Identifizierung eines Antimon-Resistenz-Markergens aus *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Department Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Andrea Nühs

aus Hamburg

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Fachbereich 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. G. ADAM
Tag der Disputation: 03. September 2010

Hamburg, den 17. August 2010

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Herrn PD Dr. Joachim Clos übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Mai 2006 bis Dezember 2009 und im Juli und August 2009 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt. Vom Januar 2009 bis Juni 2009 wurden die experimentellen Arbeiten am „Instituto de Medicina Tropical, Alexander von Humboldt“ in Lima, Peru durchgeführt.

Gefördert wurde die Arbeit durch das EU-Projekt LeishEpiNetSA, wobei der Forschungsaufenthalt in Lima durch den DAAD gefördert wurde.

1. Gutachter: PD Dr. Joachim Clos
2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Adam

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 7

1.1 Leishmaniasen und ihre Bedeutung für die Menschen 7
1.2 Erreger der Leishmaniasen 8
1.2.1 Besonderheiten der Genexpression in Leishmania spp. 8
1.3 Lebenszyklus von Leishmania 8
1.3.1 Das Insektenstadium (Wirt-Stadium) 8
1.3.2 Das Säugetierstadium (Zwischenwirt-Stadium) 9
1.4 Krankheitsformen 9
1.4.1 Mukokutane Leishmaniasis (MCL, häufig L. braziliensis-Infektionen) 10
1.5 Therapiemöglichkeiten der Leishmaniasen 10
1.6 Überlebensstrategie von Leishmania im Säugetierstadium 12
1.7 Wie eliminiert Antimon die Leishmania-Parasiten im Säugetierstadium? 13
1.8 Resistenzmechanismen 14
1.8.1 Mögliche Wege zur Ausbildung von therapieresistenten Leishmaniasen 14
1.8.2 Bekannte Sb-Resistenzmechanismen in Leishmania 15
1.8.2.1 Sb-Resistenzmechanismen in in vitro-erzeugten resistenten Leishmania 15
1.8.2.2 Sb-Resistenzmechanismen von Leishmania-Feldisolaten 16
1.9 Prinzip der Funktionellen Komplementation 18
1.10 Zielsetzung der Arbeit 20

2. Material und Methoden 21

2.1 Material 21
2.1.1 Geräte 21
2.1.2 Chemikalien und Lösemittel 22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien 23
2.1.4 Kits 24
2.1.5 DNA-Längenstandards 24
2.1.6 Enzyme 24
2.1.7 DNA-Oligonukleotide (primer) 24
2.1.8 Cosmid-Vektor pcosTL 25
2.1.9 Nährmedien 26
2.1.10 Bakterienstamm 27
2.1.11 Leishmania-Stämme 27
2.1.12 Häufig verwendete Puffer und Lösungen 28
2.1.13 Verwendete Programme und Datenbanken 28
2.2 Methoden 29
2.2.1 Kultivierung von promastigoten Leishmania 29
2.2.1.1 Kultivierung von L. braziliensis auf biphasischem Medium 29
2.2.1.2 Kultivierung von L. braziliensis in S10/2 (mod. Schneider‘s Insect Medium) 29
2.2.1.3 Kultivierung von L. braziliensis in S10/- (mod. Schneider‘s Insect Medium) 29
2.2.1.4 Kultivierung von L. peruviana in S10/2 (mod. Schneider‘s Insect Medium) 29
2.2.1.5 Kultivierung von L. infantum in mod. M199 (modifiziertes M199-Medium) 29
2.2.2 Einfrieren von Leishmania-Stammkulturen 30
2.2.3 Transfektion von DNA durch Elektroporation (Standard-Elektroporation) 30
2.2.4 Sb(III)-Selektion 30
2.2.5 Limiting dilution-Analyse 31
2.2.6 Herstellung einer genomischen Cosmidbank-DNA (pcosPER104) 31
2.2.6.1 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA zur Herstellung von Cosmidbank-DNA 31
2.2.6.2 Partialverdau der hochmolekularen gDNA 32
2.2.6.3 Vorbereitung des Cosmidvektors pcosTL 32
2.2.6.4 Ligationsreaktion der gDNA-Fragmente mit dem Cosmidvektor pcosTL 33

2.2.6.5 Verpackung der Ligationsreaktion in Phagenpartikel 33
2.2.6.6 Vorbereitung der Wirtsbakterien E. coli XL1-Blue 33
2.2.6.7 Infektion und Amplifikation der Wirtsbakterien E. coli XL1-Blue 34
2.2.6.8 Vereinigung und Lagerung Cosmidbank-DNA 34
2.2.7 Isolierung von Cosmid-DNA 34
2.2.7.1 Isolierung reiner Cosmid-DNA aus E. coli (Maxi-Cosmid-Präparation) 34
2.2.7.2 Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmania 34
2.2.7.3 Isolierung Cosmid-DNA aus E. coli in geringen Mengen (Mini-Cosmid-Präparation) 35
2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion 35
2.2.9 Ethanol-Fällung von DNA 35
2.2.10 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren 36
2.2.11 Enzymatische Modifikationen von DNA 36
2.2.11.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase 36
2.2.11.2 Anwendungen von Restriktionsendonukleasen zur Spaltung von DNA 36
2.2.11.3 Klenow-Auffüllreaktionen 37
2.2.11.4 Ligation von DNA-Fragmenten 37
2.2.12 Herstellung kompetenter E. coli XL1-Blue 37
2.2.13 Transformation von DNA in E. coli XL1-Blue durch Elektroporation 38
2.2.14 Agarosegelelektrophorese (AGE) 38
2.2.15 Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE) 38
2.2.16 Isolierung von DNA aus Agarosegelen 39
2.2.17 Partielle Sequenzanalysen zur Bestimmung der insert-DNA von Cosmiden 39
2.2.18 Sequenzanalysen durch Primer Walking 40
2.2.19 Semi-quantitatine real-time RT-PCR 40

3. Ergebnisse 41
3.1 Charakterisierung der Feldisolate L. braziliensis PER002 (PER002) und L. braziliensis PER104 (PER104) 41
3.1.1 Herkunft der Feldisolate PER002 und PER104 41
3.1.2 In vitro Charakterisierung der Feldisolate PER002 und PER104 41
3.1.3 In vivo Charakterisierung der Feldisolate PER002 und PER104 43
3.2 Screening der Leishmania braziliensis Cosmidbank-DNA von PER104, Sb(III)R 43
3.2.1 Funktionelle Komplementation 43
3.2.2 Herstellung einer genomischen Cosmidbank-DNA von PER104, Sb(III)R 44
3.2.3 Überprüfung der Repräsentativität der Cosmidbank-DNA pcosPER104 46
3.2.3.1 Ermittlung der durchschnittlichen Fragmentgröße in den Cosmiden der Genbank 46
3.2.3.2 Ermittlung der Repräsentativität der Cosmidbank-DNA pcosPER104 46
3.2.4 Etablierung der Cosmidbank-DNA pcos104 in PER002K7 46
3.2.4.1 Ermittlung der Transfektionseffizienz für Isolat PER002K7 47
3.2.4.2 Transfektion der Cosmidbank-DNA pcosPER104 in PER002K7 47
3.2.5 Etablierung der Cosmidbank-DNA pcos104 in L. peruviana LC2434, Klon 5 (LC2434K5) 47
3.2.5.1 Ermittlung der Transfektionseffizienz für Isolat LC2434K5 47
3.2.5.2 Transfektion der Cosmidbank-DNA pcosPER104 in LC2434K5 47
3.2.6 Selektionen S1, S2 und S3: L.brPER002K7[pcosPER104] in vitro Selektion mit Sb(III) 48
3.2.6.1 Verlauf der Selektionen S1, S2 und S3 48
3.2.6.2 Selektion S1, S2 und S3: Auswertung der Cosmidtypen 50
3.2.7 Selektion S4: L.peLC2434K5[pcosPER104] in vitro Selektion mit Sb(III) 53
3.2.7.1 Verlauf der Selektion S4 53
3.2.7.2 Selektion S4 (S4-1 und S4-2): Auswertung der Cosmidtypen 55
3.2.7.3 Selektion S4 (S4-1 und S4-2): Auswertung der Cosmidtypen der Wachstums-kontrolle 60
3.3 Analysen zum Cosmidtyp pcosC1.6 und seine Homologa 61
3.3.1 Vergleiche der pcosC1.6-Homologa 61
3.3.2 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosC1.6 in L. braziliensis 62
3.4 Vom Cosmid zum Gen: Identifizierung des Sb(III)-Resistenz vermittelnden Gens 63

3.4.1 Verkleinerung von pcosC1.6 durch verschiedene Klonierungsstrategien 63
3.4.1.1 Klonierung von pcosC1.6-Deletionskonstrukten 63
3.4.1.2 Klonierung von Sequenzabschnitten aus pcosC1.6 in den Vektor pcosTL 65
3.4.2 Selektion S5: Kompetitive in vitro Sb(III)-Selektion von pcosC1.6, -D1 bis -D4 und pcosK1 66
3.4.2.1 Selektion S5: Transfektion von PER002K7 mit pcosC1.6, den Konstrukten pcosD1 bis -D4 und pcosK1 67
3.4.2.2 Verlauf der Selektion S5 68
3.4.2.3 Selektion S5: Auswertung der Cosmidtypen 69
3.4.3 Selektion S6 bis S8: Kompetitive Sb(III)-Selektion von pcosC1.6, -D1 bis -D6 und pcosK2 bis -K3 71
3.4.3.1 Selektion S6 bis S8: Transfektion von PER002K7 mit pcosC1.6, -D1 bis -D6 und pcosK2 bis -K4 71
3.4.3.2 Verlauf der Selektionen S6 bis S8 72
3.4.3.3 Selektion S6 bis S8: Auswertung der Cosmidtypen 74
3.4.4 Klonierung der Leserahmen Nr. 210 und 220 aus pcosK4 in den Vektor pcosTL 76
3.4.4.1 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosK5 und -K6 in L. braziliensis 77
3.4.5 Wechsel des Versuchsorganismus von L. braziliensis zu L. infantum 78
3.4.5.1 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosC1.6 in L. infantum 78
3.4.5.2 Selektion S9 und S10: Kompetitive Sb(III)-Selektion von pcosC1.6 und seinen Derivaten in L. infantum 79
3.4.5.2.1 Selektion S9 und S10: Transfektion von MON-1K3511 mit pcosC1.6, -D1, -D2, -K2, -K4, -K5 und -K6 79
3.4.5.2.2 Verlauf der Selektionen S9 und S10 80
3.4.5.2.3 Selektion S9 und S10: Auswertung der Cosmidtypen 82
3.4.5.3 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosK5 in L. infantum 84
3.4.5.4 Überprüfung der Genexpression des L. braziliensis Leserahmens Lb-210 in L. infantum MON-1K3511 85
3.5 Charakteristika des Genprodukts von Lb-210 (LbrM20_V2.0210) 86
3.5.1 Erweiterte Datenbank-Recherchen zum Gen Lb-210 86
3.5.2 Charakteristika des Gens Lb-210 im Vergleich zu Gen Lb-200 88
3.6 Ermittlung der Genexpression von Lb-210 in L. braziliensis Feldisolaten Sb(V)R/S 95
3.6.1 Auswahl der zu untersuchenden L. braziliensis Feldisolate 95
3.6.2 Bestimmung der Genexpression von Lb-210 in L. braziliensis Feldisolaten 96

4. Diskussion 98
4.1 Funktionelle Komplementation als Strategie zur Identifizierung von Sb(III)-Resistenzmarker-Genen 98
4.1.1 Funktionelle Komplementation: Vor- und Nachteile dieser Strategie 98
4.1.2 Funktionelle Komplementation: Beispiele in der Anwendung mit Leishmania spp. 100
4.2 RNA-Interferenz (RNAi) und Genetische Komplementation 100
4.2.1 Wirkmechanismus der RNAi 100
4.2.2 RNAi in Leishmania spp. 101
4.2.3 Funktionelle Komplementation und RNAi 101
4.3 Allgemeine Schwierigkeiten bei Untersuchungen der natürlichen Antimon-Resistenz in Leishmania 101
4.4 Dominante, homologe Cosmide nach Sb(III)-Selektionen 102
4.4.1 Merkmale der verwendeten L. braziliensis Feldisolate PER002 und PER104 102
4.4.2 Sb(III)-Selektionen 103
4.5 Gen Lb-210 (LbrM20_V2.0210) vermittelt Antimon-Resistenz 103
4.6 Mögliche biologische Funktion von Gen Lb-210 (LbrM20_V2.0210) 106
4.7 Ausblick 111

5. Zusammenfassung 113
5.1 Abstract 115

6. Anhang 117

7. Literaturverzeichnis 124

8. Abkürzungsverzeichnis 131

9. Danksagungen 133

1. Einleitung

1.1 Leishmaniasen und ihre Bedeutung für die Menschen

Die Leishmaniasis ist eine Infektionskrankheit, die durch parasitische Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufen wird. Sie tritt vor allem in subtropischen und tropischen Ländern auf, wo sie durch den Biss einer Sandmücke der Gattungen: *Lutzomyia* (Neue Welt) und *Phlebotomus* (Alte Welt) auf den Menschen übertragen wird. Aktuell stuft die Weltgesundheitsorganisation (WHO) diese Erkrankung als eine der wichtigsten vernachlässigten Erkrankungen (*Neglected Tropical Diseases*) ein (www.who.int/). Sie ist in 88 Ländern endemisch, in denen geschätzte 350 Millionen Menschen mit dem Risiko einer Erkrankung leben. Die Zahl der weltweit infizierten Menschen wird auf 12 Millionen geschätzt mit jährlich etwa 2 Millionen Neuinfektionen [1-3].
Ausserdem werden die Leishmaniasen zu den Armuts-assoziierten Krankheiten gezählt. Das liegt an dem erhöhten Infektionsrisiko z.B. durch primitive Wohnverhältnisse und schlechten Zugang zu medizinischer Grundversorgung. Ebenso stellt die sozio-ökonomische Migration armer Bevölkerungsgruppen in noch unerschlossene sylvatische Regionen einen engeren Kontakt zwischen Sandmücke und Menschen her und steigert somit das Infektionsrisiko. Zudem ist die Diagnose und Therapie für diese Bevölkerungsschicht oft kaum zu finanzieren, was zur Verzögerung der Behandlung und damit zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führt und gleichzeitig eine weitere Verarmung zur Folge hat [4]. In bestimmten Endemiegebiete (z.B. Brasilien, Indien, Ost-Afrika, Mittelmeerraum) sind besonders Kinder für die schwere Verlaufsform der Leishmaniasis (viszerlale Leishmaniasis) anfällig, was auf die vorherrschende *Leishmania*-Spezies aber auch auf den schlechten Ernährungszustand von Kindern in einigen Regionen zurückzuführen ist [5-8].
Trotz vieler Studien zur Entwicklung von Impfstoffen gibt es bis heute keine geeignete Impfung [9]. Ebensowenig ist eine medikamentöse Prophylaxe verfügbar, wodurch die Leishmaniasen für die Reisemedizin ein erhebliches Problem darstellen. In Deutschland wurden zwischen 2003 und 2007 insgesamt 130 importierte Leishmaniasen registriert. Da es jedoch keine meldepflichtige Erkrankung ist, liegt die tatsächliche Zahl der infizierten Menschen wahrscheinlich erheblich höher [10].
Spekuliert wird zudem eine Ausbreitung der Erreger-Spezies auch in gemäßigte Breiten durch eine globale Klimaerwärmung [10, 11]. Am Beispiel Deutschland sind dabei als potentielle Infektionsquellen nicht nur die importierten Leishmaniasen durch infizierte Menschen, sondern auch die aus Südeuropa importierten, infizierten Hunde (~150 000) vorstellbar [10]. Zwei Verdachtsfälle autochthoner Leishmaniasen ergaben sich bei einem Kind und einem Pferd, die Deutschland nie verlassen hatten [12, 13]. Ebenso wurde eine Sandmücken-Spezies (*Phlepotomus mascittii*) in Süddeutschland entdeckt, jedoch ohne nachweisbares Überträger-Potential [14, 15].
Weltweit steigende HIV-Infektionen in der Bevölkerung führten auch zu vermehrten *Leishmania*/HIV-Koinfektionen. Beide Erkrankungen zerstören Immunabwerzellen, was eine verschlechterte Immunabwehr zur Folge hat. Standard-Medikamente zur Behandlung der *Leishmania*-Infektion führen aufgrund der deutlich schlechteren Immunkompetenz dieser Patienten häufig nicht zum Erfolg [16].
In der Vergangenheit wurde die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie von Leishmaniasen stark vernachlässigt, was sich heute an der begrenzten Auswahl an Therapeutika bemerkbar

macht. Dieser Mangel an Behandlungsalternativen macht es schwierig wirksame Alternativ-Behandlung zu finden, nicht nur für die komplizierten *Leishmania*/HIV-Koinfektionen, sondern auch für Patienten mit Unverträglichkeiten gegenüber der Standard-Medikation und nicht zuletzt für die deutlich steigenden Zahlen an Patienten mit Therapieresistenten *Leishmania*-Infektionen [17-19]. Es ist daher um so wichtiger, zur Verbesserung der Therapie-Möglichkeiten beizutragen, um Behandlungserfolge zu gewährleisten und damit auch die Ausbreitung der Krankheit einzudämmen. Resistenzmarker können sowohl dazu beitragen, eine optimierte Behandlung zu gewährleisten als auch neue Medikamente zu entwickeln und sind zudem eine Hilfe bei epidemiologischen Erfassung bzw. Beobachtung zur Medikamenten-Resistenz.

1.2 Erreger der Leishmaniasen

Die Erreger dieser Infektionskrankheit sind einzellige Protozoen der Gattung *Leishmania*, die zur Familie der Trypanosomatidae, Ordnung Kinetoplastida gehören. Ein kennzeichnendes Merkmal der Kinetoplastida ist der namensgebende Kinetoplast, der einen Abschnitt des einzigen Mitochondriums der Zellen darstellt und etwa 15 % der gesamten zellulären DNA enthält. *Leishmania* durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus, in dessen Verlauf sie zwischen begeißelten, promastigoten Formen (Insektenstadium) und unbegeißelten, amastigoten Formen (Säugetierstadium) differenzieren.

1.2.1 Besonderheiten der Genexpression in *Leishmania* spp.

Trypanosomatidae verfügen über einzigartige Mechanismen zur Genregulation. Während in den meisten Organismen die Kontrolle der Genexpression hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation stattfindet, erfolgt die Regulation der Genexpression in Trypanosomatidae hauptsächlich post-transkriptionell [20].
Die Gene liegen dabei in sog. Multigeneinheiten vor und die Transkription erfolgt polycistronisch. Ein *cis*-Spleissen ist nicht erforderlich, da die Genen keine Introns (nicht-kodierenden Bereiche) enthalten. Nach dem Entfernen der intergenischen Regionen reifen polycistronische prä-mRNAs zu monocistronische mRNAs. Dies erfolgt durch das Anhängen einer *spliced leader* (SL) Sequenz an das 5‘-Ende jeder einzelnen prä-mRNA. Diese 39 bp lange Sequenz verfügt an ihrem 5‘-Ende über eine *cap*-Struktur in Form eines 7-Methylguanosin-Rests. Das *trans*-Spleissen bezeichnet die Verbindung der SL-Sequenz mit dem 5‘-Ende der prä-mRNAs und ist ein kotranskriptioneller Vorgang [21, 22]. Gleichzeitig erfolgt die Polyadenylierung am 3‘-Ende der prä-mRNAs. Die 5‘- und 3‘-untranslatierten Regionen (UTRs) variieren je nach Transkript und haben einen regulatorischen Einfluss auf die Expression [20, 23].

1.3 Lebenszyklus von *Leishmania*

1.3.1 Das Insektenstadium (Wirt-Stadium)

Die Parasiten leben extrazellulär im Darmlumen weiblicher Sandmücken als begeißelte, 15 bis 25 µm lange Promastigoten. Sie heften sich durch Seitenketten der Oberflächen-Lipophosphoglykane (LPG) an Lektinrezeptoren der Darmwand und verhindert so eine Exkretion [24]. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Vermehrung der Parasiten im Insektenstadium sowohl asexuell als auch sexuell

erfolgen kann [25], was die Sandmücke als Hauptwirt definiert. Nach einer Metazyklogenese, bei der sich die Parasiten in etwa 5 bis 8 µm lange, infektiöse metazyklische Formen umwandeln, wandern sie in den vorderen Darmabschnitt der Sandmücke und können bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Zwischenwirt (Säugetier, Mensch) übertragen werden [24].

1.3.2 Das Säugetierstadium (Zwischenwirt-Stadium)

Etwa 100 bis 1000 Parasiten gelangen bei dem Biss einer infektiösen Sandmücke unter die Epidermis des Zwischenwirts und erreichen dessen Gewebsflüssigkeit oder Blutgefäßsystem [24]. Die Aufnahme der Parasiten in ihre Wirtszellen des Säugetierstadiums, den Makrophagen, ist nicht vollständig geklärt. Vieles weist auf eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme hin [26], wobei auch eine Beteiligung von neutrophilen Granulozyten diskutiert wird [27]. Nach der Aufnahme in der Makrophagen befinden sich die Parasiten in den Phagosomen, wo die Differenzierung von der begeißelten Promastigote zur unbegeißelten, 2 bis 5 µm großen Amastigote stattfindet [28]. Nach einer Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosomen zum sog. Phagolysosomen sind die Amastigoten in der Lage, sich durch mitotische Teilung zu vermehren. Es wird angenommen, dass die Wirtszellen aufgrund steigenden Parasiten-Zahlen bersten und so die Amastigoten in die nächste Umgebung freisetzen. Entgegen dieser Meinung deuten Video-Mikroskopie Daten an, dass Vakuolen, welche mit Amastigoten gefüllt sind, an der Peripherie der Zelle akkumulieren und die Erreger durch einen exozytose-ähnlichen Prozess absondert [29]. Im extrazellulären Raum werden die Parasiten entweder erneut von Makrophagen oder durch eine Blutmahlzeit der Sandmücke aufgenommen. Im Insekt wiederum differenzieren die Amastigoten zu Promastigoten, womit sich der Infektionszyklus schließt.

1.4 Krankheitsformen

Weltweit unterscheidet man etwa 30 *Leishmania*-Spezies, von denen etwa 17 bis 20 humanpathogen sind [9, 17, 30]. Abhängig von der *Leishmania*-Spezies rufen die *Leishmania*-Infektionen komplexe Krankheitsformen hervor, deren jeweilige Form und Schwere auch zu einem gewissen Grad von der Immunantwort des befallenden Individuums abhängt [31, 32]. Anhand klinischer Manifestationen werden Krankheitsformen klassifiziert in:

- Viszerale Leishmaniasis (VL)
- Kutane Leishmaniasis (CL)
- Mukokutane Leishmaniasis (MCL)

Die CL stellen mit jährlich etwa 1,5 Millionen Neuinfektionen den weit höchsten Anteil dar [33]. 90 % aller CL treten in den hochendemischen Länder Afghanistan, Brasilien, Iran, Peru, Saudi Arabien und Syrien auf (WHO: www.who.int/leishmaniasis/burden/en/). Hervorgerufen wird sie durch die *Leishmania*-Spezies *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* in der Alten Welt und durch Erreger des *L. mexicana*- und *L. braziliensis*-Komplexes in der Neuen Welt. Nach einer Infektion mit einem dieser Erreger entwickelt sich unmittelbar an der Übertragungsstelle eine rote Papel, die nach dem Heranwachsen zu einem Knoten zumeist ulzeriert. Die Krankheitsverläufe der CL werden unterschieden in a) hervorgerufen durch Erreger der Alten Welt (OWCL) bzw. b) hervorgerufen durch Erreger der Neuen Welt (NWCL). Bei den erstgenannten OWCL heilen die Ulzera

für gewöhnlich spätestens nach zwei Jahren spontan ab, hinterlassen jedoch eine flache, z.T. entstellende Narbe. Die zweitgenannten NWCL heilen deutlich langsamer und verläuft klinisch schwerer [34]. Abbildung 1.1 zeigt eine aktive Läsion einer NWCL.

