E. coli* HslVU-Konstrukt war hingegen in der Lage, das Wachstum bei hoher Temperatur partiell wieder herzustellen.

Bereits frühere Studien zeigten, dass strukturelle Homologie nicht zwangsläufig funktionelle Analogie bedeuten muss. Ein Beispiel hierfür ist das Hitzeschockprotein Hsp100.

Während die orthologen Proteine aus *S. cerevisiae* oder *E. coli* in Thermotoleranz und Stresstoleranz involviert sind, konnte dies nicht für das *Leishmania* Hsp100 gezeigt werden (Hübel et al., 1997, Krobtsch, and Clos, 1999). Die Ergebnisse dieser Komplementationsanalyse zeigen, dass die *Leishmania* HslV und HslU nicht in der Lage sind, die Funktion des *E. coli* HslVU zu übernehmen. Dies schließt aber eine Funktion als Peptidase und ATPase nicht aus. Es bedeutet lediglich, dass dieses Testsystem zur Funktionsuntersuchung der *Leishmania* Homologe ungeeignet ist.

4.2.5. Funktionelle Analyse durch Genaustausch-Mutagenese

Zur Untersuchung der Rolle von HslV, HslU1 und HslU2 in promastigoten *L. donovani* sollten Nullmutanten bzw. Genaustauschmutanten hergestellt werden. Dabei ging es vorwiegend um die Fragestellung, ob die Proteine essenziell für die Parasiten sind. Bereits in Vorarbeiten war es gelungen, eine lebensfähige HslU2 Nullmutante zu erzeugen (S. Lorenz, unveröffentlicht). Die Nullmutante zeigte *in vitro* ein leicht verringertes Zellwachstum, das durch Einbringen eines *gene add back* reversibel war. Somit kann festgehalten werden, dass HslU2 für die Promastigoten eine untergeordnete Rolle spielt.

Für HslV und HslU1 gelang es nicht, funktionelle Nullmutanten herzustellen. Im Falle von HslU1 verfügten die Mutanten trotz positiver Integration beider Selektionsmarkergene stets noch über mindestens eine funktionelle Genkopie. Dies konnte auch nicht durch das vorherige Einbringen eines *gene add back* verhindert werden. Dieses Phänomen konnte bereits in einer früheren Studie beobachtet werden, in der die Generierung einer Trypanothion Reduktase (TR) Nullmutante misslang. Die Autoren stellten fest, dass die Parasiten eine dritte Kopie der TR-Region angelegt hatten, was höchstwahrscheinlich eine Folge genetischer Neuordnung der Gene war (Dumas et al., 1997). Das Vorkommen einer derartigen Vermehrung der Genkopienzahl ist selten und ist nur unter sehr starkem Überlebensdruck vorstellbar (Beverley, 2003). Somit ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Charakter von HslU1 als essenzielles Gen nicht schlüssig bewiesen, obwohl die Ergebnisse darauf hindeuten.

Im Gegensatz dazu war es bei HslV möglich, beide Gen-Allele in Gegenwart einer zusätzlichen Genkopie auszutauschen. Dies ist ein starker Hinweis auf die Relevanz des Gens in Bezug auf Wachstum und Überlebensfähigkeit. Somit ist HslV als essenzielles Gen qualifiziert (Beverley, 2003) und kann als potenzielles Therapie-Zielmolekül betrachtet werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in Promastigoten die Proteine HslV und HslU keine gemeinsamen Komplexe bilden. Ausserdem sind sie funktionell divergent zu ihren bakteriellen Gegenstücken. HslV ist darüber hinaus essenziell für das Überleben promastigoter *L. donovani*, was wahrscheinlich auch für HslU1 gilt. Weiterhin wurde deutlich, dass die Annotierung von Genen in Datenbanken auf Grund struktureller Homo-

logien nicht notwendig auf ihre tatsächliche Funktion in anderen Organismen schließen lässt.