Bei der MCL handelt es sich um eine besonders schwere Manifestation der Leishmaniasis, die hauptsächlich von dem Erreger *L. braziliensis* verursacht wird und aus einer zunächst kutanen Verlaufsform (CL) hervorgeht. Diese Form wird eingehender im nachfolgenden Kapitel (1.4.1) beschrieben.

Die VL weist den schwerwiegendsten klinischen Verlauf auf und wird durch den Erreger des *L. donovani*-Komplexes verursacht. Schätzungen belaufen sich auf jährlich 500 000 Neuinfektionen. Die Erkrankung manifestiert sich im gesamten Organismus und führt unbehandelt zum Tod [33].

1.4.1 Mukokutane Leishmaniasis (MCL, häufig *L. braziliensis*-Infektionen)

Die MCL wird durch Erreger des Subgenus *Viannia* hervorgerufen, jedoch hauptsächlich von *L. braziliensis* und führt zu einer massiven Gewebszerstörung im Nasopharynx. Es handelt sich dabei um eine Ausbreitung der Erreger aus den ursprünglich kutanen Herden in die Schleimhäute und tritt bei etwa 1 bis 5 % der Infektionen mit *Viannia* spp. auf. 50 % der MCL entstehen innerhalb 2 Jahren nach der primären CL, 90 % innerhalb von 10 Jahren. Die Zerstörung des Gewebes beginnt meistens am Nasenseptum mit nachfolgender Perforation und schreitet vom Nasen-Rachen-Raum bis hin zur Trachea fort. Auch die Augen können betroffen sein. Unbehandelt führt sie z.B. durch Schluckunfähigkeit oder Superinfektionen zum Tod [34]. Abbildung 1.1 zeigt eine CL und MCL, die durch die Erreger des Subgenus *Viannia* verursacht wurden.

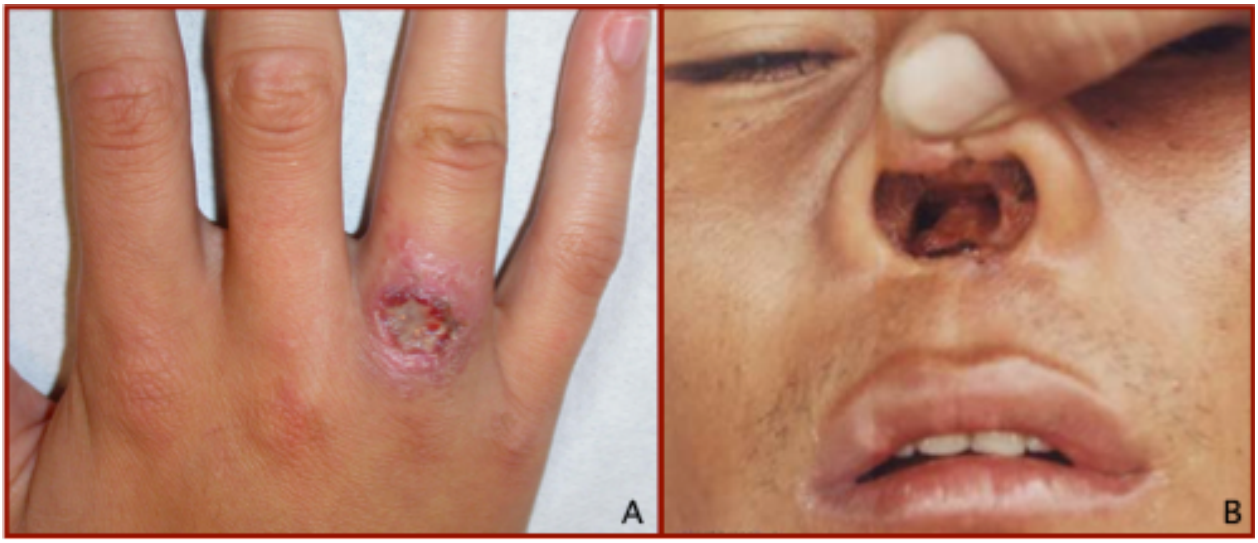

Abb. 1.1 Kutane und Mukokutane Leishmaniasis verursacht durch *Leishmania* des Subgenus *Viannia*. (A) Aktive Läsion einer kutanen Leishmaniasis durch *Leishmania* des Subgenus *Viannia* (NWCL). Infiziert in Costa Rica und nach Deutschland importiert. (B) Aktive Läsion einer mukokutanen Leishmaniasis durch den Erreger *L. (V.) braziliensis*. Befallene Nasenschleimhaut mit perforiertem Nasenseptum und Schwellung der Oberlippe. Der 38-jährige Mann stammt aus dem Amazonas-Gebiet [136].

1.5 Therapiemöglichkeiten der Leishmaniasen

Seit über 60 Jahren werden zur Behandlung von *Leishmania*-Infektionen im Menschen pentavalente Antimon(Sb)-Verbindungen eingesetzt, die bis heute, entsprechend den Leitlinien der

WHO, die Therapeutika der Wahl sind [17, 35, 36]. Dabei kommen am häufigsten die Medikamente Pentostam® (Natriumstibogluconat) und Glucantim® (N-Methylglucaminantimonat) zum Einsatz. Auf den Wirkmechanismus wird in Kapitel 1.7 genauer eingegangen. Die Verabreichung erfolgt entweder intravenös oder intramuskulär, was eine stationäre Behandlung im Krankenhaus erfordert. Die aktuelle Empfehlung gibt eine Behandlung von täglich einer Gabe über einen Zeitraum von 20 Tagen vor, die von sehr schwerwiegend Nebenwirkungen begleitet sein kann, worunter als gefährlichste die Kardiotoxizität ist. Sollte die Behandlung ohne Erfolg verlaufen, schlägt die WHO eine Wiederholung des Behandlungszyklus vor. Seit etwa 20 Jahren treten verstärkt Sb Therapie-resistente *Leishmania*-Infektionen auf, die Regional die klinische Anwendung dieser Präparate in Frage stellen [17, 18]. Die bereits bekannten Resistenz-mechanismen werden in Kapitel 1.8 näher beschrieben.

Die Behandlungsalternative der ersten Wahl ist Amphotericin B. Das antimikrobielle Polyen-Antibiotikum wird seit den 60-iger Jahren in der Behandlung von *Leishmania*-Infektionen eingesetzt. Der Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt, jedoch deutet sich an, dass Amphotericin B an Sterole, primär an Ergosterol (eine Komponente der *Leishmania*-Membran) bindet. Diese Interaktion führt vermutlich zur Porenbildung oder Bildung von Kanälen, die die Membran-permeabilität so stark stören, dass die Zelle abstirbt [17, 37]. Aufgrund der starken Neben-wirkungen bei der Behandlung, wurde das weniger toxische liposomale Amphotericin B entwickelt, was ebenfalls mit hoher Effektivität eingesetzt werden kann [38, 39]. Die enormen Kosten dieses Medikaments führen jedoch dazu, dass die Behandlung nur einer ausgewählten Gruppe zuteil wird; dem größten Teil der Betroffenen in den Endemiegebieten bleibt sie jedoch dadurch verwehrt [40]. Die Applikation erfolgt während eines stationären Aufenthalts im Krankenhaus intravenös. Im Vergleich zur Sb-Therapie ist die Behandlungsdauer jedoch nur halb so lang. Fälle von klinischer Amphotericin B-Resistenz sind bisher nur vereinzelnd aufgetreten [17, 41], jedoch ist mit der Zunahme des Gebrauchs mit einem verstärkten Auftreten Amphotericin B-behandlungsresistenter *Leishmania*-Infektionen zu rechnen.

Das kürzlich zur Behandlung von Leishmaniasen eingeführte Medikament Impavido® wurde ursprünglich im Rahmen der Krebsforschung entwickelt. Der Wirkstoff Miltefosin, ein Hexadecyl-phosphochlin, wird vor allem in der Behandlung von VL eingesetzt. Auch hier ist der Wirk-mechanismus nicht vollständig geklärt. Eine Studie deutet an, dass Miltefosin inhibierend auf den Ether-Lipid Stoffechsel wirkt. Die Ether-Lipide sind Bestandteile der Zelloberflächen-Moleküle wie Glycoproteine (z.B. GP63) und Glykolipide (z.B. LPG, GIPL), die wie in 1.6 erwähnt wird, für das Überleben der Erreger im Makrophagen wichtig sind. Der große Vorteil bei der Behandlung von *Leishmania*-Infektionen mit Miltefosin besteht darin, dass es oral verabreicht wird. Das ermöglicht eine Behandlung von Patienten, die zuvor aufgrund beschränkter Krankenhauskapazitäten nicht therapiert werden konnten. Des weiteren fallen die Kosten für einen Krankenhausaufenthalt weg und auch der damit verbundene Arbeitsausfall ist nicht gegeben. Therapieresistenzen wurden bisher nicht beobachtet, was an der noch kurzen Anwendungszeit liegt.

Das Aminoglycosid-Antibiotikum Paromycin wurde Ende 2006, nach erfolgreich durchgeführten Phase III-Studien, in Indien für die Behandlung von VL zugelassen (www.oneworldhealth.org). Der Wirkmechanismus in *Leishmania* findet vermutlich über die Bindung der Aminoglycoside an die Ribosomen statt und induziert damit Fehlfunktionen in der Atmungskette und eine Depolarisation in der Mitochondrienmembran [42]. *In vitro* und *in vivo* Experimente ermittelten jedoch Spezies-spezifisch unterschiedliche Sensitivitäten gegen Paromycin [17], was eine eingeschränkte Anwendbarkeit andeutet.

Ein weiteres Therapeutikum, Pentamidin, wurde lange Zeit als Behandlungsalternative der ersten Wahl nach den Sb-Verbindungen eingesetzt, hat jedoch aufgrund steigender Zahlen therapie-resistenter *Leishmania*-Infektionen an Bedeutung verloren [17].

1.6 Überlebensstrategie von *Leishmania* im Säugetierstadium

Wie in Kapitel 1.3.2 bereits erwähnt, befinden sich die Parasiten nach dem Biss der Sandmücke zunächst im Gewebe des Säugetiers, wo sie den Zerstörungsmechanismen der Immunabwehr, dem Komplementsystem, des Zwischenwirts ausgeliefert sind [43]. Des weiteren sind die nach einer Phagozytose in die Makrophagen den mikrobioziden Abwehrmechanismen der Makrophagen ausgeliefert. Verschiedene Strategien wurden von den Parasiten entwickelt, die das Überleben in den beiden Lebensräumen sicher stellt. Einige dieser Strategien konnten aufgedeckt werden:
Veränderte Strukturen der Oberflächenmoleküle LPG und GP63 (Metalloprotease) blockieren zum einen die Integration eines lytischen Komplexes des Komplementsystems in ihre Membran und verzögern somit eine Lyse, zum anderen wirken sie inhibierend bzw. inaktivierend auf bestimmte Komponenten der Immunabwehr [26, 44-46]. Nach der Aufnahme in die Phagosomen der Makrophagen verzögert der Parasit die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom ebenfalls über LPG-Moleküle. Diese Verzögerung nutzt der Parasit, um in die Amastigote zur differenzieren, die gegenüber den lysosomalen Enzymen und dem sauren Milieu im Phagolysosomen besser angepasst ist [47-49]. Ein weiterer Abwehrmechanismus der Makrophagen auf Pathogene ist der sog. „*oxidative burst*“, der Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid-Anionen (O_{2^-}), die toxisch wirken. Amastigote setzten auch hier die die LPG-Moleküle ein, die hemmend auf die Proteinkinase C (PKC)-Aktivität der Makrophagen wirkt, welches an der Generierung der zerstörerischen Superoxid-Anionen (O_{2^-}) mitwirkt. Ebenso zeigt das Haupt-Oberflächenmolekül der Amastigoten, das Glykosylinositolphospholipid (GIPL), einen inhibierenden Effekt auf die PKC-Aktivität auf [50]. Weiterhin kann GIPL die Expression von iNOS (induzierbarer Stickstoff-Synthase), die für die Herstellung des für den Parasiten toxische Stickoxid (NO) verantwortlich ist, hemmen [51, 52]. Auch über das sog. Trypanothion-System der Trypanosomatidae, das dem annähernd ubiquitären Gluthation-System entspricht, sind die Parasiten in der Lage dem oxidativen Stress entgegenzuwirken [53-55]. Zudem können LPG-Moleküle und GP63 der *Leishmania* lysosomale Enzyme und Hydrolasen inaktivieren [56]. Weiterhin wird spekuliert, dass der Parasit in der Lage ist, die Wirtszelle über Signalwege bzw. Antigenpräsentationen zu seinen Gunsten zu beeinflusst und damit sein Überleben in Wirtszelle sichert [57].

1.7 Wie eliminiert Antimon die *Leishmania*-Parasiten im Säugetierstadium?

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts berichtete Gaspar Vianna erstmalig über Behandlungserfolge in der Therapie von MCL mit dreiwertigen Sb-Verbindungen, die auch in der Behandlung von VL bestätigt werden konnten. Diese Therapieform wurde aufgrund starker Nebenwirkungen eingestellt, bis in den 40-iger Jahren weniger toxische fünfwertige Sb-Verbindungen eingeführt wurden, die bis heute die Therapeutika der Wahl ist [58].

Trotz der jahrzehntelangen klinischen Anwendung ist der genaue Wirkmechanismus von Antimon bis heute unklar. Um auf die Parasiten zu wirken, muss Sb zunächst über die Wirtszelle aufgenommen werden. Der Transport-Mechanismus ist jedoch nicht geklärt.
Allgemein gilt, dass das weniger toxische Sb(V) die Vorstufe zum toxischen, reduzierten Sb(III) darstellt [59]. Unklar bleibt jedoch der Ort der Reduktion, der in den Makrophagen oder/und in den Parasiten stattfinden kann. Shaked-Mishan *et al.,* 2001 [60] zeigte allerdings, dass Sb-sensitive Amastigote intrazellulär Sb(V) zu Sb(III) reduzieren, während resistente Amastigote eine deutlich herabgesetzte Reduktionsaktivität aufwiesen. Ebenfalls konnte eine, wenn auch geringere, Reduktionsaktivität in der extrazellulären promastigoten Form nachgewiesen werden, was für eine Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) in den Parasiten spricht.
Weiterhin berichten Studien, dass die Reduktion auch über Thiole erfolgen kann, welche sich sowohl im Erreger als auch in den Lysosomen befinden [61, 62]. Des weiteren wird eine enzymatisch gesteuerte Reduktion von Sb(V) zu Sb(III) in *Leishmania* diskutiert. Zwei Enzyme konnten bislang identifiziert werden, die diese Reaktion katalysieren können. Zum einen die Thiol-abhängige Reduktase (TDR1), wobei jedoch kein direkter Bezug zwischen Enzymaktivität und Sb(III)-Sensitivität nachgewiesen wurde [63]. Zum anderen katalysiert die *L. major* As(V) Reduktase (LmACR2) diese Reaktion, wobei eine Überexpression dieses Gens in intrazellulären *L. infantum* zu höheren Sb(V)-Sensitivitäten führte.
Sb(V) und Sb(III) werden nicht auf dem gleichen Weg vom Erreger aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass Sb(III) über das Membranprotein AQP1 (*aquaglyceroporin*) in den *Leishmania*-Parasiten gelangt [64], wohingegen die Aufnahme von Sb(V) in die Erreger ungeklärt bleibt.
Studien deuten darauf hin, dass Sb(III) in das Trypanothion-System der Parasiten eingreift, welches den Redoxstatus der Zelle reguliert und einen Schutz vor oxidativen Stress vermittelt. Sb(III) führt zum einen zur Eliminierung von Gluthation und Trypanothion aus der Zelle, wodurch die Pufferkapazität verringert wird. Zum anderen hemmt Sb(III) die Trypanothion Reduktase (TR), die die Regeneration von Trypanothion aus der Disulfid-Form mit Hilfe von NADPH katalysiert. Zusammengenommen verursachen beide Mechanismen eine schwerwiegende Störung des Trypanothion-Systems in Promastigoten und Amastigoten [65]. In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte anhand von Kristallstrukturanalysen gezeigt werden, dass Sb(III) zusammen mit den Kofaktoren FAD und NADP in der Nähe des aktiven Zentrums der TR bindet [66].

1.8 Resistenzmechanismen

1.8.1 Mögliche Wege zur Ausbildung von therapieresistenten *Leishmaniasen*

Therapieresistente *Leishmania*-Infektionen können sowohl vom Erreger als auch vom infizierten Organismus (Zwischenwirt) ausgehen.

Vielfältige Faktoren des Zwischenwirts können einen negativen Einfluss auf den Behandlungserfolg nehmen. Wie teilweise schon erwähnt sind die Heilungsraten geringer bei z.B. immunsupprimierten Patienten (verursacht z.B. durch HIV-Koinfektionen, Autoimmunerkrankungen oder medikamentös bedingt), schlechten sozio-ökonomischen Verhältnissen (Unterernährung, fehlende medizinische Grundversorgung) oder Koinfektionen mit anderen Pathogenen.

Außerdem kann der Erreger durch die Entwicklung molekularer Resistenzmechanismen den Behandlungserfolg negativ beeinflussen. Die Ursachen für die Entstehung dieser Mechanismen sind vielfältig. Man unterscheidet dabei intrinsische (primär) Resistenzen, die ohne einen vorausgegangenen Kontakt zu den Agenzien (Therapeutika) auftreten, wohingegen bei extrinsischen (sekundär) Resistenzen zunächst sensitive Zellen während der Behandlung resistent werden. Pleiotrophe Resistenzen bezeichnen das Auftreten von Resistenzen gegen eine Vielzahl an strukturell bzw. funktionell unterschiedlichen Agenzien und wird auch *multi drug resistance* (MDR) genannt. Im folgenden werden allgemeine molekulare Mechanismen, die zur Resistenz führen können, vorgestellt:

Transport-Mechanismen: Durch eine Überexpression von Genen, die am aktiven Transport mit Hilfe sog. Efflux-Pumpen beteiligt sind, kann das Agens aus der Zelle befördert werden. Auch können Mutationen in Transportproteinen bzw. Veränderungen in der Membran-Zusammensetzung den Import von Agenzien verhindern oder den Efflux beschleunigen.

Bypass-Mechanismen: Der Effekt eines Agens kann durch Überexpression von Genen umgangen werden, die einen alternativen Stoffwechselweg zu den inaktivierten Mechanismen beschreiten. Es können auch einzelne Proteine überexprimiert werden, die die inhibierten Proteine durch andere, wirkungsgleiche Enzyme ersetzen.

***Target*-Modifikationen**: Eine strukturelle Veränderung des Zielmoleküls (*target*) kann zu verminderten Affinität zum Agens führen.

Inaktivierende Mechanismen: Durch chemische Modifikationen kann das Agens in seiner Struktur verändert und dadurch inaktiviert werden. Ebenso können Interaktionen zwischen Zielmolekülen und Agens durch z.B. Überexpression von konkurrierenden Substanzen beeinträchtigt werden. Auch durch eine Kompartimentierung des Agens kann es unschädlich gemacht werden. Des weiteren kann der Zelltod durch eine Inhibierung der Apoptose-Wege verhindert werden.

Sequestrierung: Durch eine spezifische und stöchiometrische Bindung eines Moleküls an das Agens kann die toxische Wirkung blockiert werden.

Reparatur-Mechanismen: Gesteigerte Aktivitäten der Reparatursysteme der Zelle können die durch das Agens verursachten Schäden beheben und somit der Wirkung des Agens entgegenwirken.

Viele dieser Resistenzmechanismen wurden bereits in parasitischen Protozoen beschrieben [67]. Auch Sb-Resistenzmechanismen beschreiten einige dieser Strategien, wie nachfolgend beschrieben ist.

1.8.2 Bekannte Sb-Resistenzmechanismen in *Leishmania*

Eine Vielzahl von Studien zur Antimon-Resistenz in *Leishmania* erfolgte an Parasiten, die unter Laborbedingungen sukzessive resistent gemacht wurden, um sie dann mit dem Wildtyp zu vergleichen. Im Gegensatz dazu existieren nur wenig Studien, in denen natürliche Resistenzmarker aus Feldisolaten untersucht wurden. Das liegt zum einen an der geringen Verfügbarkeit der resistenten Feldisolate, aber auch an den sehr arbeitsintensiven und nicht immer einfachen Vorarbeiten (Kultivierungsschwierigkeiten, Klonierungen, eindeutige Spezies-Bestimmungen, Sb-Sensitivitäts-Bestimmungen) und auch an den weit weniger stark ausgeprägten Sensitivitäts-Unterschieden der zu vergleichenden Feldisolate.

1.8.2.1 Sb-Resistenzmechanismen in *in vitro*-erzeugten resistenten *Leishmania*

Viele der *in vitro*-generierten, resistenten *Leishmania*-Stämme wurden mit der nicht humanpathogen Spezies *L. tarentolae* durchgeführt, die die Eidechse als natürlichen Zwischenwirt hat. Es wird vermutet, dass die Parasiten dort als Promastigote im Blutgefäßsystem zirkulieren [68]. Oft wurden die Zellen sukzessive gegen dreiwertiges Arsenit (As(III)) resistent gemacht, was ein verwandtes Metall zu Sb(III) ist. Viele dieser As(III)-resistenten Stämme sind ebenfalls Sb(III)-resistent und wurden für Untersuchungen von Sb(III)-Resistenzmarkern herangezogen. Dabei muss bedacht werden, dass *Leishmania* ssp. sich biochemisch stark voneinander unterscheiden können, was sich auch in den unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Agenzien bzw. den verschiedenen Krankheitsformen, die sie auslösen, widerspiegelt.

Transport-Mechanismen:
Ein sehr gut untersuchter Resistenzmechanismus in resistenten *L. tarentolae* Laborstämmen ist die Entgiftung der Zelle über eine Konjugatbildung von Sb(III) mit Trypanothion, wobei das Konjugat über das ABC-Transporter Protein MRPA aus der Zelle geschleust wird. Dabei wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Anstieg von Trypanothion in Sb-resistenten Zellen durch eine Überexpression von Genen vermittelt wird, die an der Synthese von Gluthation und Spermidin, den Vorläufern von Trypanothion, beteiligt sind [69-72]. Das Protein MRPA ist in Membranstrukturen in der Nähe von der Flagellartasche, möglicherweise in Membranen von Vesikeln lokalisiert, die über Exozytose nach außen transportiert werden [73].

Ein zweites ABC-Transporter Protein, das an einem Sb-Resistenzmechanismus beteiligt ist, wurde in *L. major* mit Hilfe der Komplementations-Genetik identifiziert. Dabei führte die Selektion mit Pentamidin zu dem Protein PRP1, das bei Überexpression den Parasiten auch einen Schutz gegen Sb(III) verlieh [74]. Die genaue Lokalisation des Proteins und der Resistenzmechanismus ist jedoch nicht aufgeklärt.

Ein weiterer Resistenzmechanismus wurde mit dem Transporter-Gen *AQP1* in Verbindung gebracht, durch das Sb(III) in die *Leishmania*-Parasiten gelangt [64]. Dabei konnte in *in vitro*-Sb(III) generierten *L. mexicana* gezeigt werden, dass ein verminderter *AQP1*-RNA-Spiegel mit einer verminderten Anhäufung an Sb(III) in der Zelle korreliert [75].

Noch unbestimmte Mechanismen:
Die Hitzeschock-Proteine HSP70 und HSC70 wurden durch Komplementations-Genetik in *L. tarentolae* als Sb-Resistenzmarker identifiziert. Der Resistenzmechanismus, über den die Proteine den Zellen Schutz verleihen, ist bisher nicht geklärt. Überexpression dieser Gene in sensitiven *Leishmania* führte nicht zur Resistenz der Zellen gegen Sb(III), jedoch wiesen diese Zellen eine höhere Überlebensrate, sowohl nach einem Sb(III)-Schock, als auch nach einer Temperatur-erhöhung auf. Aufgrund der vielfältigen zellulären Funktionen der Hitzeschock-Proteine, die auch am Schutz der Zellen vor Stress-Faktoren beteiligt sind, wird spekuliert, dass die identifizierten Proteine den Zellen „Erste Hilfe“ beim Überleben unter den Veränderten Bedingungen leisten, bevor spezifischere und effizientere Mechanismen eingesetzt werden [76].

Ein Leserahmen unbekannter Funktion, ORFSbV, wurde in *in vitro*-generierten Sb(V)-resistenten *L. tarentolae* mit Sb(V)-Resistenz in Verbindung gebracht. Eine Überexpression vermittelt den Zellen Schutz vor Sb(III) und Sb(V). Jedoch liegen keine weiteren Informationen über die Funktion des Gens bzw. über die Resistenzmechanismus vor [68].

Weiterhin wurde ein amplifiziertes extrachromosomales Element, bezeichnet als G-*circle*, in einem *in vitro*-erzeugten Sb-resistenten Stamm der Spezies *L. tropica* identifiziert. Ein Zusammenhang des G-*circle* mit dem Gen *MRPA* und Genen des Thiol-Metabolismus wurde ausgeschlossen [77], jedoch liegen keinen weiteren Untersuchungen bezüglich dieser Region vor.

Ein 299 kDa *L. infantum* Gen (LinJ08_V3.0630) wurden durch *functional cloning* identifiziert, und vermittelt Resistenz gegenüber Miltefosin und Sb(III). Auch hier ist der molekulare Resistenz-mechanismus nicht geklärt [78].

Zusammengenommen zeigen diese Studien, dass *Leishmania* spp. in der Lage ist, *in vitro* vielfältige Resistenzmechanismen auszubilden. Um aber die auftretenden Therapieresistenzen einzudämmen ist es vor allem wichtig, die natürlichen Resistenzmechanismen zu kennen, die sich möglicherweise von den *in vitro*-Resistenzmechanismen unterscheiden.

1.8.2.2 Sb-Resistenzmechanismen von *Leishmania*-Feldisolaten

Im Gegensatz zu den *in vitro*-erzeugten Resistenzen von *Leishmania* spp. ist wenig über die *in vivo*-Resistenzmechanismen bekannt, da erst seit kurzem vermehrt in diesem Bereich geforscht wird. Besonders deutlich ist dieser Informations-Mangel seit in bestimmten Regionen von Indien bis zu 65 % Therapieversagen bei Behandlungen der VL mit Sb-Präparaten auftreten [18].
Einer der häufigsten Erreger der südamerikanischen Leishmaniasen, *L. braziliensis*, wird allgemein als sensitiv gegenüber Sb-Behandlungen eingestuft [17, 79]. Jedoch wurden in Kolumbien bis zu

20 % Sb-Therapieversagen beobachtet [80], was auch hier ein Anzeichen für ein vermehrtes Auftreten von Therapie-Reisistenzen darstellt.
Es ist mit Hilfe gängiger phylogenetischer Marker, wie z.B. Mikrosateliten-DNA oder SNPs (*Single Nucleotid Polymorphism*), oftmals nicht möglich, resistente und nichtresistente Erreger-Isolate voneinander zu unterscheiden. Folglich liegt die Ursache dieser Mechanismen oft an subtaxonomischen genetischen Unterschieden. Folgendes ist dabei bereits über natürliche Resistenzmechanismen bekannt:

Transport-Mechanismen:
Die bei *in vitro*-erzeugten resistenten Parasiten beschriebene Entgiftung der Zelle durch Trypanothion-Sb(III)-Konjugate, gehen mit den Genamplifikationen von *MRPA*, *GSH1* (γ-Glutamylcysteinsynthetase) und *ODC* (Ornithindecarboxylase) einher. Diese Amplifikationen konnten fast nie in resistenten Feldisolaten wiedergefunden werden. Eine Studie mit vier resistenten *L. donovani*-Feldisolaten wies in drei Fällen eine Amplifikation des *MRPA*-Gens nach, jedoch wurde in nur einem der Isolate eine Ko-Amplifikation von *GSH1* festgestellt und in keinem dieser Isolate wurde eine erhöhte intrazelluläre Trypanothion-Konzentration nachgewiesen [81]. Zudem konnten in Untersuchungen an fünf Sb-resistenten *L. braziliensis*- und *L. guyanensis* Feldisolaten keine Amplifikation des *MRPA*-Gens gezeigt werden [82]. In Proteom-Analysen konnte ebenfalls keine unterschiedliche Expression von *MRPA* oder *GSH1* festgestellt werden [83]. Das lässt vermuten, dass der *in vitro* gut beschriebene Resistenzmechanismus im Feld eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Dagegen konnten in Sb(V)-resistenten *L. donovani* Feldisolaten eine verminderte Expression des Sb(III)-Transporter-Gens *AQP1* nachgewiesen werden [84], wie es auch für Sb(III)-resistente Laborstämme beschrieben wurde. Daher kann vermutet werden, dass die intrazellulären amastigoten Zellen eine natürliche Sb-Resistenz durch eine verminderte Aufnahme von Sb(III) aus dem Makrophagen erlangen. Die verminderte Expression von *AQP1* wurde in einer weiteren Studie an *L. donovani*-Feldisolaten in 7 von 9 untersuchten Sb-resistenten Isolaten bestätigt [85].

Thiol-Metabolismus:
Interessanterweise zeigten einige Sb(V)-resistente *L. donovani* Feldisolate sogar verringerte *GSH1* und *ODC* Expression. Zudem konnte keine Überexpression von *MRPA* in den klinischen Isolaten nachgewiesen werden. Die daraus resultierenden Unterschiede zwischen den Sb-resistenten Laborstämmen und resistenten Feldisolaten, implizieren, dass das Thiol-System zwei verschiedene Aufgaben erfüllen kann. Während in den resistenten Laborstämmen ein intrazellulärer Anstieg von Trypanothion die Entgiftung der Zelle von Sb(III) fördert, könnten die in resistenten Feldisotaten reduzierte intrazelluläre Thiol-Konzentrationen die Reduktion von Sb(V) zum toxischen Sb(III) verhindern, wodurch den Amastigoten Schutz verliehen würde [84].

Manipulation der Wirtszelle durch den Erreger:
Untersuchungen eines resistenten *L. donovani* Feldisolats zeigten, dass das Isolat in der Lage war, die Expression der γ-GCS (γ-Glutamylcysteinsynthetase) der Wirtszelle herabzuregulieren.

Das kann eine verminderte Konzentration des wirtseigenen Glutathions verursachen, was eine verminderte Reduktion vom Sb(V) zum toxischen Sb(III) durch den Wirt zur Folge hätte [86].

In einer neueren Studie konnte ebenfalls eine Manipulation der Wirtszelle durch resistente *L. donovani* Feldisolate nachgewiesen werden, wobei die infizierten Makrophagen eine Überexpression von MRP1 und P-gp (P-Glykoprotien) aufwiesen. Der dadurch vermittelte Efflux von Sb aus der Wirtszelle schützt somit die intrazellulären Parasiten [87].

Inaktivierende Mechanismen:
Ein Sb-resistentes *L. donovani* Feldisolats wies in Proteom-Analysen eine Überexpression von HSP90, auch HSP83 genannt, auf. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HSP90 tatsächlich die Sb-Resistenz steigert und den wirkstoffvermittelten programmierten Zelltod, der durch eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials eingeleitet wird, reduziert [83].

Noch unbestimmte Mechanismen:
In einer weiteren Studie wurden in zwei von acht untersuchten Sb-resistenten *L. donovani*-Feldisolaten ein auf Chromosom 9 lokalisiertes Gen identifiziert, das in den resistenten Parasiten amplifiziert war. Eine Transfektion dieses Gens verlieh den Parasiten Antimon-Resistenz. Der Wirkmechanismus konnte bisher nicht geklärt werden [88].

In einer Kombination beider Strategien wurde ein resistentes Feldisolat einer weiteren *in vitro* Selektion unterzogen. Nachfolgende Analysen zeigten Amplifikationen der Gene für die Histone *H1*, *H2A* und *H4*, und eine Proteinkinase (MAPK1), sowie zweier hypothetischer Gene (LinJ35_V3.3990 und LinJ04_V3.0630). Eine Transfektion des H2A Gens in sensitive *L. donovani*-Parasiten führte zu einer Steigerung der Antimon-Resistenz. Für keines der identifizierten Proteine ist der Wirkmechanismus zum jetzigen Zeitpunkt geklärt [89].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse deuten an, dass natürliche Resistenzen auf sehr vielfältigen Wegen vom Erreger erzeugt werden können und dass die Feldisolate erheblich mehr Varianzen aufweisen, als in den bislang untersuchten resistenten Laborstämmen gefunden wurden. Das deutet auch darauf hin, dass wahrscheinlich noch weitere, bisher unentdeckte Resistenzmechanismen existieren, über die der Parasit sein Überleben unter therapeutischem Druck sichert.

1.9 Prinzip der Funktionellen Komplementation

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Strategie der Funktionellen Komplementation (auch Genetische Komplementation, Komplementations-Genetik oder *functional cloning* genannt) verwendet. Diese leistungsstarke Methode macht es möglich, das komplette Genom eines Organismus in relativ kurzer Zeit unvoreingenommen nach Determinanten für verschiedenste Merkmale zu durchsuchen. In *Leishmania* wurde diese Methode schon mehrfach für die Identifizierung und Funktionsanalyse von unbekannten Genen mit Erfolg eingesetzt [90]. Das Genom einer Population bzw. Mutanten, die einen charakteristischen Phänotyp aufweisen (Donor-Stämme), werden dabei zur

Herstellung von Cosmidbanken genomischer DNA (gDNA) verwendet. Diese Cosmidbank-DNA wird dann in *Leishmania* Akzeptor-Stämme (meist ohne den charakteristischen Phänotyp) transfiziert. Durch nachfolgende Selektion der rekombinanten Population auf den gewünschten Phänotyp hin, gefolgt von einer Analyse der selektierten Cosmide aus den überlebenden Populationen, können beteiligte Gene identifiziert werden. Diese Strategie kann sowohl auf dominante (positive Selektion) als auch auf rezessive Merkmale (negative Selektion) hin erfolgen. Im Zuge der negativen Selektion muss jedoch vor Beginn der Selektion zunächst eine Klonierung stattfinden. Von diesen Klonen werden sog. Replika-Klone erzeugt, auf die nach der Selektion zurückgegriffen wird. Im Verlauf der Selektion gehen genau die Zellen zugrunde, die die gesuchten Gene tragen. Durch die Replika-Klone ist man in der Lage, die „negativ" selektierten Klone zu analysieren. In Abbildung 1.2 sind die beschriebenen Selektions-Strategien schematisch dargestellt. In dieser Arbeit wurde die positive Strategie verwendet.

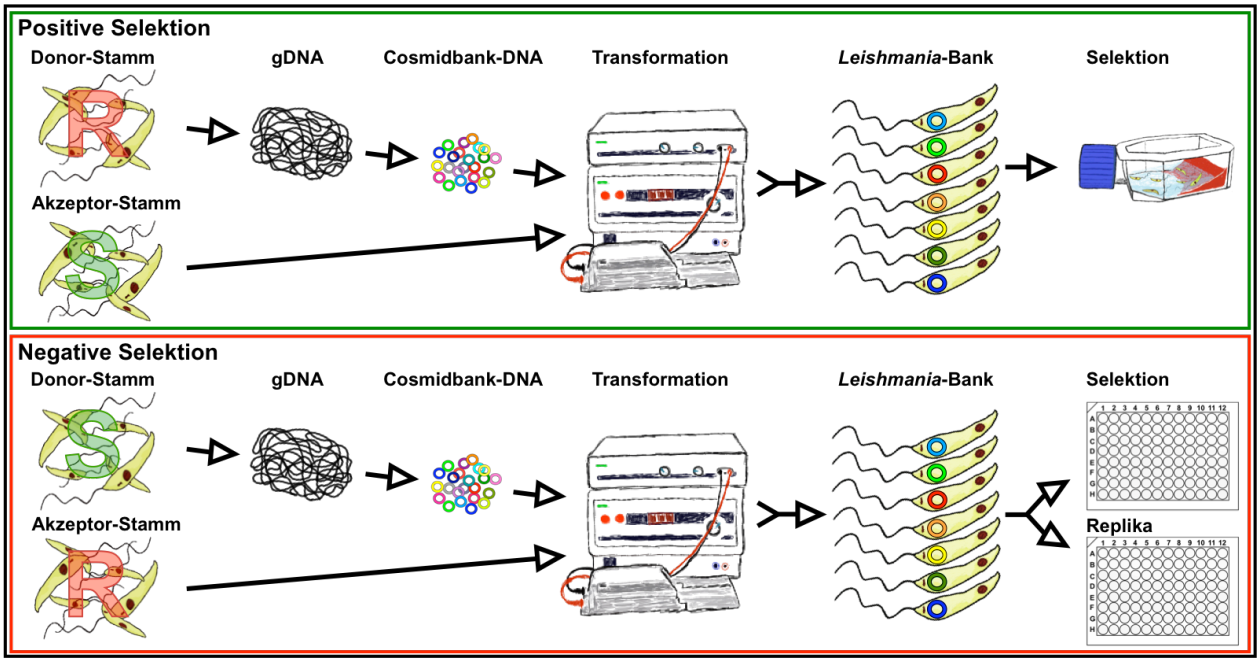

Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Prinzips der Funktionellen Komplementation als Negative und Positive Selektion. Aus dem Donor-Stamm (wobei R bzw. S für einen resistenten bzw. sensitiven Phänotyp steht) wird die genomische DNA (gDNA) isoliert, um daraus eine Cosmidbank-DNA herzustellen. Diese Cosmidbank-DNA wird in den Akzeptor-Stamm transfiziert. Die rekombinante *Leishmania*-Bank kann dann auf den gewünschten Phänotyp hin selektiert werden. Im Zuge der negativen Selektion muss bei der Selektion der *Leishmania*-Bank mit Replika-Klonen gearbeitet werden, um nach der Selektion die Cosmide der zugrundegegangenen Klone analysieren zu können.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der weltweiten Zunahme von Resistenzen gegenüber Standard-Therapeutika zur Behandlung der Leishmaniasis besteht ein erheblicher Wissensmangel bezüglich der Mechanismen, über die die Erreger im natürlichen Umfeld Resistenz erlangen. Auch die fortschreitenden Behandlungsresistenzen des Erregers *L. braziliensis*, der die besonders schwere Erkrankung MCL auslösen kann, steht wenig Wissen gegenüber, wie der Parasit zunehmend sein Überleben unter therapeutischem Druck sicher stellt. Daher ist es dringend erforderlich, diese Resistenzmechanismen zu erforschen.
Solche identifizierten molekularen Resistenzmechanismen bzw. molekularen Marker, die eine Relevanz für die natürlichen Resistenzmechanismen der Erreger haben, können vielseitig verwendet werden. Zum einen können sie eine optimierte Behandlung gewährleisten, was in Anbetracht schweren Nebenwirkungen der zum Einsatz kommenden Medikamente von großer Bedeutung ist. Zum anderen können durch Kenntnis der Resistenzmechanismen effektivere Medikamente entwickelt werden. Zudem können sie eine Hilfe bei der epidemiologischen Erfassung von Medikamenten-Resistenz sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Funktionelle Genetiesche Komplementation aus einem resistenten *L. braziliensis* Feldisolat Gene identifiziert werden, die den Erregern Sb-Resistenz verleihen. Zunächst sollte festgestellt werden, ob das in anderen Leishmania-Spezies erfolgreich angewendete *functional cloning* auch in *L. braziliensis* Erfolg hat. Die *insert*-DNA der durch *in vitro* Selektion identifizierten Cosmide sollten dann durch gezielte Deletionen soweit eingegrenzt werden, dass das oder die Sb-Resistenz-vermittelnde(n) Gen(e) in weiteren Selektionsschritten identifiziert werden konnten. Nach erfolgreicher Identifizierung sollte die resistenzvermittelnde Eigenschaft des Gens verifiziert werden, und Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen gesammelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Biomate 3 *Spectrophotometer*	Waltham, USA
Biometra UV Band-Elutor	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank, Modell: 3324009903100	WTC Binder, Tuttlingen, D
Brutschrank, Heraeus B 6060	Heraeus, Hannover, D
CASY® *Cell Counter & Analyser System*	Roche Innovartis AG, Bielefeld, D
Electrophoresis Power Supply-EPS301	Amersham, Buckinghamshire, UK
Eppendorf *Centrifuge* 5415 D	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf *Centrifuge* 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf *Centrifuge* 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf *Mastercycler gradient*	Eppendorf, Hamburg, D
GenePulser™	BioRad, München, D
Innova™ 4400 *incubator shaker*	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Invertoskop ID03	Zeiss, Oberkochen, D
Mikroskop, Axioskop	Zeiss, Oberkochen, D
J2-21 Zentrifuge	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
J2-HS Zentrifuge	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
M12 Lauda *Bath Circulator*	Lauda, Lauda-Königshofen, D
MicroPulser™	BioRad, München, D
MS2 *Minishaker*	IKA ® Works, Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammer, 0,02 mm Tief	Assistent, Sondheim, D
Owl A5 *Large Gel System*	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen, D
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments®, Woonsocket, USA
Qubit® Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Heraeus, Hannover, D
Standard PowerPack P25	Biometra, Göttingen, D
SwitchBack™ Pulse Controller PC500	Hoefer, San Francisco, USA
TrayCell - Faseroptische Ultra-Mikro-Messzelle	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, D
Vortexer VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

2.1.2 Chemikalien und Lösemittel

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
6-Biopterin	Fluka, Buchs, CH
Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar	Fluka, Buchs, CH
Agarose	Biozym, Hess. Oldenburg, D
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, D
ATP (Adenosintriphosphat)	Boehringer, Mannheim, D
Bacto-Tryptose	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, D
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt, D
Borsäure	Serva, Heidelberg, D
BSA 100 x	New England Biolabs, Ipswich, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Difco™ Tryptose Broth	BD, Sparks, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Risch, CH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, D
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg, D
Formamid	Merck, Darmstadt, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Hyclone Perbio, Bonn, D
Geneticindisulfat (G418)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gentamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Haemin	Serva, Heidelberg, D
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, D
LB-Agar und LB-*Broth*	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Phenylalanin	Merck, Darmstadt, D
M199-Medium, 10-fach	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Maltose	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat	Serva, Heidelberg, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumbicarbonat	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
NEB-Puffer 1, 2, 3, 4	New England Biolabs, Ipswich, USA
Phenol/Chroloform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol GmbH, Hamburg, D
Phenol/Tris-gesättigt	Biomol GmbH, Hamburg, D
Potassium antimonyl tartrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCL) 32 %	Merck, Darmstadt, D
Schneider‘s *Insect Medium*	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Xylenxyanol	Merck, Darmstadt, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kryoröhrchen	Nalgene, Neerijse, B
Elektroporationsküvetten, 0,1 cm & 0,4 cm	BioRad, München, D
Faltenfilter	Schleich & Schüll, Dassel, D
Parafilm® M	Americam Can Company, Jersey City, USA
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim, D
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen 12,5 cm^2	Nalge Nunc International, New York, USA
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

2.1.4 *Kits*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Easy Pure DNA *Purification*	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Gigapack® III Gold Packing Extract	Stratagene, La Jollo, USA
NucleoBond® Xtra Maxi	Machery-Nagel GmbH & CoKG, Düren, D
NucleoSpin® *Extract* II	Machery-Nagel GmbH & CoKG, Düren, D
PhasePrep™ BAC DNA Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Quanti Tec Reverse Transcription	Qiagen, Hilden D
RealMasterMix Kit	Eppendorf, Hamburg, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, Madison, USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

2.1.5 DNA-Längenstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneRuler™ 1 kb DNA *Ladder*	Fermentas, Vilnius, LT
GeneRuler™ 100bp DNA *Ladder*	Fermentas, Vilnius, LT
Lambda DNA *Hind*III *Ladder*	Fermentas, Vilnius, LT

2.1.6 Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Klenow Polymerase (10 U/µl)	Fermentas, Vilnius, LT
RNase A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
T4-DNA-Ligase (400 U/µl)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Endonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.7 DNA-Oligonukleotide (*primer*)

Bezeichnung	5‘-3‘ Sequenz	Verwendungszweck
pr-CH-2	CCGTGTGATATCAGATGCCC	Bestimmung der Cosmid *insert*-DNA
pr-M13-R	GGAAACAGCTATGACCATG	Bestimmung der Cosmid *insert*-DNA
Lb-Actin-F	CGGCTTCCCAGAGATGGTGTATCAG	*real-time* RT-PCR
Lb-Actin-R	CGCCAGACAGGACAATGTTGCC	*real-time* RT-PCR
Li-Actin-F	TGGCACCATACCTTCTACAACGAG	*real-time* RT-PCR
Li-Actin-R	CGTCATCTTCTCACGGTTCTGC	*real-time* RT-PCR
Lb-210-F	TGATGATGAAGGTGACCGTGACG	*real-time* RT-PCR

Bezeichnung	5‘-3‘ Sequenz	Verwendungszweck
Lb-210-R	AAGGAGGGTGTAGACGACGCTCTC	*real-time* RT-PCR
F-PrW-1_Unb-1-C1-6	GGGGTGATACTTGAAAACAAAC	*Primer Walking*
R-PrW-1_Unb-1-C1-6	GGGCGTAGAAGTCCTTTTCG	*Primer Walking*
F-PrW-2_Unb-1-C1-6	GCCGCGCTCTCACCACGCAG	*Primer Walking*
R-PrW-2_Unb-1-C1-6	CACATCGAACGGACCAGTG	*Primer Walking*
F-PrW-3_Unb-1-C1-6	GGGTGCAGCTGGCGGCATTG	*Primer Walking*
F-PrW-4_Unb-1-C1-6	ACGCCTACGAGCAGCAGTTG	*Primer Walking*
F-PrW-6_Unb-1-C1-6	GCCTGCCCAGCGGCGGAATC	*Primer Walking*
F-PrW-7_Unb-1-C1-6	CTATATCGTTGCCTCATGGTG	*Primer Walking*
R-PrW-7_Unb-1-C1-6	GAATGTACAGCACATCGAAC	*Primer Walking*
F-PrW-8_Unb-1-C1-6	CTGGATGACCTGTTCGCCGAG	*Primer Walking*
R-PrW-8_Unb-1-C1-6	GTTAAACTGCTCCGCCGCTAC	*Primer Walking*
F-PrW-9_Unb-1-C1-6	GTGCGACCCAAGACGCTCAC	*Primer Walking*
R-PrW-9_Unb-1-C1-6	GTATCGTCACTTCGAGCGGCCTC	*Primer Walking*
F-Prw-10_Unb-1-C1-6	CCCTCGCACTTCCCCTACTTC	*Primer Walking*
R-PrW-10_Unb-1-C1-6	CTGCCAGTGGTTGAGACGGTG	*Primer Walking*
F-PrW-11_Unb-1-C1-6	GAAACGTCCCAGTAGCTCGTG	*Primer Walking*
R-PrW-11_Unb-1-C1-6	CTTTCTCTTTGGGGTGGGCAATG	*Primer Walking*
F-PrW-1_Unb-2-C1-6	GGGGATGAATAGGCGCGG	*Primer Walking*
R-PrW-1_Unb-2-C1-6	GGGGCACGTTGCGACCTAGTC	*Primer Walking*
F-PrW-2_Unb-2-C1-6	CTCCATGGCGGTTCTCGAC	*Primer Walking*
R-PrW-2_Unb-2-C1-6	GCGCACTCGCAGCAGCTAC	*Primer Walking*
F-PrW-3_Unb-2-C1-6	GCATCTCTGTGCACGTCTAG	*Primer Walking*
R-PrW-3_Unb-2-C1-6	GGGTAGACCACAAGAGGCTC	*Primer Walking*

2.1.8 Cosmid-Vektor pcosTL

Der Cosmid-Vektor pcosTL wurde zur Herstellung der genomischen Cosmidbank pcosPER104 verwendet und wurde von J.M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London) zur Verfügung gestellt [91]. Es handelt sich um einen sog. *cosmid shuttle vector*, einer Größe von 8500 bp. Er wurde für die Einbringung großer DNA-Fragmente in *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania donovani* konstruiert. Durch das β-Laktamase-Gen vermittelt der Vektor den Bakterien Ampicillin-Resistenz. Das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das von den 5‘- und 3‘-untranslatierten Bereichen des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus Trypanosoma cruzi flankiert wird, ermöglicht die Selektion auf rekombinante *Leishmania* durch G418 (Geneticindisulfat). Die zwei cos-*sites* ermöglichen die Verpackung des linearisierten Vektors in Phagenpartikel. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors pcosTL.