4.2.6. Ausblick

Die hier diskutierten Ergebnisse und Hypothesen zeigen, dass weiterführende Untersuchungen der HslV und HslU Proteine von *Leishmania* nötig sind, um die Fragen zu klären, welche Funktion die Proteine im Parasiten übernehmen und welche Relevanz ihnen beim Überleben im Wirtsorganismus zukommt. Ebenso ist von Interesse, welche Rolle die Proteine innerhalb der Amastigoten spielen. Vor allem *in vitro* ATPase- und Peptidase-Tests stehen zunächst im Vordergrund der Untersuchungen, die anstehen. Heutzutage dienen Inhibitoren des Proteasoms bereits als Medikamente für verschiedene Krankheiten, wie Krebs oder HIV Infektionen (Adams et al., 1999, Elliott et al., 1999, O'Connor et al., 2005, Schmidtke et al., 1999). Auch in den Kinetoplastida führte eine Hemmung des Proteasoms zu einem Wachstumsarrest der Zellen (Gonzalez et al., 1996, Robertson, 1999, Silva-Jardim et al., 2004). Inhibitoren der von HslV und HslU induzierten Prozesse könnten vielversprechende Kandidaten für *Anti-Leishmania*-Wirkstoffe darstellen.

Auch die Erzeugung von HslU2::eGFP und HslU1::eGFP Chimären sollte vorangetrieben werden. Diese chimären Proteine erlauben die Verwendung der GFP-TRAP *beads*, um Interaktionspartner zu identifizieren. Auch eine Untersuchung der Lokalisation in Amastigoten und infizierten Makrophagen ist nötig, um Aufschluss über die Proteine in diesem Stadium zu geben.

5. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787-93.
- Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas, J., Pien, C. S., Prakash, S., and Elliott, P. J.** (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*, **59**, 2615-22.
- Al-Jawabreh, A., Diezmann, S., Muller, M., Wirth, T., Schnur, L. F., Strelkova, M. V., Kovalenko, D. A., Razakov, S. A., Schwenkenbecher, J., Kuhls, K., and Schonian, G.** (2008). Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania* (*Leishmania*) major by microsatellite analysis. *BMC Evol Biol*, **8**, 183.
- Andersson, L., Borg, H., and Mikaelsson, M.** (1972). Molecular weight estimations of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity. *FEBS Lett*, **20**, 199-202.
- Ashford, R. W.** (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, **30**, 1269-81.
- Awasthi, A., Mathur, R. K., and Saha, B.** (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, **119**, 238-58.
- Azim, M. K., Goehring, W., Song, H. K., Ramachandran, R., Bochtler, M., and Goettig, P.** (2005). Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci.*, **14**, 1357-1362.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **18**, 767-811.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D.** (2000). A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*, **165**, 969-77.
- Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., Clos, J., and Bruchhaus, I.** (2003). Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, **3**, 1811-29.
- Berman, J. D., Gallalee, J. V., and Best, J. M.** (1987). Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol*, **36**, 197-201.
- Beverley, S. M.** (2003). Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet*, **4**, 11-9.

- Beverley, S. M., and 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.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., and Huber, R.** (2000). The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature*, **403**, 800-5.
- Borghans, J. A., Noest, A. J., and De Boer, R. J.** (1999). How specific should immunological memory be? *J Immunol*, **163**, 569-75.
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., Mcgwire, B. S., Chang, K. P., and 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**, 3102-11.
- Castro, R., Scott, K., Jordan, T., Evans, B., Craig, J., Peters, E. L., and Swier, K.** (2006). The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *J Parasitol*, **92**, 1162-70.
- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., Mcneil, M., Turco, S. J., Sibille, J. C., Snapper, M., Aisen, P., and Bloom, B. R.** (1989). Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2453-7.
- Chang, K.-P., Fong, D., and Bray, R. S.** (1985). *Biology of Leishmania and leishmaniasis*, Elsevier Science.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., and Boelaert, M.** (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, **5**, 873-82.
- Chaudhuri, G., and Chang, K. P.** (1988). Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, **27**, 43-52.
- Choudhury, K., Zander, D., Kube, M., Reinhardt, R., and Clos, J.** (2008). Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *International Journal for Parasitology*, **38**, 1411-23.
- Chuang, S. E., and Blattner, F. R.** (1993). Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **175**, 5242-52.
- Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D. L., and Blattner, F. R.** (1993). Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene*, **134**, 1-6.
- Clos, J., and Brandau, S.** (1994). pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **5**, 133-7.