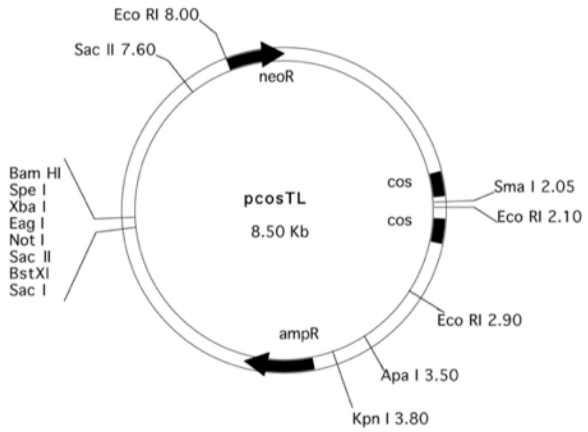

Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Vektorkarte von pcosTL. Die Vektorkarte von pcosTL ist schematisch dargestellt. Die Neomycin- und Ampicillin-Resistenzgene (neoR und ampR) sind mit schwarzen Pfeilen angedeutet. Die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Apa*I, *Bam*HI, *BstX*I, *Eag*I, *EcoR*I, *Kpn*I, *Not*I, *Sac*I, *Sac*II, *Sma*I, *Spe*I und *Xba*I sind mit Angabe der Positionen in der Vektorsequenz gekennzeichnet. Entnommen und modifiziert nach Kelly *et al.*, 1994 [91].

2.1.9 Nährmedien

Für *Leishmania*

Biphasisches Medium

1. Tobie‘s Blutagar; pH 7,6 [135]

für 1000 ml:	15 g Bacto-Tryptose
	4 g NaCl
	5 g Na_3PO_4 x 12 H_2O
	0,4 g KCl
	15 g Bacto-Agar

Nach dem Autoklavieren wurden 20 % defibriniertes Kaninchenblut (Herzpunktur) zugegeben.

2. Locke‘s Lösung; pH 7,4 (Überstand für Tobie‘s Blutagar, Prof. Dujardin, privat)

für 1000 ml:	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	0,3 g KH_2PO_4
	0,1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
	1 g $NaHCO_3$
	2,5 g Glucose
	2 ml L-Glutamin-Penicilline-Streptomycin

Schneider‘s *Insect Medium*, modifiziert, (S10/2); pH 6,0

für 1000 ml:	1 Flasche Schneider‘s *Insect Medium*, (für 1 l)
	10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, 30 min bei 56 °C)
	2 % humaner Urin (männlich)
	400 mg $NaHCO_3$
	790 mg Calciumchlorid-Dihydrat
	25 mg Gentamycin

M199-Medium, modifiziert, (mod. M199); pH 7,0

1 x M199-Medium
20 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (30 min bei 56 °C)
0,035 % Natriumhydrogencarbonat
40 mM HEPES (pH 7,4)
10 µg/ml Haem
100 µM Adenin
1,2 µg/ml 6-Biopterin
2 mM L-Glutamin

Für Bakterien

LB (Luria Bertani) Medium	2 % LB-*Broth*
LB (Luria Bertani) Agarplatten	3,5 % LB-Agar

2.1.10 Bakterienstamm

Stamm	**Herkunft**
Escherichia coli XL1-Blue (*E. coli* XL1-Blue)	Stratagene, Amsterdam, NL

2.1.11 *Leishmania*-Stämme

Tabelle 2.1 listet alle in dieser Arbeit verwendeten *Leishmania*-Stämme mit der Angabe der Herkunft und weiteren Informationen auf.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten *Leishmania*-Parasiten

Subgenus	Komplex	Spezies	Stamm	Name	Klon	Sb(III)$^{R/S}$	Sb(V)$^{R/S}$	Bem
Viannia	*L. braziliensis*	*L. braziliensis*	MHOM/PE/01/LH2162	PER002	-	S	R	a
Viannia	*L. braziliensis*	*L. braziliensis*	MHOM/PE/01/LH2162	PER002K7	7	S	R	b
Viannia	*L. braziliensis*	*L. braziliensis*	MHOM/PE/01/LH2162	PER002K11	11	S	R	b
Viannia	*L. braziliensis*	*L. braziliensis*	MHOM/PE/02/LH2382	PER104	-	R	R	a
Viannia	*L. braziliensis*	*L. peruviana*	----/--/--/LC2434	LC2434K5	5	k.A.	k.A.	c
Leishmania	*L. donovani*	*L. infantum*	MHOM/FR/91/LEM2259	MON-1K3511	3511	k.A.	k.A.	d

Legende:

L. = *Leishmania* Bem = Bemerkungen S = Sensitiv gegen Sb(III) bzw. Sb(V)
k.A. = keine Angaben R = Sensitiv gegen Sb(III) bzw. Sb(V)

a = Parasiten-Gewinnung und Bestimmung der Gattung erfolgten im Labor von Prof. Jorge Arevalo (Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Lima, Peru). Die Sb-Sensitivität wurde aus Yardley *et al.*, 2006 [19] entnommen. Der Stamm wurde uns von Prof. Jean-Claude Dujardin (Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerpen, Belgien) zur Verfügung gestellt.

b = Historie entspricht a. Der jeweilige Klon wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dujardin hergestellt.

c = Ein Patienten-Isolat, dass uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Lenea Campino (Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Lissabon, Portugal) zur Verfügung gestellt wurde.

d = Patienten-Isolat aus dem Knochenmark (*Leishmania*/HIV-Koinfizierter Patienten). Annie Sulahian (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Louis, U.F.R. Lariboisière, Université Paris VII, Paris, Frankreich) hat uns den Stamm zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer	85 % Formamid 1 mM EDTA (pH 8,0) 1 mg/ml Bromphenolblau 1 mg/ml Xylenxyanol
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TE/RNase-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
PBS (pH 7,0)	2,68 mM KCl 1,47 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 8,1 mM Na_2HPO_4

Lösungen für Cosmidpräparationen

Lösung 1	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Lösung 2	0,2 N NaOH 1 % SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure

2.1.13 Verwendete Programme und Datenbanken

Name des Programms	**Beschreibung**
ArtRage 2 Wacom	Schemazeichnungen
EnzymeX 3	Informationen zu Endonukleasen
Pages‘09 Version 4.0.3	Textverarbeitung
Photoshop Version 7,0	Bildbearbeitung
Intaglio™ Version 3.0.1	Schemazeichnungen, Auswertungen
MacVector Version 10.5.1	Schemazeichnungen, Sequenzanalysen
GeneDB @ 2009 (www.genedb.org)	*Leishmania*-Genomprojekt
TriTrypDB Version 2 (www.tritrypdb.org)	*Leishmania*-Genomprojekt

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von promastigoten *Leishmania*

Die Kultivierung der *Leishmania*-Parasiten fand in der promastigoten Form in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 25 °C statt. Die Frequenz der Verdünnungen (Passagen) stellte die logarithmische Wachstumsphase der Zellen sicher und fand entsprechend des Wachstumsverhaltens zwei bis vier Mal pro Woche statt. Die Bestimmungen der Zelldichten erfolgte bei Kulturen auf biphasischem Medium mit der Neubauer Zählkammer, die immer als Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Zelldichten der anderen *Leishmania*-Kulturen wurden mit dem CASY® *Cellcounter & Analyzer* ermittelt, wobei die Zellen in einer Elektolyt-Lösung (CASYton®-Lösung) verdünnt (1:1000) wurden. Die Bestimmung der Zelldichten durch das Gerät erfolgte, indem die hergestellte Verdünnung durch eine Kapillare gesaugt wurde, wobei die Zellen anhand des von ihnen verursachten veränderten Widerstands registriert wurden. Zusammen mit den Angaben des durchlaufenen Volumens wurden die Zelldichten berechnet. Auch hier wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von *L. braziliensis* auf biphasischem Medium

Die aus Antwerpen erhaltenen *L. braziliensis* wurden zunächst auf biphasischem Medium kultiviert. Dabei wurde jeweils Eindrittel Tobie‘s-Blutagar zu Zweidrittel Locke‘s-Lösung (2.1.9) eingesetzt.

2.2.1.2 Kultivierung von *L. braziliensis* in S10/2 (mod. Schneider‘s *Insect Medium)*

Zunächst wurden *L. braziliensis*-Parasiten, die auf biphasischem Medium wuchsen, an modifiziertes Schneider‘s *Insect Medium* (S10/2, 2.1.9) adaptiert. Das geschah durch eine schrittweise Erhöhung des S10/2-Anteils in der flüssigen Phase des biphasischen Mediums (Locke‘s Lösung), bis hin zum kompletten Austausch von Locke‘s Lösung durch S10/2. Dieser Prozess fand innerhalb von drei bis vier Passagen statt. Daraufhin wurden die Parasiten in Zellkulturflaschen ohne Tobie‘s Blutagar überführt. Nach drei weiteren Passagen in S10/2 wurden die Zellen entweder in die Versuche eingesetzt oder zur Langzeitlagerung eingefroren (2.2.2).

2.2.1.3 Kultivierung von *L. braziliensis* in S10/- (mod. Schneider‘s *Insect Medium)*

In Selektion Nr. 5 (S5) wurden die Zellen in einer zweiten Variante von mod. Schneider‘s *Insect Medium* kultiviert. Dabei wurde die gleiche Zubereitung wie bei S10/2 (2.1.9) verwendet, jedoch ohne die Zugabe von Urin.

2.2.1.4 Kultivierung von *L. peruviana* in S10/2 (mod. Schneider‘s *Insect Medium)*

Der verwendete *L. peruviana*-Klon LC2434K5 wurde bereits in Lissabon an das Medium S10/2 adaptiert. Es erfolgte daher eine Weiterführung der Kultur in S10/2 (2.1.9).

2.2.1.5 Kultivierung von *L. infantum* in mod. M199 (modifiziertes M199-Medium)

L. infantum MON-1K3511 wurde in mod. M199 (2.1.9) kultiviert.

2.2.2 Einfrieren von *Leishmania*-Stammkulturen

Zur Langzeitkonservierung von *Leishmania* wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert (10 min, 1 260 x g, 4 °C), in kaltem Kulturmedium resuspendiert und mit einem Volumen kaltem Einfriermedium (50 % mod. M199; 30 % inaktiviertes FCS; 20 % DMSO) vermengt, so dass eine Zelldichte von 1 bis 2 x 10^8 Zellen/ml vorlag. Davon wurde je 1 ml in beschriftete und vorgekühlte Kryoröhrchen aliqotiert. Anschließend folgte eine kontrollierte Abkühlung der Zellen, vermittelt durch eine Abschirmung der Kryoröhrchen durch Styropor, auf -70 °C. Nach 2 bis 22 Stunden erfolgte die Überführung in den Kryotank.

2.2.3 Transfektion von DNA durch Elektroporation (Standard-Elektroporation)

Bei den hier durchgeführten Transfektionen handelte es sich um das Einbringen von zirkulärer DNA in *Leishmania*, die in der Folge episomal im Organismus vorlag. Mit der Methode der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen Spannungspuls kurzzeitig permeabel, so dass die DNA in die Zelle gelangen kann. Die Elektroporationen in *Leishmania* wurde nach Kapler [92] durchgeführt. Dazu wurden Promastigote aus der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert (10 min, 1 260 x g, 4 °C), zwei mal mit kaltem PBS (pH 7,0) und einmal mit kaltem Elektroporationspuffer (21 mM HEPES (pH 7,5); 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na_2HPO_4; 6 mM Glukose) gewaschen. Die Zellen wurden in Elektroporationspuffer aufgenommen, so dass eine Zelldichte von 1 x 10^8 Zellen/ml vorlagt. Jeweils 400 µl dieser Suspension wurden zusammen mit 50 µg der zu transfizierenden DNA in kalte Elektroporationsküvetten (0,4 cm) gegeben. Mit dem *GenePulser*™ erfolgte die Elektroporation durch drei Stromstöße, die eine Stromstärke und Kapazität von 1,5 kV bzw. µF und einen Widerstand von 200 Ohm aufwiesen. Die Zeitkonstante lag zwischen 0,6 und 1,1 ms. Zur Regeneration wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden sie in 10 ml Kulturmedium mit dem Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin transferiert. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 25 °C wurde, zur Selektion rekombinanter Zellen, dem Medium das Antibiotika G418 in folgender Konzentration zugegeben: Bei Kulturen auf biphasischem Medium: 12 µg/ml G418; bei Kulturen in S10/2 bzw. mod. M199-Medium: 50 µg/ml G418. Die Selektion auf rekombinante Zellen war abgeschlossen, sobald die Zellen der Negativ-Kontrolle (Transfektion ohne DNA) tot waren. Die rekombinanten Zellen wurden entweder direkt in die Versuche eingesetzt oder zur Langzeitlagerung eingefroren (2.2.2).

2.2.4 Sb(III)-Selektion

Für die Selektion von Sb(III)-resistenten *L. braziliensis*- bzw. *L. peruviana*-Promastigoten wurden die jeweiligen rekombinanten Transfektanden in der angegebenen Zelldichte im entsprechenden Kulturmedium eingesät und kultiviert. Mit der Ausnahme von Selektion Nr. 1 (S1) wurde der Kultur das Antibiotika G418 zugegeben (Konzentration siehe 2.2.3). Die jeweilige Sb(III)-Zugabe erfolgte durch Potassium antimonyl tartrate, das unmittelbar vor jeder Zugabe als Lösung (10 mM) mit dem entsprechenden Kulturmedium hergestellt wurde, woraus die gewünschten Endkonzentrationen in den Kulturen hergestellt wurden. Als Kontroll-Population wurden Zellen des gleichen Stamms, die den leeren Vektor (pcosTL) trugen, unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Zellzahlen bzw. Zelldichten wurden regelmäßig bestimmt (2.2.1) und die Zellen wurden mikroskopisch überwacht.

Sobald die Zellen in die späte logarithmische Wachstumsphase eintraten, fand ein simultaner Mediumwechsel mit bzw. ohne simultaner Verdünnung der Zellen (Selektion und Kontrolle) statt. Nachdem sich ein deutlicher Wachstumsvorteil der rekombinanten Zellen gegenüber der Kontrolle abzeichnete, wurde die Cosmid-DNA aus den überlebenden Populationen isoliert (2.2.7.2).

2.2.5 *Limiting dilution*-Analyse

Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgte durch die *Limiting diliution*-Analyse. Dabei wurde die Methode mit dem Stamm PER002K7 auf biphasischem Medium und mit dem Stamm LC2434K5 im Medium S10/2 durchgeführt. Beide Analysen liefen vom Prinzip gleich ab, unterschieden sich jedoch in den pipettierten Volumina:
Für die Analyse auf biphasischem Medium wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen vorbereitet, indem jede Vertiefung zunächst 50 µl Tobie‘s-Blutagar (schräg, etwa 45°) erhielt. Daraufhin erhielt jede Vertiefung 100 µl Locke‘s Lösung mit G418 (12 µg/ml). Alle Zellen einer 24 Stunden alten Kultur einer Standard-Elektroporation, wurden sedimentiert (10 min, 1 260 x g, 4 °C), in 1 ml Locke‘s Lösung mit G418 (12 µg/ml) aufgenommen und gründlich resuspendiert. In den Vertiefungen der ersten Reihe der Mikrotiterplatte wurden je 50 µl der Zellsuspension pipettiert. Aus diesen Vertiefungen wurden dann je 75 µl entnommen und in die angrenzenden Vertiefungen der zweiten Reihe überführt. Durch eine Wiederholung dieser Arbeitsschritte wurde eine serielle Verdünnung auf der Mikrotiterplatte hergestellt. Nach einer Inkubation im Brutschrank bei 25 °C über zwei bis drei Wochen, wurde die Verdünnungsstufe ermittelt, bei der nur eine erfolgreich transfizierte Zelle vorlagt (die Reihe, bei der 50% Zellwachstum festgestellt werden konnte). Mit dem Wissen, dass in dieser Verdünnungsstufe eine Transfektande vorliegt, kann die Anzahl der Transfektanden in der Ausgangslösung, also pro Standard-Elektroporation, errechnet werden.
Analog dazu wurde die Analyse mit Zellen in mod. Schneider‘s Medium (S10/2) durchgeführt, mit den folgenden Unterschieden: Die G418-Konzentration betrug 50 µg/ml. In jede Vertiefung wurde 100 µl S10/2 vorgelegt, woraufhin in den Vertiefungen der ersten Reihe je 100 µl der Zellsuspension pipettiert wurde. Die serielle Verdünnung über die gesamte Mikrotiterplatte wurde durch einen Übertrag von je 100 µl auf die nächste Reihe hergestellt.

2.2.6 Herstellung einer genomischen Cosmidbank-DNA (pcosPER104)

Die Herstellung der Cosmidbank-DNA von pcos104 erfolgte weitgehend nach den Protokollen von Sambrook und Russell [93].

2.2.6.1 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA zur Herstellung von Cosmidbank-DNA

Es wurden 4 x 10^9 *Leishmania*-Zellen zur Isolierung hochmolekularer genomischer DNA (gDNA) eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst sedimentiert (10 min, 720 x g, 4 °C), zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1 x 10^9 Zellen/ml in TE-Puffer aufgenommen. Nach einer Zugabe von DNA-Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 100 mM EDTA, pH 8,0; 20 µg/ml RNase A; 0,5 % SDS) wurde die Zellsuspension für 1 Std. bei 37 °C

inkubiert. Danach wurde dem Zelllysat 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und es folgte eine dreistündige Inkubation bei 50 °C unter leichtem Schütteln. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) wurde eine dreimalige Extraktion mit je einem Volumen Phenol pH 8,0 (Tris-gesättigt) durchgeführt. Das mit Phenol versehene Lysat wurde dabei für etwa 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. Die nachfolgende Phasentrennung erfolgte durch Stehenlassen, die zwischen sechs bis 20 Stunden dauerte. Die wässrige Phase wurden dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 0,2 Volumen 10 mM Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol erschien die gDNA als weiße Flocke. Durch eine zu einem Haken ausgezogene Pasteurpipette konnte die gDNA in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die gDNA wurde in 500 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und über 24 Stunden auf dem Rollenschüllter vollständig gelöst. Zur Qualitätskontrolle der gDNA wurde eine Agarosegelelektrophorese (AGE) mittels Feldinversions-Gelelekrophorese (FIGE, 2.2.15) durchgeführt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (2.2.10).

2.2.6.2 Partialverdau der hochmolekularen gDNA

Für die Herstellung der Cosmidbank-DNA mit dem Vektor pcosTL (Abb. 2.1) wurden DNA-Fragmente einer Größe von 29,5 bis 42,5 kb benötigt. Diese Fragmente sollten aus der hochmolekularen gDNA möglichst zufällig und unabhängig von der Basensequenz in Fragmente der entsprechenden Größe zerlegt werden. Dafür wurde ein Partialverdau mit der Restiktions-endonuklease *Sau*3AI durchgeführt, die die häufig im Genom vertretene Tetranukleotidsequenz GATC schneidet und damit Überhänge erzeugt, die mit dem Vektor pcosTL kompatibel sind.
In einem Test-Partialverdau wurden je 5 µg DNA mit verschiedenen Enzymkonzentrationen verdaut. Die Reaktion wurde nach genau einer Stunde durch die Zugabe von 25 mM EDTA und einer Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten gestoppt. Durch einer anschließende Auftrennung der Fragmente über eine FIGE (2.2.15) wurde die Enzymkonzentration ermittelt, die einen optimalen Partial-Verdau der gDNA lieferte. Daraufhin wurde in präparativen Ansätzen insgesamt 40 µg gDNA unter den im Test-Verdau ermittelten Bedingungen (0,06 U *Sau*3AI pro µg gDNA) fragmentiert. Um eine Ligation dieser gDNA-Fragmente untereinander zu verhindern, fand im Anschluss eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase (2.2.11.1) statt. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.8) mit einer anschließenden Fällung (2.2.9). Die gDNA-Fragmente wurden in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.6.3 Vorbereitung des Cosmidvektors pcosTL

Zur Vorbereitung des Cosmidvektors pcosTL wurde dieser nacheinander mit den Restiktionsendonukleasen *Sma*I und *Bam*HI geschnitten, wodurch zwei Vektorarme entstanden. Dabei erfolgte die Liniaresierung von 40 µg Vektor-DNA zuerst mit *Sma*I. Um eine Religation der *Sma*I-Enden zu vermeiden, wurde die Vektor DNA im Anschluss darauf dephosphoryliert (2.2.11.1). Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.8) in dessen Anschluss eine Fällung (2.2.9) der gDNA durchgeführt wurde, wobei die DNA in 100 µl deionisiertem Wasser (ddH_2O) gelöst wurde. Die linearisierte Vektor-DNA wurde einer Behandlung mit *Bam*HI unterzogen, woraufhin die zwei Vektorarme entstanden. Diese wurden über eine AGE (2.2.14) mit einer

anschließenden Extraktion der DNA aus dem Gel (2.2.16) gereinigt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch (2.2.10).

2.2.6.4 Ligationsreaktion der gDNA-Fragmente mit dem Cosmidvektor pcosTL

Die Ligationsbedingungen wurden so gewählt, dass eine *blunt end*-Ligation unterdrückt wurde. Das geschah zum einen durch eine niedrige Ligasekonzentration, sowie durch eine hohe ATP-Konzentration [94]. In einem 20 µl-Ansatz wurden 1 µg gDNA-Fragmente und 2,13 µg der Vektorarme (molares Verhältnis Vektor : *insert* ist 10 : 1) in Ligationspuffer mit 5 mM ATP und einer Weiss-*unit* T4-Ligase eingesetzt. Es folge eine Inkubation bei 4 °C für 16 Stunden. Theoretisch könnten die Vektorarme über die *Bam*HI Enden religieren, dabei würden jedoch Vektorarm-Dimere entstehen, die eine Größe von etwa 8,5 kb aufweisen, womit sie die untere Einschlussgrenze der Phagenpartikel unterschreiten. Als Kontrolle diente eine Reaktion mit den gleichen Komponenten jedoch ohne Zugabe von gDNA-Fragmenten. Über eine AGE wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft, indem Aliquots aus der Kontroll-Reaktion vor bzw. nach Beendigung der Inkubation und ein Aliquot nach Beendigung der Inkubation der Vektorarme zusammen mit den gDNA-Fragmenten analysiert wurden. Im Ligationsansatz liegen nun linearisierte DNA-Moleküle vor, die aus einem Abschnitt gDNA, flankiert von zwei Vektorarmen mit jeweils einer *cos*-Stelle, bestehen.