- Clos, J., and Choudhury, K.** (2006). Functional cloning as a means to identify Leishmania genes involved in drug resistance. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **6**, 123-9.
- Coelho, A. C., Beverley, S. M., and Cotrim, P. C.** (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. *Mol Biochem Parasitol*, **130**, 83-90.
- Couret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., and Antoine, J.-C.** (2002). Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci*, **115**, 2303-16.
- Couvreur, B., Wattiez, R., Bollen, A., Falmagne, P., Le Ray, D., and Dujardin, J. C.** (2002). Eubacterial HslV and HslU subunits homologs in primordial eukaryotes. *Mol Biol Evol*, **19**, 2110-7.
- Cruz, A., and Beverley, S. M.** (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*, **348**, 171-3.
- Cruz, A. K., Titus, R., and Beverley, S. M.** (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1599-603.
- Cunha, F. Q., Assreuy, J., Xu, D., Charles, I., Liew, F. Y., and Moncada, S.** (1993). Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, **23**, 1385-8.
- Davey, B.** (1989). *Immunologie - Eine Einführung*, Basel, Birkhäuser Verlag.
- De Mot, R., Nagy, I., Walz, J., and Baumeister, W.** (1999). Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol*, **7**, 88-92.
- De Souza, W.** (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol*, **123**, 1-18.
- Descoteaux, A., Avila, H. A., Zhang, K., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (2002). Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J*, **21**, 4458-69.
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of Leishmania. *Science*, **269**, 1869-72.
- Descoteaux, A., Matlashewski, G., and Turco, S. J.** (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan. *J Immunol*, **149**, 3008-15.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A.** (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J Exp Med*, **185**, 2061-8.

- Dobson, D. E., Scholtes, L. D., Valdez, K. E., Sullivan, D. R., Mengeling, B. J., Cilmi, S., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (2003). Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required for species-specific modifications of the lipophosphoglycan adhesin controlling *Leishmania* major-sand fly interactions. *J Biol Chem*, **278**, 15523-31.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., Tamar, S., Olivier, M., and Papadopoulou, B.** (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J*, **16**, 2590-8.
- El Fakhry, Y., Ouellette, M., and Papadopoulou, B.** (2002). A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, **2**, 1007-17.
- Elliott, P. J., Pien, C. S., McCormack, T. A., Chapman, I. D., and Adams, J.** (1999). Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 294-300.
- Evans, T. G., Reed, S. S., and Hibbs, J. B., Jr.** (1996). Nitric oxide production in murine leishmaniasis: correlation of progressive infection with increasing systemic synthesis of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg*, **54**, 486-9.
- Freedman, D. J., and Beverley, S. M.** (1993). Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **62**, 37-44.
- Fulton, J. D., and Joyner, L. P.** (1949). Studies on protozoa; the metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **43**, 273-86, pl.
- Garin, Y. J., Sulahian, A., Pratloug, F., Meneceur, P., Gangneux, J. P., Prina, E., Dedet, J. P., and Derouin, F.** (2001). Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infection and Immunity*, **69**, 7365-73.
- Gille, C., Goede, A., Schlöetelburg, C., Preissner, R., Kloetzel, P. M., Göbel, U. B., and Frömmel, C.** (2003). A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol*, **326**, 1437-48.
- Goldberg, A. L., Moerschell, R. P., Chung, C. H., and Maurizi, M. R.** (1994). ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **244**, 350-75.
- Gonzalez, J., Ramalho-Pinto, F. J., Frevert, U., Ghiso, J., Tomlinson, S., Scharfstein, J., Corey, E. J., and Nussenzweig, V.** (1996). Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J Exp Med*, **184**, 1909-18.
- Gorham, J. D., Guler, M. L., Steen, R. G., Mackey, A. J., Daly, M. J., Frederick, K., Dietrich, W. F., and Murphy, K. M.** (1996). Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12467-72.
- Gottesman, S.** (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, **30**, 465-506.

- Gradoni, L., Scalone, A., Gramiccia, M., and Troiani, M.** (1996). Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS*, **10**, 785-91.
- Gregory, D. J., Sladek, R., Olivier, M., and Matlashewski, G.** (2008). Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression. *Infect Immun*, **76**, 1186-92.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., and Huber, R.** (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem*, **6**, 222-56.
- Hall, L. R., and Titus, R. G.** (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol*, **155**, 3501-6.
- Hamann, L., Nickel, R., and Tannich, E.** (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8975-9.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S. I., Hirschberg, K., and Jaffe, C. L.** (1991). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J*, **10**, 4061-7.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., and Schuler, G.** (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*, **26**, 659-68.
- Hoyer, C., Mellenthin, K., Schilhabel, M., Platzer, M., and Clos, J.** (2001). Use of genetic complementation to identify gene(s) which specify species-specific organ tropism of *Leishmania*. *Med Microbiol Immunol*, **190**, 43-6.
- Hoyer, C., Zander, D., Fleischer, S., Schilhabel, M., Kroener, M., Platzer, M., and Clos, J.** (2004). A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest. *International Journal for Parasitology*, **34**, 803-11.
- Hübel, A., Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J.** (1995). A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*, **70**, 107-18.
- Hübel, A., Krobitch, S., Hörauf, A., and Clos, J.** (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 5987-95.
- Ilg, T., Harbecke, D., and Overath, P.** (1993). The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett*, **327**, 103-7.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.** (2002). *Immunologie*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Joshi, P. B., Sacks, D. L., Modi, G., and McMaster, W. R.** (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania* major genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol Microbiol*, **27**, 519-30.
- Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H., and Yura, T.** (1997). Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **179**, 7219-25.
- Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T.** (1999). Marked instability of the sigma(32) heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. *J Biol Chem*, **274**, 22002-7.
- Kang, M. S., Lim, B. K., Seong, I. S., Seol, J. H., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Chung, C. H.** (2001). The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal serine protease. *EMBO J*, **20**, 734-42.
- Katayama, T., Kubota, T., Takata, M., Akimitsu, N., and Sekimizu, K.** (1996). Disruption of the hslU gene, which encodes an ATPase subunit of the eukaryotic 26S proteasome homolog in *Escherichia coli*, suppresses the temperature-sensitive dnaA46 mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, **229**, 219-24.
- Kedzierski, L., Zhu, Y., and Handman, E.** (2006). *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, **133 Suppl**, S87-112.
- Kelly, J. M., Das, P., and Tomas, A. M.** (1994). An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Mol Biochem Parasitol*, **65**, 51-62.
- Killick-Kendrick, R.** (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65 Suppl 1**, 37-42.
- Kitagawa, M., Wada, C., Yoshioka, S., and Yura, T.** (1991). Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32). *J Bacteriol*, **173**, 4247-53.
- Knipfer, N., Seth, A., Roudiak, S. G., and Shrader, T. E.** (1999). Species variation in ATP-dependent protein degradation: protease profiles differ between mycobacteria and protease functions differ between *Mycobacterium smegmatis* and *Escherichia coli*. *Gene*, **231**, 95-104.
- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hübel, A., and Clos, J.** (1998). *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem*, **273**, 6488-94.
- Krobitsch, S., and Clos, J.** (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones*, **4**, 191-8.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lainson, R., Shaw, J. J., and Silveira, F. T.** (1987). Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **81**, 702-3.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., and Solbach, W.** (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, **11**, 210-4.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., and Laskay, T.** (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, **70**, 826-35.
- Launois, P., Ohteki, T., Swihart, K., Macdonald, H. R., and Louis, J. A.** (1995). In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1. *Eur J Immunol*, **25**, 3298-307.
- Lebowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L., and Beverley, S. M.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev*, **7**, 996-1007.
- Li, Z., Lindsay, M. E., Motyka, S. A., Englund, P. T., and Wang, C. C.** (2008). Identification of a bacterial-like HslVU protease in the mitochondria of *Trypanosoma brucei* and its role in mitochondrial DNA replication. *PLoS Pathog*, **4**, e1000048.
- Lodes, M. J., Merlin, G., Devos, T., Ghosh, A., Madhubala, R., Myler, P. J., and Stuart, K.** (1995). Increased expression of LD1 genes transcribed by RNA polymerase I in *Leishmania donovani* as a result of duplication into the rRNA gene locus. *Mol Cell Biol*, **15**, 6845-53.
- Mazia, D., Schatten, G., and Sale, W.** (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, **66**, 198-200.
- Mcgwire, B. S., O'connell, W. A., Chang, K. P., and Engman, D. M.** (2002). Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J Biol Chem*, **277**, 8802-9.
- Mcneely, T. B., Rosen, G., Londner, M. V., and Turco, S. J.** (1989). Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J*, **259**, 601-4.
- Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'garra, A., Fong, T. A., Bond, M. W., Moore, K. W., Sher, A., and Fiorentino, D. F.** (1991). Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol Rev*, **123**, 209-29.
- Mottram, J. C., Coombs, G. H., and Alexander, J.** (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 375-81.