2.2.6.5 Verpackung der Ligationsreaktion in Phagenpartikel

Für die Verpackungsreaktion wurde der Gigapack® III Gold Packing Extract (Stratagene) verwendet. Die verwendeten Phagenpartikel nehmen ausschließlich lineare DNA zwischen 38 bis 51 kb auf, die zwei *cos*-Stellen aufweisen. Daher wird bei der Aufnahme der DNA in die Phagenpartikel auf Fragmente dieser Größe hin selektiert.
Es wurden 4 µl vom Ligationsansatz (entsprechen 0,2 µg DNA) zu 25 µl schnell aufgetautem Verpackungsextrakt pipettiert, vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und für zwei Stunden bei 22 °C inkubiert. Daraufhin wurde dem Ansatz 500 µl SM-Puffer (100 mM NaCl; 20 mM Magnesiumsulfat; 50 mM Tris-HCL, pH 7,5; 0,01 % Gelatine) und 20 µl Chloroform zugegeben. Nach leichtem Mischen wurde der Ansatz kurz zentrifugiert (5 min, 12 000 x g, 22 °C) um Zelltrümmer zu entfernen, woraufhin der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert wurde.

2.2.6.6 Vorbereitung der Wirtsbakterien *E. coli* XL1-Blue

Es wurde der Wirtsbakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (Statagene) verwendet. Durch den Ausstrich eines Aliquots der Zellen mit einer sterilen Impföse wurden Einzelklone generiert. Eine Einzelkolonie wurde in einer Übernachtkultur angezogen. Aus dieser frischen Kultur wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und mit 0,2 % Maltose sowie mit 10 mM $MgSO_4$ versetzt. Die Kultur wurde bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu dem Zeitpunkt, bei dem die Zellen eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,5 erreicht hatten, wurden sie sedimentiert (10 min, 500 x g, 22 °C) und in 2 ml $MgSO_4$ (10 mM) aufgenommen, so dass eine OD_{600nm} von 0,5 erhalten bleibt. Unmittelbar danach fand die Infektion der Wirtszellen statt.

2.2.6.7 Infektion und Amplifikation der Wirtsbakterien *E. coli* XL1-Blue

Es wurden zwei Verdünnungen (1:10 und 1:50) der Phagensuspensionen in SM-Puffer hergestellt. Jeweils 25 µl der Verdünnungen wurden mit je 100 µl der vorbereiteten Wirtsbakterien erst für 15 Minuten bei RT, dann für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien/Phagensuspension für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße alle 15 Minuten leicht geschwenkt wurden. Nach einer Zentrifugation (3 min, 720 x g, 22 °C) wurde der Überstand bis auf 200 µl abgenommen, das Bakteriensediment resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation von 14 Stunden bei 37 °C wurden die Bakterien-Kolonien ausgezählt. Anhand der Kolonien-Anzahl in der Verdünnungsstufe konnte die Zahl der unabhängige Bakterien-Kolonien errechnet werden, die aus einer kompletten Verpackungsreaktion resultieren würde. Danach wurde die Anzahl der benötigten Verpackungsreaktionen ermittelt, die die Mindestzahl von 4106 unabhängigen Klonen ergeben, mit der die Cosmidbank-DNA das *Leishmania*-Genom mit einer 99 %-igen Wahrscheinlichkeit abdecken (3.2.3.2). Insgesamt zwei Verpackungsreaktionen führten hier zu 6536 Klonen.

2.2.6.8 Vereinigung und Lagerung Cosmidbank-DNA

Die Bakterien-Kolonien wurden mit etwa 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin pro LB-Agarplatte abgeschwemmt und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Nach der Zugabe von 18 % Glycerin wurden sie in Aliquots zu je 1 ml in Kryoröhrchen pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei -20 °C wurde die amplifizierte Cosmidbank-DNA zur Langzeitlagerung bei -70 °C inkubiert.
Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde eine 10^6- und 10^7-Verdünnung der vereinigten Bakterien-Kolonien ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag ausgezählt. Mit der Anzahl der Bakterien-Kolonien und der Verdünnungsstufe wurde eine Zellkonzentration ermittelt (6,15 x 10^6 Bakterien/ml).

2.2.7 Isolierung von Cosmid-DNA

2.2.7.1 Isolierung reiner Cosmid-DNA aus *E. coli* (Maxi-Cosmid-Präparation)

Reine Cosmid-DNA wurde für Transfektionen in *Leishmania* sowie für Sequenzanalysen und Klonierung-Schritte benötigt. Zur präparativen Isolierung der Cosmidbank-DNA wurden 600 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) mit 10 µl der Cosmidbank-DNA tragenden *E. coli*-Suspension (entsprechen 61 500 Bakterien) beimpft. In allen anderen Fällen wurden ebenfals 600 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) durch die gewünschte Bakterien-Einzelkolonie beimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen sedimentiert (20 min, 12 000 x g, 4 °C) und die weitere Isolierung fand mit dem NucleoBond® Xtra Maxi-*Kit* (Machery-Nagel GmbH & CoKG) nach Herstellerprotokoll statt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch (2.2.10).

2.2.7.2 Isolierung von Cosmid-DNA aus *Leishmania*

Nach den Sb(III)-Selektionen wurde die Cosmid-DNA aus den überlebenden *Leishmania*-Populationen isoliert. Dabei wurden etwa 2 x 10^9 Zellen sedimentiert (10 min, 1 260 x g, 4 °C), zwei mal mit kaltem PBS (pH 7,0) gewaschen und in 2 ml Lösung 1 (2.1.12) aufgenommen. Zur

Zelllyse wurde 4 ml Lösung 2 (2.1.12) zugegeben und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von Lösung 3 (2.1.12) und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde die gDNA zusammen mit dem SDS-Lipid-Proteinpräzipitat gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 3 220 x g für 30 Minuten bei 4 °C wurde das Präzipitat von der gelösten Cosmid DNA getrennt, woraufhin der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert wurde. Durch die Zugabe von 40 µg/ml RNase A und einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde die RNA verdaut, woraufhin eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.8) durchgeführt wurde. Durch die Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die Cosmid-DNA gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 20 bis 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Ein Aliquot wurde über eine AGE (2.2.14) aufgetrennt, anhand dessen die Qualität der DNA überprüft wurde. Daraufhin wurden die Menge der DNA bzw. das Volumen für die Transformation (2.2.13) abgeschätzt.

2.2.7.3 Isolierung Cosmid-DNA aus *E. coli* in geringen Mengen (Mini-Cosmid-Präparation)

Für die Analysen von RFLP (2.2.11.2) wurde einfache und effiziente Mini-Cosmid-DNA-Präparation zur Isolierung von Cosmid-DNA aus *E. coli* eingesetzt. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) von einer Bakterien-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Parallel dazu erfolgte ein Ausstrich dieser Kolonie auf einer LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml), die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurden die Kultur für 20 Minuten und 1 260 x g bei 4 °C sedimentiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei einer Cosmid-DNA Isolierung aus *Leishmania* (2.2.7.2); die Mengen der Lösungen betrugen dabei: 200 µl Lösung 1, 400 µl Lösung 2, 300 µl Lösung 3. Außerdem wurde der Reaktionsansatz nach Abtrennung des Präzipitats nicht gefiltert und der RNase Verdau fand am Schluss statt.

2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde verwendet, um Proteine aus Cosmid-DNA Lösungen abzutrennen. Dazu wurde der Lösung ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Nach mehrmaligem Kippen erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation (6-10 min, 3 220 x g, 20 °C), woraufhin die untere organische Phase verworfen wurde. Nach einer Wiederholung dieser Schritte wurde der verbleibenden wässrigen Lösung ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeführt. Auch hier folgte die Vermengung durch mehrmaliges Kippen, gefolgt von einer Phasentrennung durch eine Zentrifugation bei 3 220 x g für 10 Minuten bei 20 °C. Daraufhin wurde die oberen wässrigen Phase, in der die DNA gelöst ist, ohne Beteiligung der Interphase, in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert.

2.2.9 Ethanol-Fällung von DNA

Zur Entsalzung, Konzentrierung oder zum Wechsel des Puffers einer Nukleinsäure-Lösung wurde die Ethanol-Fällung angewendet. Hierzu wurde der DNA-Lösung 0,1 Volumen 10 mM Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol zugegeben. Nach mehrmaligem Kippen erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei RT. Die gefällte DNA wurde dann durch eine Zentrifugation bei 3 220 x g, für 30 min bei 20 °C sedimentiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die angetrocknete DNA wurde schließlich in der gewünschten Lösung aufgenommen.

2.2.10 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe einer faseroptischen Ultra-Mikro-Messzelle (TrayCell, 0,2 mm-Deckel). Diese Technik erlaubt Messungen mit sehr geringen Probenvolumina von 0,7 bis 4 µl. Es wurde die OD_{260nm} und OD_{280nm} bestimmt. Anhand der Annahme, dass doppelstang DNA bei einer OD_{260nm} von 1 in einer Konzentration von 50 µg/ml vorliegt, wurden die Konzentrationen der Proben errechnet. Durch das Verhältnis von OD_{260nm} und OD_{280nm} kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Bei einer sehr reiner DNA liegt der Wert bei 1,8. Verunreinigungen durch z.B. Phenol oder Proteine weisen Werte kleiner 1,8 auf, während man bei Werten über 2,0 von Verunreinigungen durch RNA ausgeht.

2.2.11 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.2.11.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Die durch Restiktionsendonuklease behandelten linearisierten DNA-Fragmente verfügen über 5‘-Phosphatgruppen, die in einer nachfolgenden Ligationsreaktion ungewollte aneinander Lagerungen von Fragmenten oder die Rezirkulation des geöffneten Vektors verursachen können. Die Behandlung der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (CIP, *calf intestinal alkaline phosphatase*) spaltet diese 5‘-Phosphatgruppe ab und schränkt somit die ungewollten Ligationsprodukte ein.

Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit 5‘-Überhängen erfolgten in einem Volumen von 100 µl, in dem eine Einheit alkalischer Phosphatase pro µg DNA im zugehörigen Puffersystem eingesetzt wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde, wobei nach 30 Minuten erneut Enzym zugeführt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mM EGTA und einer Inkubation bei 75 °C für 5 Minuten beendet.

Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit 3‘-Überhängen erfolgten dagegen für 15 Minuten bei 37 °C. Danach folgte eine erneute Zugabe von Enzym und die Reaktion fand für eine weitere Stunde bei 55 °C statt. Auch hier wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 mM EGTA und einer Inkubation bei 75 °C für 5 Minuten beendet.

Zur vollständigen Entfernung des Enzyms wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.8) oder eine Aufreinigung über das *Easy Pure* DNA *Purification Kit* über eine AGE durchgeführt.

2.2.11.2 Anwendungen von Restriktionsendonukleasen zur Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Sequenzen doppelsträngiger DNA, wo sie durch eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen die DNA spalten können. Dabei entstehen, je nach Enzym, 3‘- oder 5‘-überhängende Enden oder glatte Enden.

Die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusses (RFLP) wurde zur Bestimmung von Cosmidtypen eingesetzt. Dabei wurden üblicherweise 3 µl einer Mini-Cosmid-DNA-Präparation (2.2.7.3) oder 1 µg einer Maxi-Cosmid-DNA-Präparation (2.2.7.1) in einem 15 µl Ansatz mit je 6 Einheiten der Restriktionsenzyme *Eco*RV und *Xba*I im entsprechenden Puffersystem eingesetzt. Die Reaktionen wurden für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von DNA-Ladepuffer, woraufhin die Fragmente über eine AGE (2.2.14) aufgetrennt und analysiert wurden.
Für Klonierungen wurden zwischen 10 bis 20 µg DNA in einem 100 µl Ansatz mit 10 bis 20 Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonukleasen im vorgegebenen Puffersystem für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer erneute Zugabe von Enzym fand die Reaktion für eine weitere Stunde bei 37 °C statt. Puffersystem eigesetzt. Die Reaktionen wurden für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von DNA-Ladepuffer gestoppt, woraufhin die Fragmente über eine AGE (2.2.14) aufgetrennt und isoliert (2.2.16) wurden.

2.2.11.3 Klenow-Auffüllreaktionen

Die Klenow Polymerase ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase I, die eine 5‘-3‘-Polymerase-Aktivität aufweist. Sie kann somit aus 5‘-Überhängen, durch den Einbau komplementärer Nukleotide in der einzelstang-DNA, glatte Enden erzeugen. Diese Reaktion wurde bei der Herstellung von Deletionskonstrukten eingesetzt, mit der nicht kompatible 5‘-Überhänge über die erzeugten glatten Enden kompatibel wurden. Diese Reaktionen fanden in 100 µl Ansätzen statt, in denen jeweils 10 µg DNA, 10 Einheiten der Klenow Polymerase, dNTP (je 33 µM) in dem vom Hersteller der Klenow Polymerase vorgegebenen Puffersystem für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch die Zugabe von 10 mM EDTA und einer Inkubation für 10 Minuten bei 70 °C, woraufhin die DNA nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion einer DNA-Fällung (2.2.8/9) unterzogen wurde, bei der sie schließlich in 10 µl ddH_2O gelöst wurde. Die so gereinigte DNA wurde dann in die Ligationsreaktionen eingesetzt.

2.2.11.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligation bezeichnet die Verbindung von DNA-Fragmenten durch kovalente Verknüpfung der 5‘-Phosphatgruppe mit der 3‘-Hydroxylgruppe, die durch die T4-DNA-Ligase katalysiert wird. Die Reaktionen fanden in 20 µl Volumen statt. Vektor-DNA und *insert*-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die eingesetzte Menge Vektor-DNA maximal 100 ng betrug. Im Fall einer Religation, bei der die beiden Enden einer linearisierten DNA verbunden wurden, betrug die eingesetzte DNA-Menge bis zu 1 µg. In den Reaktionen wurde je eine Einheit Ligase im entsprechenden Puffersystem eingesetzt. Die Ligation von kohäsiven Enden erfolgte über Nacht bei 4 °C, die von glatten Enden bei RT für 4 Stunden. Anschließend wurden die Ansätze in *E. coli* transformiert (2.2.13).

2.2.12 Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue

Es wurde der Wirtsbakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (Statagene) verwendet. Durch den Ausstrich eines Aliquots der Zellen wurden Einzelklone generiert. Eine Einzelkolonie wurde in einer Übernachtkultur angezogen, woraufhin am folgenden Tag frisches LB-Medium mit 0,01 Volumen dieser Übernachtkultur angeimpft wurde. Diese Kultur wurde bei 37 °C unter leichtem Schütteln solange inkubiert, bis die Zellen eine OD_{600nm} von 0,5 bis 0,7 erreicht hatten, woraufhin sie für 20 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C und der Verwendung von kalten Lösungen. Die Zellen wurden sedimentiert (15 min, 4 000 x g, 4 °C) und in einem Volumen 10 %-iger Glycerol ihres Ausgangsvolumens resuspendiert. Zwei Wiederholungen dieser

Schritte folgten, wobei die Zellen in 0,5 und bzw. in 0,04 Volumen 10 %-iger Glycerol resuspendiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.13 Transformation von DNA in *E. coli* XL1-Blue durch Elektroporation

Ähnlich zur Transfektion handelt es sich bei der Transformation um das Einbringen von zirkulärer DNA in Prokaryonten, hier in *E. coli*, die in der Folge episomal im Organismus vorliegt. Wie schon bei der Transfektion beschrieben, wird bei der Elektroporation die Zellmembran durch einen Spannungspuls kurzzeitig permeabel, so das die DNA in die Zelle gelangen kann. Dazu wurde ein 50 µl Aliquot kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen (2.2.12) auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 5 µl der entsprechenden DNA gemischt und in kalte Elektroporationsküvetten (0,1 cm) überführt. Mit dem MicroPulser™ erfolgte die Elektroporation durch das im Gerät vorgegebene Programm „Ec1“ (ein Stromstoß mit einer Stromstärke von 1,8 kV). Die Zellen wurden dann sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C leicht geschüttelt. Daraufhin wurden 100 bis 200 µl dieser Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.14 Agarosegelelektrophorese (AGE)

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe können mit Hilfe der AGE in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die DNA ist aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Größe. Die Konzentration der Agarose kann den Trennbereich des Gels beeinflussen. Höhere Agarosekonzentrationen verringert die Porengröße im Gel und damit wird die Wandergeschwindigkeit der DNA verringert. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde 1 % bzw. 3 % Agarose in TAE-Puffer durch aufkochen vollständig in Lösung gebracht. In noch warmen, flüssigem Zustand wurde die Lösung in Träger für horizontale Gelelektrophorese-Kammern gegossen. Zur Erzeugung der Geltaschen wurden Kämme noch in die flüssige Agarose eingesetzt. Die Aushärtung der Gele fand bei RT statt, wonach sie in die Gelkammern transferiert wurden. Die Gelkammern wurden mit TAE-Puffer gefüllt, so dass die Elektroden und das Gel komplett bedeckt waren. Nach der Entfernung des Kamms wurden die zu untersuchenden Proben mit 0,2 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für den Größenvergleich wurde ein entsprechende Längenstandard (2.1.5) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm für 1 bis 3 Stunden, wonach das Gel in TAE-Puffer mit 10 µg/ml Ethidiumbromid für etwa 30 Minuten gefärbt und anschließend für 10 min in ddH_2O entfärbt wurde. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.2.15 Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE)

Um im Vergleich zur AEG eine höhere Auflösung der aufzutrennenden DNA-Fragmente zu erzielen, wurde die FIGE angewendet. Die höhere Auflösung wird dadurch erzielt, dass sich die Polarität der Elektroden periodisch umkehren. Das führt dazu, dass sich langkettige DNA-

Fragmente durch den Richtungswechsel um 180° kurzfristig im Gel umorientieren, wodurch sie eine Konformationsänderung erfahren, die sich dann durch ein längenabhängiges Relaxationsverhalten mit entsprechender Mobilität im Gel zeigt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente basierte damit auf den Richtungswechsel des elektrischen Feldes und dem Zeitintervall.
Für die Herstellung des Gels wurden 3 g Agarose in 300 ml 0,5 x TBE (45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht und vollständig gelöst. Die auf etwa 55 °C abgekühlte Lösung wurde in die Gelkammer (Owl A5 *Large Gel System*) gegossen und mit einem Kamm bestückt. Nachdem die Agarose bei RT vollständig zum Gel polymerisiert war, wurde die Kammer mit 0,5 x TBE versehen. Die Beladung der DNA-Proben und des entsprechenden Längenstandards (2.1.5) wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Die Dauer der Elektrophorese betrug 16 Stunden und wurde bei 4 °C durchgeführt. Der SwitchBack™ Puls Controller wurde verwendet, wobei die Programme 1 und 2 nacheinander abliefen, die folgende Parameter aufwiesen:

	Programm 1	**Programm 2**
Spannung:	200 Volt	200 Volt
Einlaufzeit:	10 min.	-
Gesamtlaufzeit:	8 Stunden	8 Stunden
Pulse time:	1-20 sek.	0,8-1,5 sek.
Mode:	reverse	reverse
FIR:	3:1	3:1

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in 0,5 x TBE mit 10 µg/ml Ethidiumbromid für etwa 30 Minuten gefärbt und anschließend für 10 Minuten in ddH_2O entfärbt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.2.16 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das entsprechende Fragment nach einer AGE (2.2.14) aus dem Gel unter langwelligem UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktions-gefäß überführt. Bei Fragmenten, die kleiner 10 kb waren, wurde das *Kit* NucleoSpin® *Extract* II angewendet. Bei Fragmenten, die größer 10 kb waren, fand die Isolierung der DNA aus dem Gel mit dem *Kit Easy Pure* DNA *Purification* statt. In beiden Fällen wurde die Isolierung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei die DNA am Schluss in 10 bis 15 µl ddH_2O eluiert bzw. gelöst wurde.

2.2.17 Partielle Sequenzanalysen zur Bestimmung der *insert*-DNA von Cosmiden

Die Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA GmbH in Berlin durchgeführt. Dazu wurde die zu untersuchende Cosmid-DNA mit den jeweiligen DNA-Oligonukleotiden (*pr*-CH-2 oder *pr*-M13-R, 2.1.7) entsprechend den Angaben von AGOWA vorbereitet und verschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem *L. braziliensis*-Chromosomen des *Leishmania*-Genomprojekts abgeglichen und ausgewertet.

2.2.18 Sequenzanalysen durch *Primer Walking*

Nach dem Abgleich der partiellen Sequenzen des Cosmids pcosC1.6 mit dem *Leishmania*-Genomprojekt offenbarten sich zwei Regionen (Unb. 1 und 2) auf der *insert*-DNA, über die keine Sequenzinformation vorlag. Um die komplette Sequenzinformation zu erlangen, wurde das sog. *Primer Walking* angewendet. Dabei wurde von der bekannten Sequenz ausgehend in die noch unbekannten Regionen hinein sequenziert (2.2.17). Auf der Grundlage der erhaltenen Sequenzdaten wurden neue DNA-Oligonukleotide entworfen, mit denen weiter in die gleiche Richtung sequenziert wurde. Das wurde so lange gemacht, bis die komplette Sequenzinformation der zunächst unbekannten Sequenz vorlag. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in 2.1.7 aufgelistet.

2.2.19 Semi-quantitatine *real-time* RT-PCR

Durch die semi-quantitative *real-time* Reverse-Transkriptase PCR wurden die relativen mRNA Mengen des Gens *Lb*-210 in rekombinanten *L. infantum* als auch in den *L. braziliensis* Feldisolaten bestimmt. Dazu wurden jeweils 2 bis 3 x 10^7 *Leishmania*-Zellen sedimentiert und zweimal mit PBS (pH 7,0) gewaschen.

Im Fall der *L. infantum*-Zellen erfolgte die Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers. Daraufhin folgte die cDNA-Synthese unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits.

Bei den *L. braziliensis* Feldisolaten fand die Isolierung der RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion unter der Verwendung von Trizol® statt. Zur RNA-Fällung wurden 500 µl Isopropanol pro eingesetztem 1 ml Trizol® zugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 10 000 x g, 22 °C) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet wurde mit 1 ml 75 %-igem Ethanol pro eingesetztem 1 ml Trizol® gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 7 500 x g, 22 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für etwa 10 Minuten an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 55 °C gelöst. Zur vollständigen Entfernung der DNA fand ein DNA-Verdau mit dem *Kit* RQ1 RNase-Free DNase (Promega) nach Herstellerangaben statt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Qubit® Fluorometer. Für die cDNA-Synthese wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet, wobei 300 - 500 ng RNA eingesetzt wurden, wobei als Kontrolle eine Reaktion unter den gleichen Bedingungen jedoch ohne Enzym stattfand. Um den Erfolg cDNA-Herstellung zu testen, wurde ein Aliquot aus den cDNA-Reaktionen (Kontrolle und Probe) in einer herkömmlichen PCR mit den DNA-Oligonukleotiden Lb-210-F/R eingesetzt und über ein AGE ausgewertet. Nur wenn in der Kontrolle keine Amplifikation stattfand, wurde die cDNA in die Untersuchungen eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte prinzipiell bei -70 °C, jedoch fand die Lagerung bei dem Transport zwischen Peru und Deutschland für 3 Tage bei RT statt.

Die erhaltene cDNA wurde, mit spezifischen DNA-Oligonukleotiden (2.1.7), auf die Transkripte des Gens *Lb*-210 und Actin (interner Standard) untersucht. Dabei kam das RealMasterMix Kit, das den Farbstoff SYBR Green enthält, zum Einsatz. Die Amplifizierung erfolgte im *real-time* PCR Cycler Rotorgene 3000 (*software* Version 6).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Feldisolate *L. braziliensis* PER002 (PER002) und *L. braziliensis* PER104 (PER104)

3.1.1 Herkunft der Feldisolate PER002 und PER104

Um natürliche Resistenzmechanismen von *Leishmania braziliensis* gegen Antimonverbindungen zu identifizieren, dienten als Grundlage der Untersuchungen *Leishmania*-Feldisolate, die vor Beginn der Antimon-Therapie aus dem infizierten Gewebe angezüchtet wurden.
Die Parasiten-Gewinnung und deren primäre *in vitro* Anzucht in biphasischem Medium, die Bestimmung der Gattung und die Kryokonservierung in Aliquots erfolgte im Labor von Prof. Jorge Arevalo in Lima, Peru. Die Behandlung und Dokumentation über den Therapieverlauf des infizierten Patienten erfolgte in Kooperation mit dem Institut „Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt““, Lima, Peru.

3.1.2 *In vitro* Charakterisierung der Feldisolate PER002 und PER104

Für diese Arbeit wurden die Feldisolate *L. (V.) braziliensis* PER002 (PER002) und *L. (V.) braziliensis* PER104 (PER104) (Tab. 2.1 und 3.1) aufgrund ihrer *in vitro* ermittelten Sb-Sensitivität ausgewählt [19]. Es wurden dabei sowohl die Sb-Sensitivität der Promastigoten gegen dreiwertiges Antimon (Sb(III)), als auch die der Amastigoten in einem Makrophagen-Modell mit fünfwertigem Antimon (Sb(V)) getestet. Die Parasiten wurden zu Beginn der Untersuchungen an monophasisches Medium M199 adaptiert [19].

PER002 = Sb(V)-Resistent ($Sb(V)^R$) und Sb(III)-Sensitiv ($Sb(III)^S$)
PER104 = Sb(V)-Resistent ($Sb(V)^R$) und Sb(III)-Resistent ($Sb(III)^R$)

Nach Adaption der Feldisolate an modifiziertes Schneider‘s *Insect Medium* (S10/2; 2.1.9) wurde die unterschiedliche Sb(III)-Sensitivität der Isolate im neuen Wachstumsmedium überprüft. Dazu wurden promastigote Zellen von PER002, Klon 7 (PER002K7) und PER104 aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen, mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen eingesät und für 3 Tage kultiviert. Die Zelldichten wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bestimmt (2.2.1). Die Ergebnisse von sechs unabhängigen Versuchen sind als Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.1 zusammengefasst.

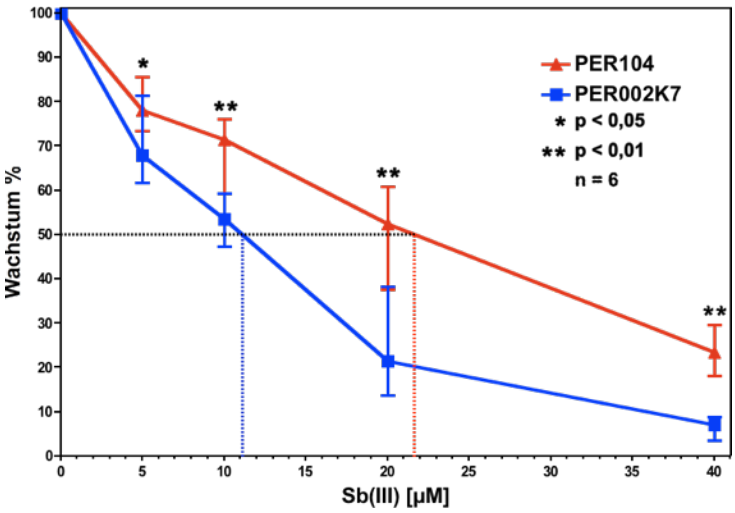

Abb. 3.1 Effekt von Sb(III) auf die Vermehrung von PER002, Klon 7 (PER002K7) und PER104. PER002K7 und PER104 wurden jeweils mit einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider's *Insect Medium*) eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zelldichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus sechs unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an. Die mit Sternen gekennzeichneten p-Werte wurden mit dem *Mann-Whitney U Test* ermittelt. Mit den gestrichelten Linien sind die jeweiligen IC_{50}-Werte für Sb(III) angedeutet.

Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, besitzt PER104 einen etwa 2-fach höheren IC_{50}-Wert (*inhibiting concentation*) für Sb(III) als PER002K7. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Yardley *et al., 2006* [19] ermittelten Sb(III)-Sensitivität beider Isolate und zeigt zudem, das auch nach einer weiteren Umstellung des Kulturmediums die unterschiedlichen Sb(III)-Resistenzeigenschaften der jeweiligen Feldisolate nicht verloren gegangen sind.
Weiterhin wurde ein Vergleich des Wachstumsverhaltens von PER104 mit PER002K7 durchgeführt. Dazu wurden promastigote Zellen von PER002K7 und PER104 aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit jeweils gleicher Zelldichte eingesät. Während einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden alle 24 Stunden Bestimmungen der Zelldichten durchgeführt (2.2.1). Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis von jeweils vier unabhängigen Versuchen.

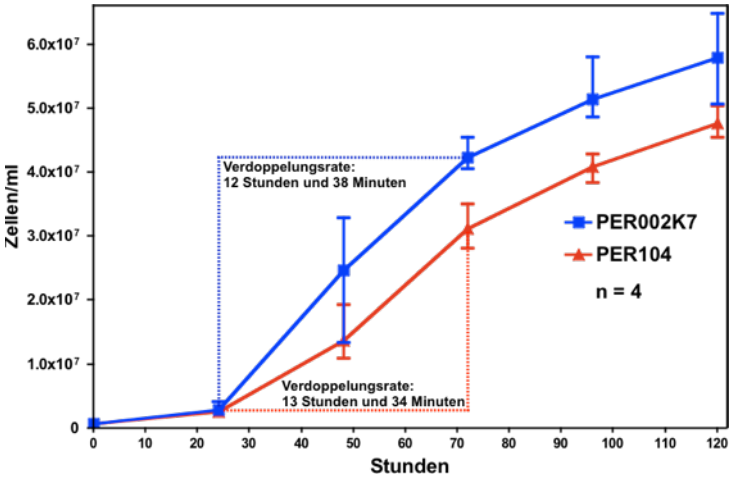

Abb. 3.2 Wachstumsverhalten von PER002K7 und PER104. Die Isolate PER002K7 und PER104 wurden jeweils mit einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider's *Insect Medium*) eingesät. Alle 24 Stunden wurden die Zelldichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* ermittelt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an. Die Verdoppelungsraten zwischen Tag 1 und 3 wurden errechnet und sind innerhalb der gestrichelten Linien angegeben.

Aus Abbildung 3.2 wird deutlich, das PER002K7 im Vergleich zu PER104 schneller in die logarithmische Wachstumsphase eintritt. Auch die errechnete Verdoppelungszeit zwischen Tag 1 und Tag 3 ist für PER002K7 (12,5 Stunden) um etwa 1 Stunde höher als für PER104 (13,5 Stunden). Weiterhin ist zu erkennen, das PER104 in der späten logarithmischen Phase bis hin zum Beginn der stationären Phase eine geringere Zelldichte als PER002K7 aufweist. Es besteht somit unter den hier vorliegenden *in vitro*-Bedingungen, neben dem Unterschied der Sb(III)-Sensitivität, auch ein Unterschied im Wachstumsverhalten der hier untersuchten Zellen.

3.1.3 *In vivo* Charakterisierung der Feldisolate PER002 und PER104

In der folgenden Tabelle sind Informationen zur Krankengeschichte der mit den jeweiligen Feldisolaten infizierten Patienten aufgelistet. In Bezug auf die *Leishmania*-Infektion konnte der mit PER002 infizierte Patient nach dem zweiten Behandlungszyklus mit Antimonpräparaten als geheilt eingestuft werden. Hingegen wurde bei dem mit PER104 infizierten Patient eine Anschlussbehandlung mit Amphothericin B eingeleitet, nachdem zwei Antimon-Therapiezyklen ohne Erfolg durchgeführt wurden.

Tabelle 3.1 : Information zur Krankengeschichte der mit PER002 und PER104 infizierten Patienten

	PER002	PER104
Datum der Konsultation	14. November 2001	25. Oktober 2002
Alter / Geschlecht / BMI	< 30 Jahre / männlich / 20,6	< 30 Jahre / männlich / 26,2
Diagnose	kutane Leishmaniasis (CL)	kutane Leishmaniasis (CL)
allgemeine Anamnese	Hepatitis A	keine
Leishmaniasis-Anamnese	nein	ja, Beginn: 01. Juni 2002
Therapie der Leishmaniasis-Anamnese	obsolet	SSG, 20 mg/kg, 20 x
Begleiterkrankung	keine	keine
Start der jetzigen Leishmaniasis	23. Oktober 2001	01. Juni 2002
Anzahl der aktiven Läsionen	1	2
gesamte Fläche der Läsionen	1,84 cm^2	8,42 cm^2
Test auf HIV-Infektion	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
jetzige Therapie	SSG	SSG
Marke des Therapeutikums	Generic / Colombia	Generic / Colombia
tägliche Dosis	15,9 mg/kg	14,9 mg/kg
Anzahl der Dosen	20	20
gesamte Dosis mg/kg	317,5 mg/kg	298,5 mg/kg
Therapieverlauf	Therapieversagen	Therapieversagen
Nachbehandlung mit	SSG + Aldara	Amphotericin B
Endeinstufung	CL mit vorangegangenem Therapieversagen	CL mit zweimaligen vorangegangenem Therapieversagen

Legende: SSG = Natrium-Stibogluconat BMI = *Body Mass Index*

Aufgelistet sind verschiedene Information zum Krankheitsverlauf der mit PER002 und PER104 infizierten Patienten. Die Informationen wurde freundlicherweise von Prof. Jorge Arevalo zur Verfügung gestellt.

3.2 *Screening* der *Leishmania braziliensis* Cosmidbank-DNA von PER104, $Sb(III)^R$

3.2.1 Funktionelle Komplementation

Als Strategie zur Identifizierung genetischer Marker aus Feldisolaten, die den *Leishmania*-Parasiten Resistenz gegen Antimon verleihen, wurde das Prinzip der Funktionellen Komplementation (1.9) gewählt. In einer ersten Analyse sollten Resistenzmarker aus dem Sb(III)-resistenten Feldisolat PER104 (Donor) identifiziert werden. Dazu wurde eine Cosmidbank, hergestellt aus PER104 ($Sb(III)^R$), in den Sb(III)-sensitiven Akzeptor-Klon PER002K7 ($Sb(III)^S$) transfiziert. Mit der resultierenden rekombinanten Population (Cosmid-tragenden Zellen) sollten durch *in vitro*-Selektion mit Sb(III) die Cosmide ermittelt werden, die den Sb(III)-sensitiven

Parasiten unter diesen Bedingungen eine höhere Überlebensrate ermöglichen. Wir gingen davon aus, dass neu erworbene Sb(III)-Resistenzen der überlebenden Parasiten von der Information auf den Cosmiden vermittelt wird.

3.2.2 Herstellung einer genomischen Cosmidbank-DNA von PER104, Sb(III)^R

Die Cosmid-Bank wurde unter Nutzung des *shuttle*-Vektors pcosTL (2.1.8) konstruiert. Zur Vorbereitung des Vektors wurde dieser nacheinander vollständigen Verdauen mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bam*HI unterzogen. Dabei öffnet das Enzym *Sma*I den Vektor zwischen den beiden cos *sites* und liefert *blunt ends*, wohingegen der Verdau mit dem Enzym *Bam*HI in 5`-Überhängen resultiert (5‘-GATC-3‘), die mit *Sau*3AI-geschnittenen DNA-Fragmenten kompatibel sind.
Die hier verwendete genomische DNA (gDNA) stammt aus dem Feldisolat *L. (V.) braziliensis* PER104, Sb(III)^R (Tab. 2.1 und 3.1) und wurde in einem hohen Reinheitsgrad, wie unter 2.2.6.1 beschrieben, isoliert. Um Fragmente geeigneter Größe zu erhalten, mussten zunächst die Bedingungen für einen Partial-Verdau mit dem Enzym *Sau*3AI optimiert werden. Das Enzym *Sau*3AI erkennt die im Genom von *Leishmania* häufig vorkommende tetramere Sequenz GATC. Hierbei ist es von großer Bedeutung, die gDNA nicht vollständig zu verdauen, da die verwendeten Phagenpartikel (2.2.6.5) ausschließlich lineare DNA zwischen 38 bis 51 kb aufnehmen. Unter Abzug der Länge der beiden angehängten Vektorarme (zusammen etwa 8,5 kb), beträgt die gewünschte Länge der genomischen Fragmente 29,5 bis 42,5 kb. In Abbildung 3.3 ist ein Test-Partialverdau der gDNA mit unterschiedlichen Konzentrationen des Enzyms *Sau*3AI abgebildet, anhand dessen die optimalen Verdau-Bedingungen ermittelt wurden. Im Anschluss daran wurde die für die Bank benötigte Menge gDNA in einem präparativen Ansatz mit *Sau*3AI unter den im Test-Verdau ermittelten Bedingungen fragmentiert. Um eine Ligation der gDNA-Fragmente untereinander zu verhindern, wurde die *Sau*3AI behandelte DNA im Anschluss dephosphoryliert (2.2.11.1).

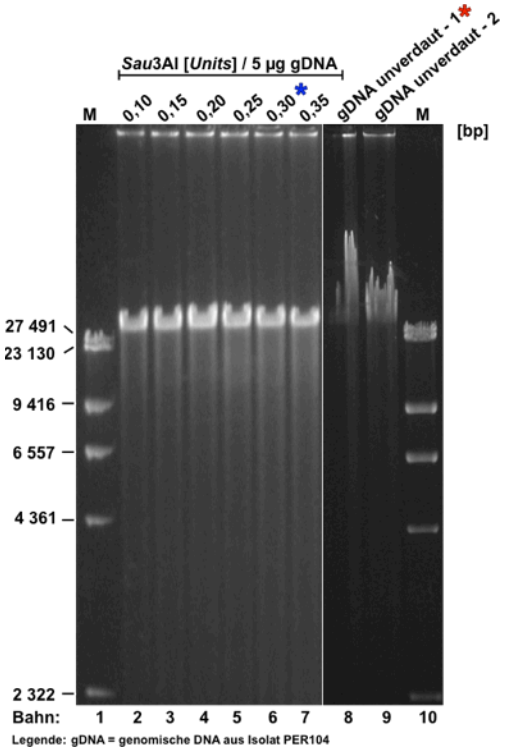

Abb. 3.3: Test-Partialverdau genomischer DNA mit *Sau*3AI. Jeweils 5 µg gDNA wurden einem Restriktionsverdau mit *Sau*3AI in unterschiedlichen Konzentrationen unterzogen. Das resultierende Verdau-Muster und unverdaute DNA wurden in einem 1 %-igem Agarosegel, mittels Feldinversions-Gel-elekrophorese (FIGE) aufgetrennt. Die DNA wurde durch nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die mit M gekennzeichneten Bahnen (Bahn 1 und 10) wurden mit dem DNA-Längen-standard Lambda DNA/*Hind*III Marker beladen, dessen Fragmentgrößen links im Bild angezeigt sind. Bahn 8 und 9 wurden mit Aliquots aus zwei unabhängig voneinander isolierter gDNA aus *L. braziliensis* PER104 beladen. Zur Herstellung der Cosmidbank-DNA wurde die in Bahn 8 repräsentativ aufgetragene gDNA (roter Stern) gewählt. Die oben mit 0,1 bis 0,35 gekennzeichneten Bahnen wurden mit jeweils einem Aliquot der DNA aufgetragen, die einem *Sau*3AI-Verdau unterzogen wurde. Die Zahlen stehen für die entsprechende Konzentration des Enzyms, angegeben in *Units* pro 5 µg gDNA. Für die Herstellung der Cosmid-Bank wurden die gleichen Verdau-Bedingungen angewendet, wie sie in Bahn 6, also mit 0,3 Units pro 5 µg gDNA, repräsentativ zu sehen sind (blauen Stern).

Die vorbereiteten Vektorarme wurden zur Ligation mit den dephosphorylierten gDNA-Fragmenten eingesetzt. Als Kontroll-Reaktion diente eine Ligation der beiden Vektorarme ohne die Zugabe von gDNA-Fragmenten. Aliquots aus dem Kontroll-Ligationsansatz vor bzw. nach Beendigung der Inkubation und ein Aliquot nach Beendigung der Inkubation der Vektorarme zusammen mit den gDNA-Fragmenten wurden durch Agarosegelelektrophorese (AGE) analysiert, um die Vollständigkeit der Reaktion zu ermitteln.

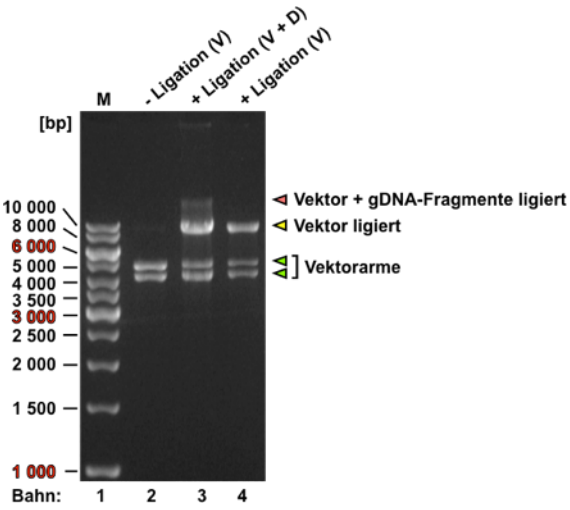

Abb. 3.4: Ligationskontrolle. Die Abbildung zeigt ein 1 %-iges Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Bahn 1 (M) wurde mit dem DNA-Längenstandard *GeneRuler*™ 1 kb DNA *Ladder* beladen, dessen Fragmentgrößen links im Bild angezeigt sind. Der Vektorkontrolle (V) wurden direkt nach dem Beginn und am Ende der Ligasereaktion ein Aliquot abgenommen (Bahn 2 und 4). Das auf Bahn 3 aufgetragene Aliquot stammt aus dem Ende der Ligationsreaktion der dephosphorylierten DNA-Fragmenten zusammen mit den Vektorarmen (V + D). Die Pfeile auf der rechte Seite markieren die Vektorarme (grüne Pfeile), den legierten Vektor (gelber Pfeil) und die Produkte aus der Ligation der Vektorarme zusammen mit den gDNA-Fragmenten (roter Pfeil).

Im Kontroll-Ansatz auf Bahn 2 in Abbildung 3.4 sind die beiden Vektorarme (4 kb und 4,5 kb) zu Beginn der Ligationsreaktion zu erkennen. Nach Beendigung der Reaktion (Bahn 4) sind die beiden Banden etwas schwächer, während sich eine neue Bande der Größe 8,5 kb gebildet hat. Diese Bande entspricht der Größe des Vektors durch die Zusammenlagerung der beiden Vektorarme. In der auf Bahn 3 aufgetragenen Ligationsreaktion nach Beendigung der Reaktion ist,

neben den beschriebenen Banden, eine zusätzliche, unscharfe Bande bei > 10 kb zu beobachten. Diese Bande stellt die gewünschten Ligations-Produkte aus Vektorarmen und gDNA dar.
Die Verpackung des Ligationsansatzes in Phagenpartikel sowie die Infektion und Amplifikation der Cosmidbank in *E. coli* XL1-Blue erfolgte wie unter 2.2.6.5 bis 2.2.6.7 beschrieben. Nach der Vereinigung zweier Verpackungsansätze und der Amplifikation in Bakterien wurden insgesamt 6536 unabhängige Bakterien-Kolonien vereinigt. Die Lagerung der vereinigten Bakterien und die daraus gewonnene Cosmidbank-DNA erfolgte wie in 2.2.6.8 beschrieben. Da die hier verwendete gDNA aus dem Feldisolat PER104 stammt (Tab. 2.1 und 3.1), wird die Cosmidbank-DNA im folgenden mit pcosPER104 bezeichnet.

3.2.3 Überprüfung der Repräsentativität der Cosmidbank-DNA pcosPER104

3.2.3.1 Ermittlung der durchschnittlichen Fragmentgröße in den Cosmiden der Genbank

Aus zwölf unabhängigen Bakterien-Kolonien, die im Zuge der Amplifikation der hergestellten Cosmidbank pcosPER104 entstanden, erfolgte die Isolierung der Cosmid-DNA wie unter 2.2.7.3 beschrieben. Die Cosmid-DNA wurde durch einen anschließenden Standard-Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Eco*RV (2.2.11.2) fragmentiert. Die resultierenden Fragmente wurden durch eine AEG aufgetrennt. Anhand des aufgetragenen DNA-Längenstandards wurden die resultierenden Fragmentgrößen abgeschätzt und addiert. Unter Abzug der vektorspezifischen Fragmente konnte so eine durchschnittliche Größe der *Insert*-DNA von 37 kb ermittelt werden.

3.2.3.2 Ermittlung der Repräsentativität der Cosmidbank-DNA pcosPER104

Bei einer haploiden Genomgröße von etwa 3,3 x 10^7 bp in *Leishmania braziliensis* [95] können theoretisch 892 Klone das komplette Genom abdecken. Da aber auch überlappende Sequenzen in der Cosmidbank vorhanden sind, wird die tatsächliche Anzahl der benötigten Klone nach der Poisson Verteilung (Gleichung 1) berechnet.

$$N = \left(\frac{\ln(1-P)}{\ln(1-\frac{F}{G})} \right)$$

N = Anzahl der benötigten Klone, um das *Leishmania*-Genom abzudecken
F = Durchschnittliche Größe der *Insert*-DNA
G = Größe des *Leishmania*-Genoms
P = Wahrscheinlichkeit

(Gl. 1)

Mit den oben angegebenen Werten werden 4106 unabhängige Klone benötigt, um das *Leishmania*-Genom mit einer 99 %-igen Wahrscheinlichkeit abzudecken. Die hier erzeugten 6536 Klone decken das *Leishmania*-Genom zu über 99,9 % ab.

3.2.4 Etablierung der Cosmidbank-DNA pcos104 in PER002K7

Die hergestellte Cosmidbank-DNA pcos104 (3.2.2) sollte durch Elektroporation (2.2.3) im Sb(III)-sensitiven Klon PER002K7 (Tab. 2.1) etabliert werden, um mit der daraus resultierenden rekombinanten Population unter Sb(III)-Selektionsdruck ein *screening* auf Sb(III)-Resistenzmarker durchzuführen.

3.2.4.1 Ermittlung der Transfektionseffizienz für Isolat PER002K7

Bei der Etablierung einer Cosmidbank in einer *Leishmania*-Population ist es von Bedeutung, die Anzahl der rekombinanten Zellen pro Standard-Elektroporation (2.2.3) zu ermitteln, um eine Mindestzahl an unabhängigen Transfektanden (Cosmid-tragenden Zellen) zu erzeugen, die die Repräsentativität der eingebrachten Cosmidbank in der rekombinanten Population gewährleisten.
Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgte durch eine *limiting dilution*-Analyse, wie unter 2.2.5 beschrieben. Für PER002K7, transfiziert mit der Cosmidbank-DNA pcos104, wurden rechnerisch 889 bis 2074 Transfektanden in einer Standard-Elektroporation ermittelt. Im Mittel liegt die Transfektions-effizienz folglich bei 1480 Transfektanden pro Standard-Elektroporation.