- Murray, H. W.** (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol*, **129**, 351-7.
- O'Connor, O. A., Wright, J., Moskowitz, C., Muzzy, J., Macgregor-Cortelli, B., Stubblefield, M., Straus, D., Portlock, C., Hamlin, P., Choi, E., Dumetrescu, O., Esseltine, D., Trehu, E., Adams, J., Schenkein, D., and Zelenetz, A. D.** (2005). Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, **23**, 676-84.
- Ommen, G., Chrobak, M., and Clos, J.** (2009a). The co-chaperone SGT of *Leishmania donovani* is essential for the parasite's viability. *Cell Stress Chaperones*.
- Ommen, G., Lorenz, S., and Clos, J.** (2009b). One-step generation of double-allele gene replacement mutants in *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol*, **39**, 541-6.
- Pagliano, P., Carannante, N., Gramiccia, M., Ascione, T., Stornaiuolo, G., Gradoni, L., Faella, F. S., and Gaeta, G. B.** (2007). Visceral leishmaniasis causes fever and decompensation in patients with cirrhosis. *Gut*, **56**, 893-4.
- Paredes, R., Munoz, J., Diaz, I., Domingo, P., Gurgui, M., and Clotet, B.** (2003). Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med*, **49**, 39-49.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F., and Berriman, M.** (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, **39**, 839-47.
- Pimenta, P. F., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., and Sacks, D. L.** (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, **115** (Pt 4), 359-69.
- Pimenta, P. F., Turco, S. J., Mcconville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V., and Sacks, D. L.** (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**, 1812-5.
- Power, C. A., Church, D. J., Meyer, A., Alouani, S., Proudfoot, A. E., Clark-Lewis, I., Sozzani, S., Mantovani, A., and Wells, T. N.** (1997). Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med*, **186**, 825-35.
- Proudfoot, L., O'donnell, C. A., and Liew, F. Y.** (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, **25**, 745-50.