3.2.4.2 Transfektion der Cosmidbank-DNA pcosPER104 in PER002K7

Mit einer Transfektionseffizienz von 1480 Transfektanden pro Standard-Elektroporation (3.2.4.1), würden 3 durchgeführte Standard-Elektroporationen die erforderliche Anzahl der Transfektanden erzeugen, um das *Leishmania*-Genom mit einer 99 %-igen Wahrscheinlichkeit abzudecken (3.2.3.2). Hier wurden rekombinante Zellen aus sechs erfolgreich durchgeführten Standard-Elektroporationen des Isolats PER002K7 (Tab. 2.1 und 3.1), mit der Cosmidbank-DNA pcosPER104 transfiziert, vereinigt und in Aliquots zu je 1 x 10^8 Zellen eingefroren (2.2.2). Rechnerisch befinden sich 8880 unabhängige Transfektanden in der rekombinanten Population. Mit dieser Anzahl an Transfektanden ist gewährleistet, dass das vollständige *Leishmania*-Genom von der rekombinanten Population repräsentiert wird. Diese rekombinante Population wird im folgenden mit *L.br*PER002K7[pcosPER104] bezeichnet.

3.2.5 Etablierung der Cosmidbank-DNA pcos104 in *L. peruviana* LC2434, Klon 5 (LC2434K5)

Um zu überprüfen, ob die nahe verwandte Spezies *L. peruviana*, ebenso dem Komplex *L. braziliensis* angehörig, vergleichbare Sb(III)-Selektionsergebnisse erzielt, wird die Cosmidbank-DNA pcosPER104 (3.2.2) in den Akzeptor-Klon *L. peruviana* LC2434, Klon 5 (LC2434K5, Tab. 2.1) etabliert.

3.2.5.1 Ermittlung der Transfektionseffizienz für Isolat LC2434K5

Um die Repräsentativität der in die *Leishmania*-Parasiten eingebrachten Cosmidbank sicher zu stellen (3.2.3.2), wird zunächst die Transfektionseffizienz für den Stamm LC2434K5 durch eine *limiting dilution*-Analyse ermittelt (2.2.5). Rechnerisch wurden 1280 - 2560 Transfektanden in einer Standard-Elektroporation ermittelt. Im Durchschnitt liegt die Transfektionseffizienz folglich bei 1920 Transfektanden pro Standard-Elektroporation.

3.2.5.2 Transfektion der Cosmidbank-DNA pcosPER104 in LC2434K5

Mit einer Transfektionseffizienz von 1920 Transfektanden pro Standard-Elektroporation (3.2.5.1) werden drei Standard-Elektroporationen benötigt, um die erforderliche Anzahl von 4106 unabhängige Klone zu erzielen (3.2.3.2), die das *Leishmania*-Genom mit einer 99 %-igen Wahrscheinlichkeit abdecken. Hier wurden sechs Standard-Elektroporationen der Population LC2434K5

(Tab. 2.1) mit der Cosmidbank-DNA pcosPER104 transfiziert (2.2.3). Die rekombinanten Populationen wurden vereinigt und in Aliquots zu je 1 x 10^8 Zellen eingefroren (2.2.2). Es befinden sich theoretisch 11 520 unabhängige Transfektanden in dieser rekombinanten Population. Damit ist gewährleistet, dass das vollständige *Leishmania*-Genom von dieser rekombinanten Population repräsentiert wird. Die erzeugte rekombinante Population wird im folgenden mit *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] bezeichnet.

3.2.6 Selektionen S1, S2 und S3: *L.br*PER002K7[pcosPER104] *in vitro* Selektion mit Sb(III)

3.2.6.1 Verlauf der Selektionen S1, S2 und S3

Drei unabhängige Selektionen S1, S2 und S3 der Population *L.br*PER002K7[pcosPER104] (3.2.4.2) auf Antimon-resistente Promastigote (2.2.4) und der Identifizierung der selektierten Cosmide wurden durchgeführt. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

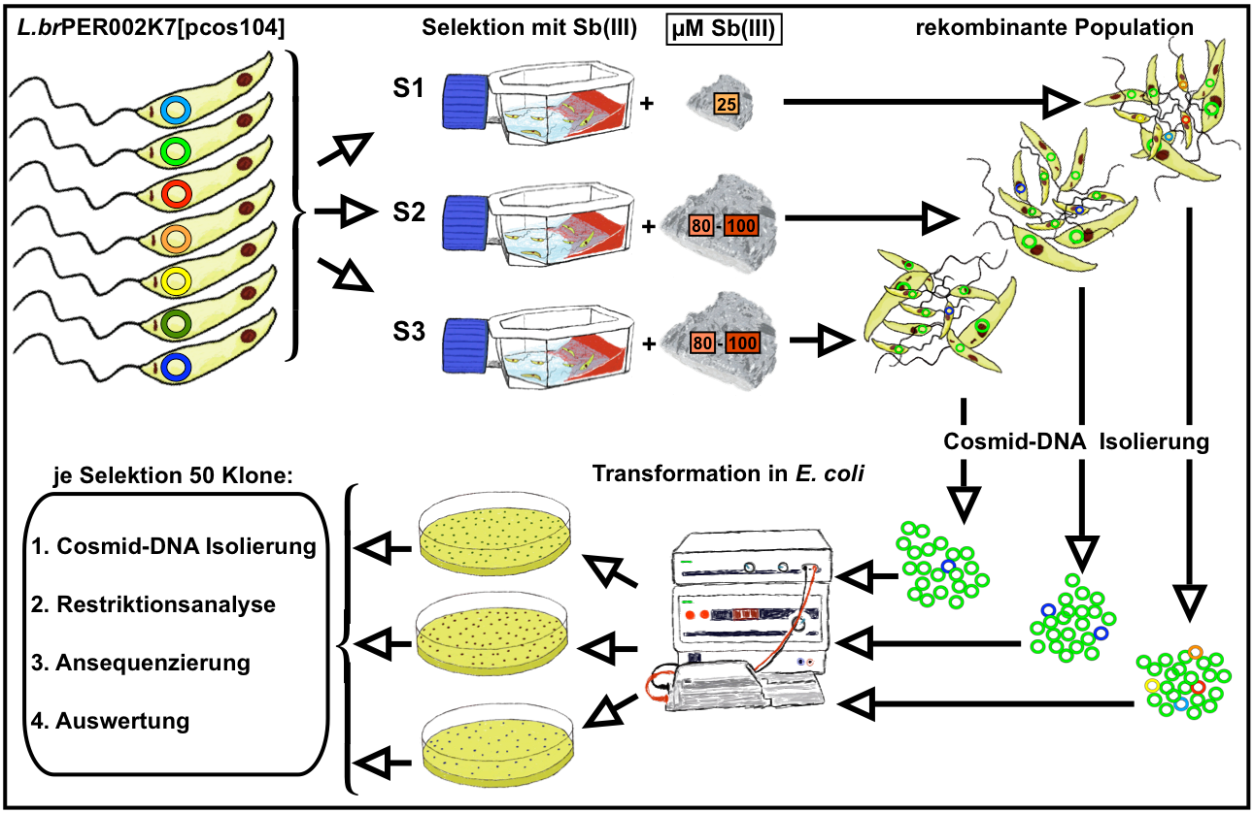

Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Selektion S1 bis S3 und der Identifizierung der Cosmide. Mit einer Cosmidbank genomischer DNA von *L. braziliensis* PER104 ($Sb(III)^R$) transfizierten Promastigoten des Isolates PER002, Klon 7 ($Sb(III)^S$), *L.br*[PER002K7pcosPER104], wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sb(III) in biphasischem Medium kultiviert. Aus den überlebenden Promastigoten wurde die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Es erfolgten Analysen von jeweils 50 *E. coli*-Klonen durch Cosmid-DNA-Minipräparationen und Restriktionsverdaue mit *Eco*RV und *Xba*I. Über den Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) wurden die Cosmidtypen identifiziert und zugeordnet. Ausgewählte Cosmide wurden für weitergehende Analysen ansequenziert.

Hier wurden rekombinante Promastigote der Genbank-Population *L.br*PER002K7[pcosPER104] in Anwesenheit hoher Sb(III)-Konzentrationen in biphasischem Medium (2.1.9) kultiviert. Durch regelmäßige mikroskopische Überwachungen wurde das Wachstum der Zellen unter Sb(III)-Selektionsdruck dokumentiert. In Abbildung 3.6 ist der Verlauf der drei Selektionen schematisch dargestellt.

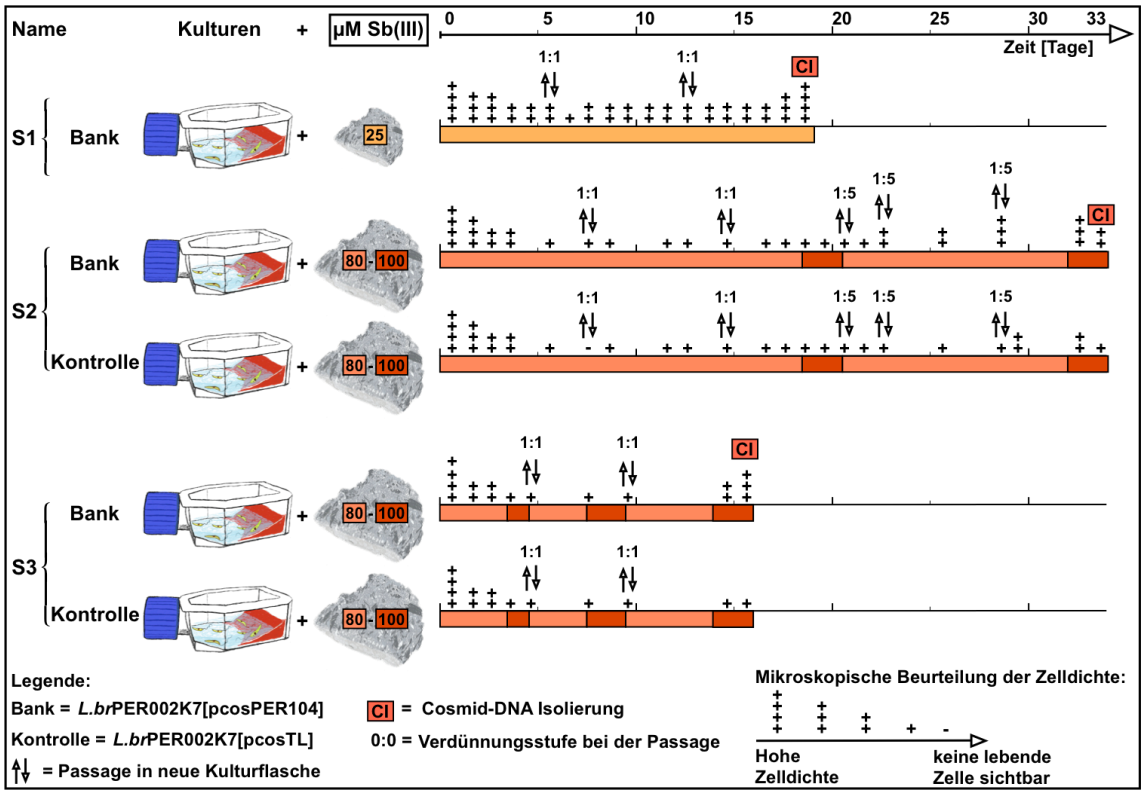

Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Verläufe der Selektionen S1, S2 und S3. Die rekombinante Population *L.br*[PER002K7pcosPER104] (Bank) und die Kontrollpopulation *L.br*[PER002K7pcosTL] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 5 x 10^7 Zellen pro 5 ml Locke's Lösung in biphasischem Medium eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Der Verlauf der jeweiligen Kulturen der Selektionen S1 - S3 ist in einem Zeitstrahl dargestellt. Die mikroskopischen Beobachtungen der Zelldichte, Mediumwechsel und Verdünnungen sind an dem entsprechenden Tag auf dem jeweiligen Zeitstrahl abgebildet. Unter dem Zeitstrahl sind die Sb(III)-Konzentrationen farbig dargestellt, die in der Kultur zu der Zeit vorlagen. Das Ende der jeweiligen Selektion ist der Tag der Probenentahmen für die Cosmid-DNA Isolierungen (CI).

Als Kontrollpopulationen der Selektionen S2 und S3 diente das Isolat PER002K7, das mit dem leeren Vektor pcosTL transfiziert war (*L.br*PER002K7[pcosTL]). Die Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Ein simultaner Mediumwechsel mit bzw. ohne simultaner Verdünnung der Zellen (Bank und Kontrolle), fand je nach Zelldichte und Zustand des Mediums, jedoch spätestens nach 7 Tagen statt. Im Zuge einer Test-Selektion erfolgte die Selektion S1 bei der niedrigsten Sb(III)-Konzentration von 25 μM ohne Kontrollpopulation. Im Verlauf der Selektionen S2 und S3 wurden die Zellen einem Selektionsdruck von 80 μM Sb(III) ausgesetzt, der zeitweise auf 100 μM Sb(III) erhöht wurde (Abb. 3.6).

Ein deutlicher Wachstumsvorteil der Genbank-Population gegenüber der Kontroll-Population wurde in Selektion S3 (ab Tag 14) zwei Tage eher beobachtet als in Selektion S2 (ab Tag 16), was möglicherweise auf den höheren Sb(III)-Selektionsdruck in S3 zurückzuführen ist (Abb. 3.6).

Die Zellen zur Isolierung der Cosmid-DNA (2.2.7.2) wurden am Tag 18 (S1), am Tag 33 (S2), bzw. am Tag 15 (S3) entnommen (Abb. 3.6). Die Kontrollpopulationen der Selektion S2 und S3 wiesen auch am jeweils letzten Tag der Selektionen kein vollständiges Absterben der Zellen auf (Abb. 3.6). Das deutet darauf hin, dass die Kontroll-Populationen unter den hier angewandten Sb(III)-Drücken möglicherweise spontane Antimon-Resistenz erlangt haben könnten.

3.2.6.2 Selektion S1, S2 und S3: Auswertung der Cosmidtypen

Die isolierte Cosmid-DNA der Selektionen S1 bis S3 wurde zur weiteren Analyse in *E. coli* transfiziert (2.2.3). Aus je 50 *E. coli*-Klonen pro Selektion wurde die Cosmid-DNA durch eine Mini-Cosmid-DNA-Präparation (2.2.7.3) isoliert. Über den durchgeführten Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP, 2.2.11.2) wurden die Cosmidtypen identifiziert und zugeordnet, wie in Abbildung 3.7 dargestellt ist.

Die Benennung der Cosmidtypen erfolgt mit pcos, für die Herkunft des Vektors pcosTL, gefolgt von C, für Cosmid, der Nummer der Selektion und einer weiteren Nummer, die der damaligen Reihenfolge der ansequenzierten Cosmide auf dem der Agarosegel entsprach. Wenn keine Sequenzierung des Cosmidtyps erfolgte, wird die Nummer des ersten Erscheinens im Agarosegel vergeben. Somit erhält das dominante Cosmid aus der Selektion S1 den Namen pcosC1.6.

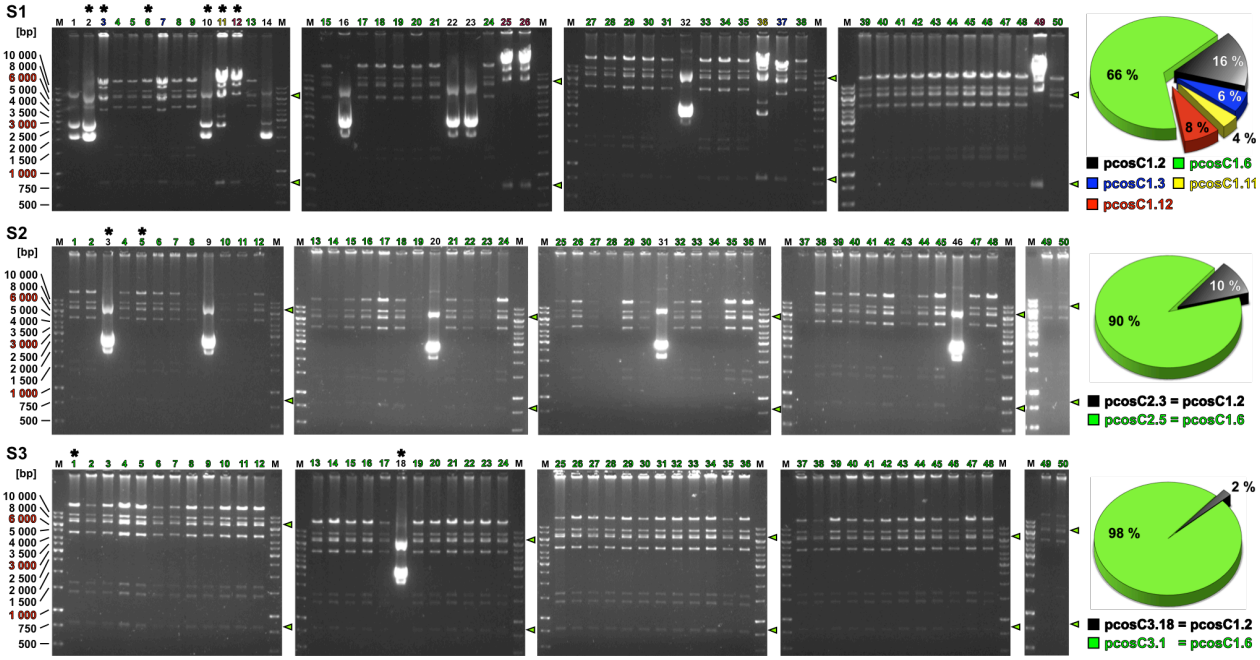

Abb. 3.7 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) der isolierten Cosmide und die relative, prozentuale Cosmidverteilung nach Selektion S1, S2 und S3. *Eco*RV/*Xba*I basierter RFLP von je 50 Cosmiden nach *in vitro*-Selektion mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sb(III) von *L.br*PER002K7[pcosPER104]. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in jeweils 1 %-ige Agarosegelen. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Als DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder* (Fermentas), dessen Fragmentgrößen am linken Bildrand angegeben sind. Die grünen Pfeile auf der rechten Seite der jeweiligen Gelbilder markieren die vektorspezifischen Banden (pcosTL). Es wurden die Cosmide ansequenziert, die oberhalb der Gelbahn mit einem Stern versehenen sind. Am rechten Bildrand sind die relativen, prozentualen Verteilungen der Cosmidtypen zu jeder Selektion als Kuchendiagramm dargestellt.

Von jedem Cosmidtyp der einzelnen Selektionen wurden exemplarisch Cosmide durch eine Cosmid-Maxipräparation (2.2.7.1) isoliert und gereinigt. Mit den DNA-Oligonukleotiden *pr*-CH-2 und *pr*-M13-R (2.1.7) wurden partielle Sequenzanalysen der Enden der *insert*-DNA durchgeführt (2.2.17). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem *L. braziliensis*-Chromosomen des *Leishmania*-Genomprojekts abgeglichen (TriTrypDB, Version 2.0, 5-Jan-2010), wodurch der integrierte Chromosomen-Abschnitt eingegrenzt werden kann. Da das *L. braziliensis*-Genom-projekt zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig abgeschlossen ist, resultieren einige dieser Lokalisationsanalysen in unrealistischen Ergebnissen. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse dieser

Analysen zusammengefasst. Eine Auflistung der identifizierten offenen Leserahmen der integrierten *insert*-DNA aller ansequenzierter Cosmide befindet sich im Anhang (Tab. 6.1).

Tabelle 3.2: Sequenzanalysen ausgewählter Cosmide der identifizierten Cosmidtypen aus S1 bis S3

Selektion	Name des Cosmids	CHR	CHR-Abschnitt	*insert*-Größe	Bemerkungen
S1	pcosC1.2	8	? - etwa 357 054	nicht bekannt	
S1	pcosC1.3	13	149 451 - 188 516	39908 bp	
S1	pcosC1.6	20	12 520 - 79 175**	39054 bp*	
S1	pcosC1.10	8	? - etwa 357 054	nicht bekannt	entspricht pcosC1.2
S1	pcosC1.11	9	271 752 - 300 097	28346 bp	
S1	pcosC1.12	22	19 169 - 53 627	34459 bp	
S2	pcosC2.3	8	? - etwa 357 054	nicht bekannt	entspricht pcosC1.2
S2	pcosC2.5	20	12520 - 79175**	39054 bp*	entspricht pcosC1.6
S3	pcosC3.1	20	12520 - 79175**	39054 bp*	entspricht pcosC1.6
S3	pcosC3.18	8	? - etwa 357 054	nicht bekannt	entspricht pcosC1.2

Legende:

CHR = Chromosom(en)
* = *Insert*-Sequenz ermittelt durch *Primer Walking*
** = Theoretische *insert*-Größen (66 656 bp) aus den Daten der *L. braziliensis*-Datenbank sind unrealistisch
? = partielle Sequenzanalyse des Endes der *insert*-DNA mit dem DNA-Oligonukleodid *pr*-CH-2 lieferte ungenaue Daten
bp = Basenpaar

Aufgelistet sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen der untersuchten Cosmide aus den Selektionen S1, S2 und S3. Zu dem jeweils untersuchten Cosmid sind folgende Angaben aufgeführt: Die Selektion, aus der das Cosmid stammt; der Name des Cosmids; das Chromosomen, auf dem die *insert*-DNA im Genom lokalisiert ist; die Region auf dem Chromosom, die von der *insert*-DNA abgedeckt wird; die Größe der *insert*-DNA; allgemeine Bemerkungen.

Es ist auffällig, dass sich das Restriktionsfragmentmuster des jeweils dominanten Cosmidtyps der Selektionen S1 bis S3 sehr ähnlich ist. Von ausgewählten Cosmiden aus S1 (pcosC1.6), S2 (pcosC2.5) und S3 (pcosC3.1) mit diesem Restriktionsfragmentmuster wurden Sequenzanalysen durchgeführt, die alle dieselben Regionen auf *L. braziliensis* Chromosom 20 repräsentieren (Tab. 3.2). Folglich handelt es sich um die gleiche *insert*-DNA und dieser Cosmidtyp wird im folgenden mit pcosC1.6 bezeichnet.

Die Sequenzanalysen des Cosmidtyps pcosC1.6 ermittelten eine mit 66 656 bp unrealistische Größe der *insert*-DNA (Tab. 3.2, TriTrypDB, Version 2), die weit über der Einschlussgrenze der Phagenpartikel liegt (3.2.2). Durch *Primer Walking* (2.2.18) und unter Nutzung der Sequenzdaten aus dem *L. braziliensis*-Genomprojekt Version 1 und 2, konnte die Sequenz der *insert*-DNA aufgeklärt werden und ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt. Tabelle 3.3 listet die auf dieser *insert*-DNA lokalisierten offenen Leserahmen mit ausgewählten Charakteristika auf. Eine Auflistung aller identifizierten offenen Leserahmen der ansequenzierten Cosmiden befindet sich im Anhang (Tab. 6.1).

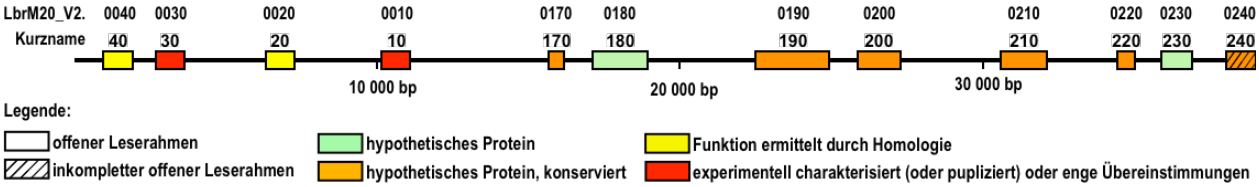

Abb. 3.8 Schematische Darstellung der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6. Schematisch abgebildet ist die Anordnung der offenen Leserahmen der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6. Sequenzaufklärung der *insert*-DNA fand durch *Primer Walking* und unter Nutzung der Sequenzdaten aus dem *L. braziliensis*-Genomprojekt Version 1 und 2 statt. Lokalisiert und identifiziert wurden die putativen offenen Leserahmen mit Hilfe der *software* MacVector 10.2 und wurden mit den Informationen aus dem *L. braziliensis*-Genomprojekt (Version 2) abgeglichen. Die Leserahmen wurden in Anlehnung an ihren aktuellen systematischen Namen (GeneDB) mit Kurznamen benannt, die in Tabelle 3.3 gegenübergestellt sind.