- Racoosin, E. L., and Beverley, S. M.** (1997). Leishmania major: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol*, **85**, 283-95.
- Ramachandran, R., Hartmann, C., Song, H. K., Huber, R., and Bochtler, M.** (2002). Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7396-401.
- Ramasamy, G., Gupta, D., Mohammed, A., and Chauhan, V. S.** (2007). Characterization and localization of Plasmodium falciparum homolog of prokaryotic ClpQ/HslV protease. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 139-48.
- Real, F., Pouchelet, M., and Rabinovitch, M.** (2008). Leishmania (L.) amazonensis: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Exp Parasitol*, **119**, 15-23.
- Reiling, L.** (2005). *Varianten der Leishmania major Δ clpB-Mutante: Virulenz und Immunantwort im Mausmodell*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Reiling, L., Chrobak, M., Schmetz, C., and Clos, J.** (2010). Overexpression of a single Leishmania major gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro. *Molecular microbiology*.
- Reiling, L., Jacobs, T., Kroemer, M., Gaworski, I., Graefe, S., and Clos, J.** (2006). Spontaneous Recovery of Pathogenicity by Leishmania major hsp100-/- Alters the Immune Response in Mice. *Infection and Immunity*, **74**, 6027-6036.
- Reiner, S. L., and Locksley, R. M.** (1995). The regulation of immunity to Leishmania major. *Annu Rev Immunol*, **13**, 151-77.
- Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L., and Locksley, R. M.** (1994). Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med*, **179**, 447-56.
- Reynolds, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**, 208-12.
- Ritter, U., Mattner, J., Rocha, J. S., Bogdan, C., and Korner, H.** (2004). The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect*, **6**, 559-65.
- Robertson, C. D.** (1999). The Leishmania mexicana proteasome. *Mol Biochem Parasitol*, **103**, 49-60.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P., Yoo, S. J., Seol, J. H., Chung, C. H., and Goldberg, A. L.** (1996). HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in Escherichia coli related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 5808-13.

- Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S. A., Huang, H. C., Engel, A., Baumeister, W., and Goldberg, A. L.** (1997). The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol*, **4**, 133-9.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P. J., Olafson, R. W., and Zilberstein, D.** (2008a). Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*, **8**, 1843-50.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R. W., and Zilberstein, D.** (2008b). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J*, **22**, 590-602.
- Ruiz-Gonzalez, M. X., and Marin, I.** (2006). Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *J Mol Evol*, **63**, 504-12.
- Ruiz-González, M. X., and Marín, I.** (2006). Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *J Mol Evol*, **63**, 504-12.
- Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (1993). Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8609-13.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S. J., and Zilberstein, D.** (1998). Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, **95**, 9-20.
- Sacks, D., and Noben-Trauth, N.** (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, **2**, 845-58.
- Sacks, D. L., Pimenta, P. F., Mcconville, M. J., Schneider, P., and Turco, S. J.** (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*, **181**, 685-97.
- Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S. J., and Pimenta, P. F.** (1994). The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology*, **108 Suppl**, S55-62.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sanchez, Y., and Lindquist, S. L.** (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, **248**, 1112-5.
- Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A., and Lindquist, S.** (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol*, **175**, 6484-91.

- Saxena, A., Lahav, T., Holland, N., Aggarwal, G., Anupama, A., Huang, Y., Volpin, H., Myler, P. J., and Zilberstein, D.** (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, **152**, 53-65.
- Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C., and Clos, J.** (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 65-74.
- Schmidtke, G., Holzhutter, H. G., Bogyo, M., Kairies, N., Groll, M., De Giuli, R., Emch, S., and Groettrup, M.** (1999). How an inhibitor of the HIV-1 protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem*, **274**, 35734-40.
- Schulte, T., Kurrle, R., Rollinghoff, M., and Gessner, A.** (1997). Molecular characterization and functional analysis of murine interleukin 4 receptor allotypes. *J Exp Med*, **186**, 1419-29.
- Seder, R. A., and Paul, W. E.** (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*, **12**, 635-73.
- Seong, I. S., Oh, J. Y., Lee, J. W., Tanaka, K., and Chung, C. H.** (2000). The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of Sula, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **477**, 224-9.
- Silva-Jardim, I., Horta, M. F., and Ramalho-Pinto, F. J.** (2004). The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop*, **91**, 121-30.
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J., and Reiner, N. E.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*, **9**, R35.
- Silverman, J. M., Clos, J., De'oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J., and Reiner, N. E.** (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci*, **123**, 842-52.
- Späth, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 9258-63.
- Späth, G. F., Lye, L.-F., Segawa, H., Turco, S. J., and Beverley, S. M.** (2004). Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infection and Immunity*, **72**, 3622-7.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M., and Bogdan, C.** (1994). Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med*, **180**, 783-93.

- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Sundar, S.** (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, **6**, 849-54.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., and Berman, J.** (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*, **347**, 1739-46.
- Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C., and Murray, H. W.** (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*, **31**, 1104-7.
- Tsien, R. Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-44.
- Turco, S., Descoteaux, A., Ryan, K., Garraway, L., and Beverley, S.** (1994). Isolation of virulence genes directing GPI synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Braz J Med Biol Res*, **27**, 133-8.
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T.** (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, **173**, 6521-5.
- Vanloubbeek, Y., and Jones, D. E.** (2004). The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci*, **1026**, 267-72.
- Von Stebut, E.** (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*, **17**, 115-22.
- Wang, J., Song, J. J., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Im, Y. J., Rho, S. H., Seong, I. S., Lee, C. S., Chung, C. H., and Eom, S. H.** (2001). Crystal structures of the HsIVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure*, **9**, 177-84.
- Wyllie, S., Cunningham, M. L., and Fairlamb, A. H.** (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, **279**, 39925-32.
- Yoo, S. J., Seol, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L., and Chung, C. H.** (1996). Purification and characterization of the heat shock proteins HsIV and HsIU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **271**, 14035-40.
- Zamora-Veyl, F., Kroemer, M., Zander, D., and Clos, J.** (2005). Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania donovani*, CPN10. *Kinetoplastid Biol Dis*, **4**, 3.
- Zhang, W. W., and Matlashewski, G.** (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 8807-11.

- Zhang, W. W., and Matlashewski, G.** (2004). In vivo selection for *Leishmania donovani* miniexon genes that increase virulence in *Leishmania major*. *Mol Microbiol*, **54**, 1051-62.
- Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V., and Shapira, M.** (2001). Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, **276**, 47922-9.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5'UTR	5'-terminale, untranslatierte Region
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	mikro
Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase (<i>alkaline phosphatase</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cos	Cosmid
C-terminal	am Carboxyende
CR	Komplementrezeptor (<i>complement receptor</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleotide acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescence protein</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol

EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalkraft (9.81m/s ²)
G418	Geneticin
GIPL	Glykosylinositolphospholipid
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His ₁₀	zehn Histidinreste am N-Terminus eines Proteins
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsl	<i>heat shock locus</i>
Hsp	Hitzeschock Protein (<i>heat shock protein</i>)
hygro	Hygromycin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
lac	Laktose Operon
LB	Luria-Bertani
<i>L-Ag</i>	<i>Leishmania</i> Antigen
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LPG	Lipophosphoglycan
M	Mol pro Liter (molar)
m	Milli
mcs	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	am Aminoende
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ (<i>power of hydrogen</i>)
pk	polyklonal
PKC	Proteinkinase C
puro	Puromycin
PV	parasitophore Vakuole
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
T _M	Schmelztemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Tween	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
UTR	Untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp

6.2. Veröffentlichungen

Ommen, G., **Chrobak, M.**, and Clos, J. (2009). *The co-chaperone SGT of Leishmania donovani is essential for the parasite's viability*. Cell Stress and Chaperones, Vol. 15, Number 4 (p 443-455)

Reiling, L., **Chrobak, M.**, Schmetz, C., and Clos, J. (2010). *Overexpression of a single Leishmania major gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro*. Molecular Microbiology, Vol. 76, Issue 5 (p 1175-1190)