Tabelle 3.3: Charakteristika der offenen Leserahmen der *insert*-DNA von pcosC1.6

pcosC1.6						
Kurzname	Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
40	LbrM20_V2.0040	36,7	343	6,01	Malatdehydrogenase, putativ	
30	LbrM20_V2.0030	33,31	317	8,98	Malatdehydrogenase, putativ	
20	LbrM20_V2.0020	35,96	331	8,35	Malatdehydrogenase, putativ	
10	LbrM20_V2.0010	34,07	325	5,91	Malatdehydrogenase, putativ	
170	LbrM20_V2.0170	19,92	179	10,12	hypothetisches Protein, konserviert	
180	LbrM20_V2.0180	66,26	621	8,43	hypothetisches Protein	
190	LbrM20_V2.0190	90,73	826	7,55	hypothetisches Protein, konserviert	
200	LbrM20_V2.0200	56,07	491	4,9	hypothetisches Protein, konserviert	
210	LbrM20_V2.0210	58,04	518	4,74	hypothetisches Protein, konserviert	
220	LbrM20_V2.0220	22,77	207	4,36	hypothetisches Protein, konserviert	
230	LbrM20_V2.0230	39,07	352	9,34	hypothetisches Protein	
240	LbrM20_V2.0240	81,99	719	5,36	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

Legende:
AA = Anzahl der Aminosäuren MG = Molekulargewicht IEP = isoelektrischer Punkt
Die in der Tabelle aufgelisteten Charakteristika der jeweiligen Leserahmen der *insert*-DNA des Cosmidtyps pcosC1.6 sind aus dem *L. braziliensis*-Genomprojekt (GeneDB bzw. TriTryp Version 2) entnommen worden. Angegeben ist der Kurzname bzw. der vorläufige systematische Name der Gene. Weiterhin angegeben sind das theoretische Molekulargewicht der Peptide, die Größen der Leserahmen, der isoelektrische Punkt, das Produkt und allgemeine Bemerkungen.

In Selektion S1, (25 µM Sb(III)/18 Tage) dominiert der Cosmidtyp pcosC1.6 mit 66 % Häufigkeit, wohingegen in Selektion S2 (80 µM Sb(III) + 2 Zyklen 100 µM SB(III)/33 Tage) der Cosmidtyp pcosC1.6 mit 90 % Häufigkeit dominiert. In Selektion S3 (80 µM Sb(III) + 3 Zyklen 100 µM SB(III)/ 15 Tage) dominiert Cosmidtyp pcosC1.6 mit 98 % Häufigkeit (Abb. 3.7). Das deutet darauf hin, das eine Cosmid-basierte Überexpression von Genen auf dem Cosmidtyp pcosC1.6 das *in vitro*-Wachstum von Promastigoten unter hohen Sb(III)-Konzentrationen unterstützt.

Ein weiterer Cosmidtyp ist pcosC1.2 der, wie Cosmidtyp pcosC1.6, in allen drei Selektionen vertreten ist (Tab. 3.2, Abb. 3.7). In Selektion S1 tritt Cosmidtyp pcosC1.2 mit 16 % (pcosC1.2 und pcosC1.10), Selektion S2 mit 10 % (pcosC2.3) und in Selektion S3 mit 2 % (pcosC3.18) Häufigkeit auf (Abb. 3.7). Jede Sequenzanalyse (2.2.17) der mit dem DNA-Oligonukleotid *pr*-M13-R (2.1.7) partiell ermittelten Sequenzen der Cosmidtypen pcosC1.2 (pcosC1.2, -C1.10, -C2.3 und -C3.18), deutet auf eine genomische *insert*-DNA hin, die einer Region auf dem *L. braziliensis* Chromosom 8 entspricht (Tab. 3.2). Jeder dieser Sequenzvergleiche ermittelt zwei Abschnitte auf dem *L. braziliensis* Chromosom 8 mit 75 % bzw. 65 % Identität, die zusammen etwa 48 % der partiellen Sequenz abdecken. Untereinander durchgeführte Sequenzvergleiche aller dem DNA-Oligonukleotid *pr*-M13-R ermittelten partiellen Sequenzen weisen eine lange Kernsequenz von etwa 767 bp Länge mit annähernd 100 % Identität auf (Anhang, Abb. 6.1). Erweiterte Analysen dieser Sequenzen mit den Chromosomen der bisher sequenzierten Kinetoplastida (TriTrypDB, Version 2.0) ermitteln als beste Übereinstimmung eine Region auf dem *L. infantum* Chromosom 8 (Abschnitt 432 276 - 433 217) mit durchschnittlich 81 % Identität und einer 99 %-igen Sequenzabdeckung auf. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die gesuchte integrierte *insert*-DNA des Cosmidtyps pcosC1.2 als Sequenz im *L. braziliensis* Genomprojekt noch nicht hinterlegt wurde und es sich möglicherweise um repetitive, homologe Regionen auf dem Chromosomen 8 handelt.

Die fehlenden vektorspezifischen Banden im Restriktionsfragmentmuster der Cosmidtypen pcosC1.2 (Abb. 3.7) sind ein Hinweis darauf, dass das Vektor-Rückgrat nicht im ursprünglichen Zustand vorhanden ist. Bestätigt wurde die Vermutung durch die qualitativ schlechten Ergebnisse der Sequenzierungen, die mit dem DNA-Oligonukleotid *pr*-CH-2 erzielt wurden. Diese zeichnen sich durch eine hohe Rate an überlagerten Sequenzen aus. Die dennoch kalkulierten Sequenzen erzielen keine Sequenzübereinstimmungen mit Chromosomen der bisher sequenzierten Kinetoplastida (TriTrypDB, Version 2.0). Das Ergebnis lässt vermuten, dass alle untersuchten Cosmidtypen pcosC1.2 durch die gleichen Rekombinationsereignisse in diesem Bereich verändert wurden. Ebenso deutet das Ergebnis darauf hin, dass auch hier eine Cosmid-basierte Überexpression von Genen auf dem Cosmidtyp pcosC1.2, das *in vitro*-Wachstum von Promastigoten unter Sb(III)-Konzentrationen unterstützt, jedoch dem Wirkungsgrad des Cosmidtyps pcosC1.6 untergeordnet.

3.2.7 Selektion S4: *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] *in vitro* Selektion mit Sb(III)

3.2.7.1 Verlauf der Selektion S4

In Selektion S4 wurde die Population *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] (3.2.5) auf Antimon-resistente Promastigote (2.2.4) selektiert und es wurde eine Identifizierung der selektierten Cosmide durchgeführt. Der Hauptunterschied zur Selektion S1 bis 3 besteht darin, dass die Cosmidbank-DNA pcosPER104 (3.2.2) nicht in der Spezies *L. braziliensis*, sondern in der nahe verwandten Spezies *L. peruviana* auf Sb(III)-Resistenzmarker hin untersucht wird. Beide Spezies gehören dem *L. braziliensis*-Komplex an (Tab. 2.1). Der schematische Ablauf dieser Selektion ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

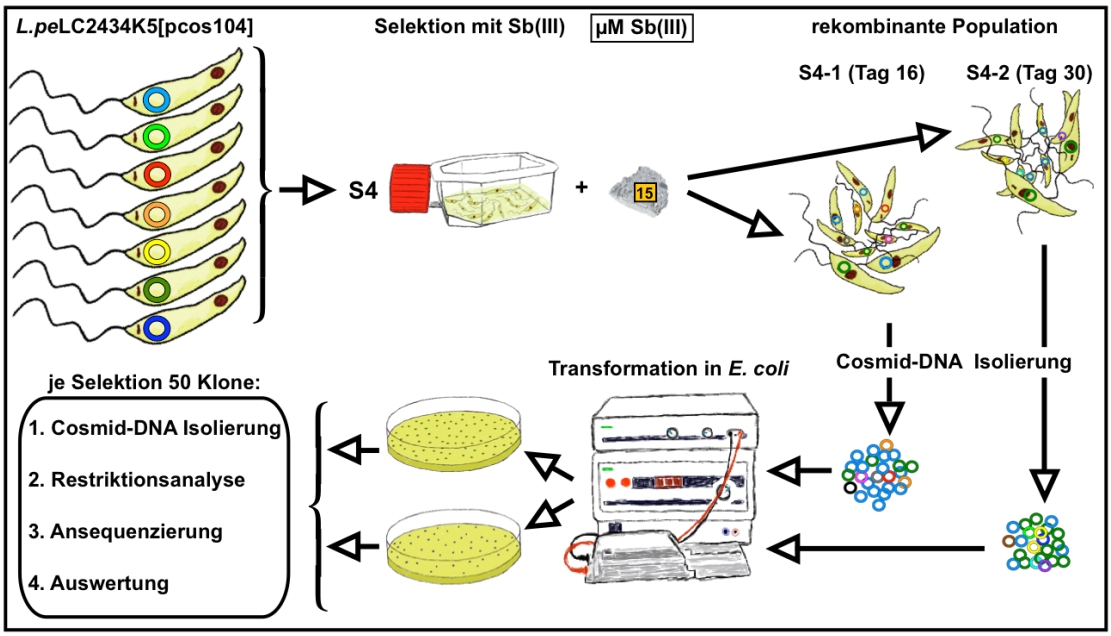

Abb. 3.9 Schematische Darstellung der Selektion S4 und der Identifizierung der Cosmide. Mit Cosmidbank-DNA pcosPER104 transfizierten Promastigoten des Isolats *L. peruviana* LC2434, Klon 5, *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] wurden mit 15 µM Sb(III) im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider‘s *Insect Medium)* kultiviert. Am Tag 15 (S4-1) und Tag 30 (S4-2) wurden aus den überlebenden Promastigoten die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Die Cosmid-DNA aus je 50 *E. coli*-Klonen wurde durch *Eco*RV und *Xba*I basierte RFLP-Analysen identifiziert und Cosmidtypen zugeordnet. Ausgewählte Cosmide wurden für weiterführende Analysen ansequenziert.

Die rekombinanten Promastigoten *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] (Bank, 3.4) wurden mit 15 µM Sb(III) im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider‘s *Insect Medium*; 2.1.9) kultiviert. Als Kontrolle diente der Stamm *L. peruviana* LC2434, der mit dem leeren Vektor pcosTL transfiziert war (*L.pe*LC2434[pcosTL]). Beide Populationen (Bank und Kontrolle) wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Regelmäßige mikroskopische Überwachungen und Bestimmungen der Zelldichten (2.2.1) wurden durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Verlaufs dieser Selektion ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

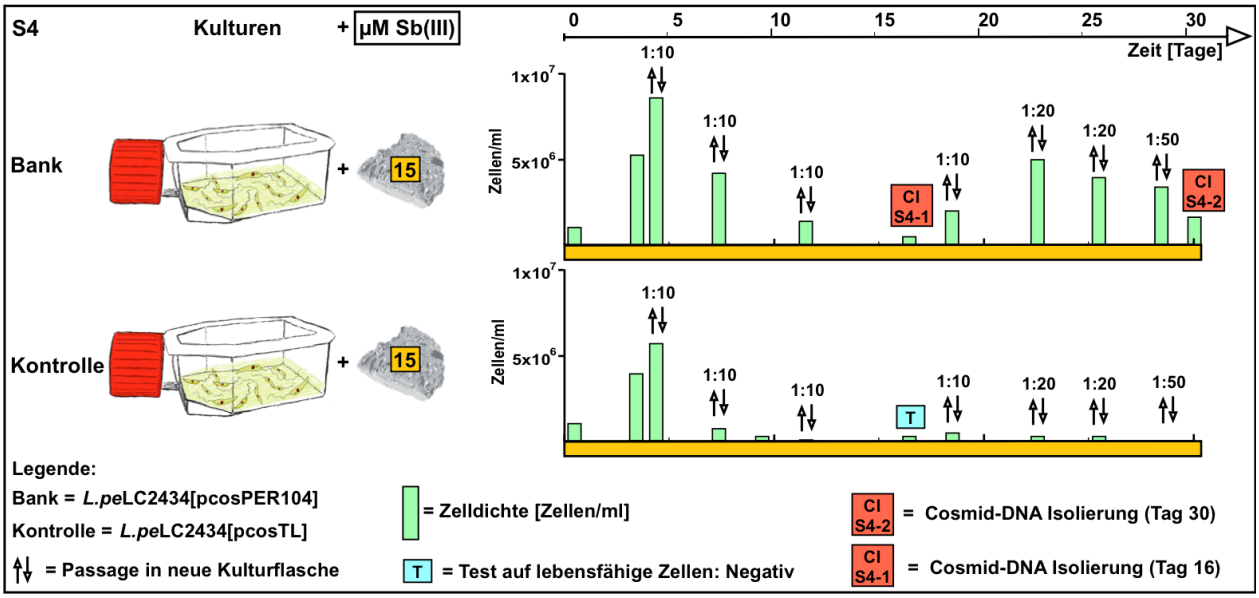

Abb. 3.10 Schematische Darstellung des Verlaufs der Selektion S4. Die Population *L.pe*LC2434K5[pcosPER104] und die Kontrollpopulation *L.pe*[LC2434K5pcosTL] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen in 10 ml S10/2 (modifiziertes Schneider's *insect Medium*) eingesät und mit 15 µM Sb(III) inkubiert. Der Verlauf der jeweiligen Kulturen ist in einem Zeitstrahl dargestellt. Die Passagen und Verdünnungen sind an dem entsprechenden Tag eingezeichnet. Die Zelldichten wurden unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt und sind auf dem Zeitstrahl als Balkendiagramm dargestellt. Unter dem jeweiligen Zeitstrahl ist die in der Kultur vorliegende Antimon(III)-Konzentrationen farbig abgebildet. Am Tag 16 (S4-1) und Tag 30 (S4-2) fand jeweils eine Probeentnahme zur Cosmid-DNA Isolierung statt. Ein Test (T) auf lebensfähige Zellen am Tag 16 in der Kontrollpopulation war negativ.

Simultane Verdünnungen der Zellen (Bank und Kontrolle) erfolgten, nachdem die Genbank-Population in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten war. Die erste Probeentnahme aus der Genbank-Population zur Isolierung der Cosmid-DNA (2.2.7.2) fand am Tag 16 (S4-1) statt, nachdem in der Kontroll-Population mikroskopisch keine lebenden Zellen ausgemacht werden konnten. Die simultan entnommene Probe der Kontroll-Population wurde als Viabilitätstest ohne Selektionsdruck kultiviert und war negativ. Das deutet darauf hin, das etwa ab Tag 16 nur Zellen mit zusätzlicher *L. braziliensis*-DNA überlebt haben.

Nach einer weiteren Periode der *in vitro*-Kultivierung unter Sb(III)-Selektionsdruck wurden am Tag 30 die überlebenden Zellen der Genbank-Population für eine Cosmid-DNA Isolierung (2.2.7.2) eingesetzt (S4-2).

3.2.7.2 Selektion S4 (S4-1 und S4-2): Auswertung der Cosmidtypen

Die isolierten Cosmide aus S4-1 (Tag 16) und S4-2 (Tag 30) konnten mittels der Analyse des RFLP (2.2.11.2) von jeweils 50 untersuchten *E. coli*-Klonen Cosmidtypen zugeordnet werden, wie in Abbildung 3.11 dargestellt ist.

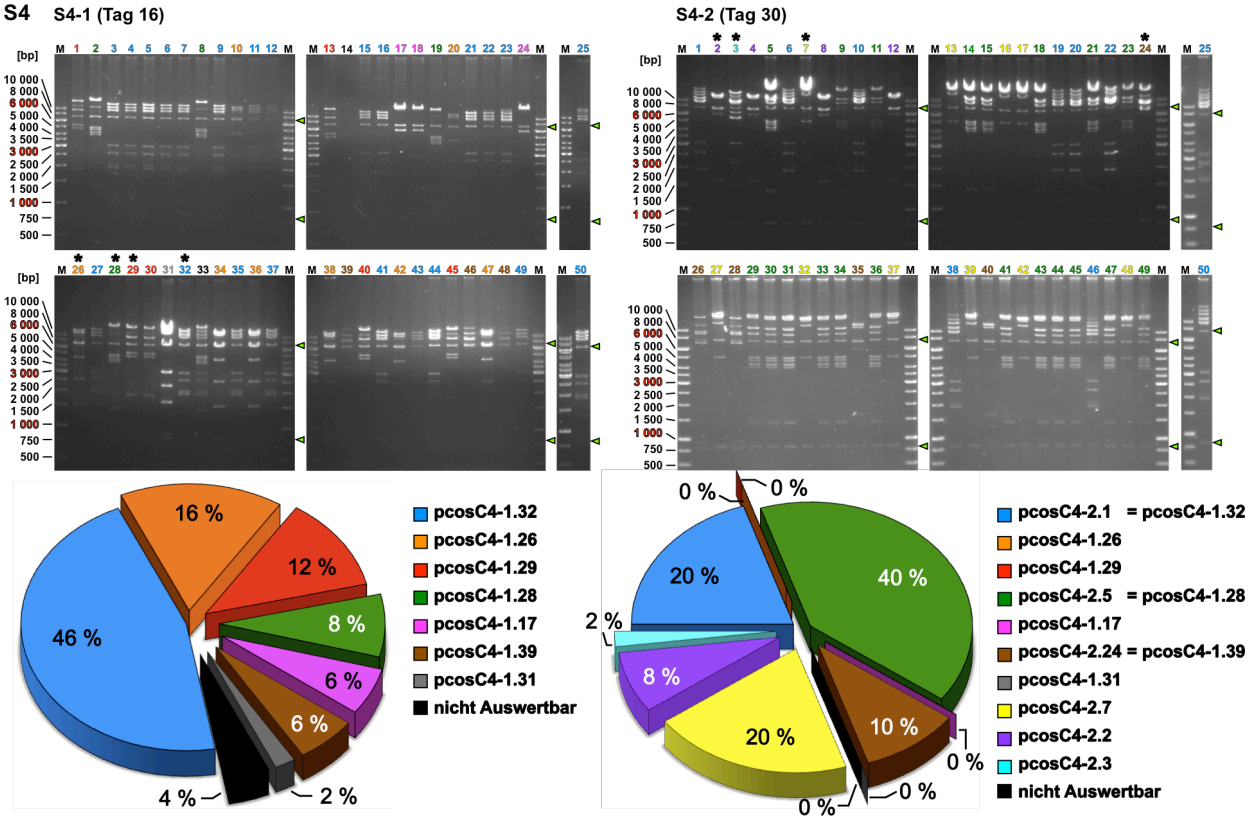

Abb. 3.11 RFLP der isolierten Cosmide und die relative, prozentuale Cosmidverteilung nach Selektion S4. *Eco*RV/*Xba*I-RFLP von je 50 Cosmiden nach *in-vitro*-Selektion mit 15 µM Sb(III) von *L.pe*LC2434[pcosPER104] der Zeitpunkte Tag 16 (S4-1) und Tag 30 (S4-2). Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in je 1 %-ige Agarosegele. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Als DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder*, dessen Fragmentgrößen am linken Bildrand angegeben sind. Die grünen Pfeile auf der rechten Seite der Gelbilder markieren die vektorspezifischen Banden. Die ansequenzierten Cosmide sind in den Gelbildern mit einem Stern gekennzeichnet. Als Kuchendiagramm sind die relativen, prozentualen Verteilungen der Cosmidtypen am Tag 16 und Tag 30 dargestellt.

Restriktionsfragment-Analysen aus Abbildung 3.11 lassen vermuten, dass das Cosmid pcosC4-1.33 die Restriktionsfragmentmuster der Cosmide pcosC4-1.28 und -C4-1.32 vereint. Durch eine erneute Transformation der Cosmid-DNA von pcosC4-1.33 in *E. coli* mit anschließender Restriktionsanalyse von mehreren *E. coli*-Klonen, konnten ausschließlich separate Restriktionsfragmentmuster der Cosmidtypen pcosC4-1.28 und pcosC4-1.32-ähnliche nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei Cosmid pcosC4-1.33 um ein Gemisch von mindestens zwei Cosmidtypen und wurde daher keinem Cosmidtyp zugeordnet.

Ausgewählte Cosmide wurden partiell sequenziert. Durch Lokalisationsbestimmungen dieser Sequenzdaten auf den *Leishmania*-Chomosomen (TriTrypDB, Version 2.0) wurden die integrierten Chromosomen-Abschnitte der Cosmide eingegrenzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Eine Auflistung der identifizierten offenen Leserahmen der integrierten *insert*-DNA aller ansequenzierten Cosmide befindet sich im Anhang (Tab. 6.1).

Tabelle 3.4: Sequenzanalysen ausgewählter Cosmide aus S4-1/2

Selektion	Name des Cosmids	CHR	CHR-Abschnitt	*insert*-Größe	Bemerkungen
S4-1	pcosC4-1.26	27	849 987 - 905 988**	56 002 bp	*insert*-Größe unrealistisch
S4-1	pcosC4-1.28	20	83 602 - 8 619**	39 157 bp*	pcosC1.6-Homolog
S4-1	pcosC4-1.29	31	1 193 482 - 1 234 876	41 395 bp	
S4-1	pcosC4-1.32	20/13	? - 219 185 (CHR 20) ? - 495 464 (CHR 13)	?	*pr*-CH-2: Region auf CHR 20 *pr*-M13-R: Region auf CHR 13
S4-2	pcosC4-2.2	30	92 285 - 161 164**	68 880 bp	*insert*-Größe unrealistisch
S4-2	pcosC4-2.3	31	802 962 - 857 019**	54 058 bp	*insert*-Größe unrealistisch
S4-2	pcosC4-2.7	8	120 414 - 168 780	48 367 bp	
S4-2	pcosC4-2.24	32	167 758 - 205 926	38 169 bp	

Legende:

CHR	=	Chromosom(en)
*	=	*insert*-Sequenz ermittelt durch *Primer Walking*
**	=	Theoretische *Insert*-Größe aus den Daten der *L. braziliensis*-Datenbank, Version 2.0, ist unrealistisch
pr-CH-2	=	DNA-Oligonukleotid, mit dem partielle Sequenzanalysen durchgeführt wurden (2.2.17)
pr-M13-R	=	DNA-Oligonukleotid, mit dem partielle Sequenzanalysen durchgeführt wurden (2.2.17)
?	=	*insert*-Sequenz mit den Daten aus der *L. braziliensis*-Datenbank, Version 2.0, nicht ermittelbar
bp	=	Basenpaar

Aufgelistet sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen der untersuchten Cosmide aus den Selektionen S4-1 und S4-2. Zu dem jeweils untersuchten Cosmid sind folgende Angaben aufgeführt: Die Selektion, aus der das Cosmid stammt; der Name des Cosmids; das Chromosomen, auf dem die *insert*-DNA im Genom lokalisiert ist; die Region auf dem Chromosom, die von der *insert*-DNA abgedeckt wird; die Größe der *insert*-DNA; allgemeine Bemerkungen.

Aus diesen Sequenzanalysen geht hervor, dass das Cosmid pcosC4-1.28 der Selektion S4-1 (Tag 16, 8 % Häufigkeit) ein Homolog zu dem dominanten Cosmid pcosC1.6 aus Selektion S1, S2 und S3 ist.

Zur Verifizierung identischer Cosmidtypen der Zeitpunkte S4-1 und S4-2 untereinander, wurden exemplarisch Cosmide mit den Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Xba*I behandelt. Um eine hohe Auflösung der aufzutrennenden Fragmente zu erzielen, wurde die Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE; 2.2.15) angewandt, die in Abbildung 3.12 zu sehen ist. Es konnten drei Cosmidtypen identifiziert werden, die zu beiden Zeitpunkten der Selektion S4 vorkommen. Tabelle 3.5 fasst diese Cosmide und Cosmidtypen zusammen.

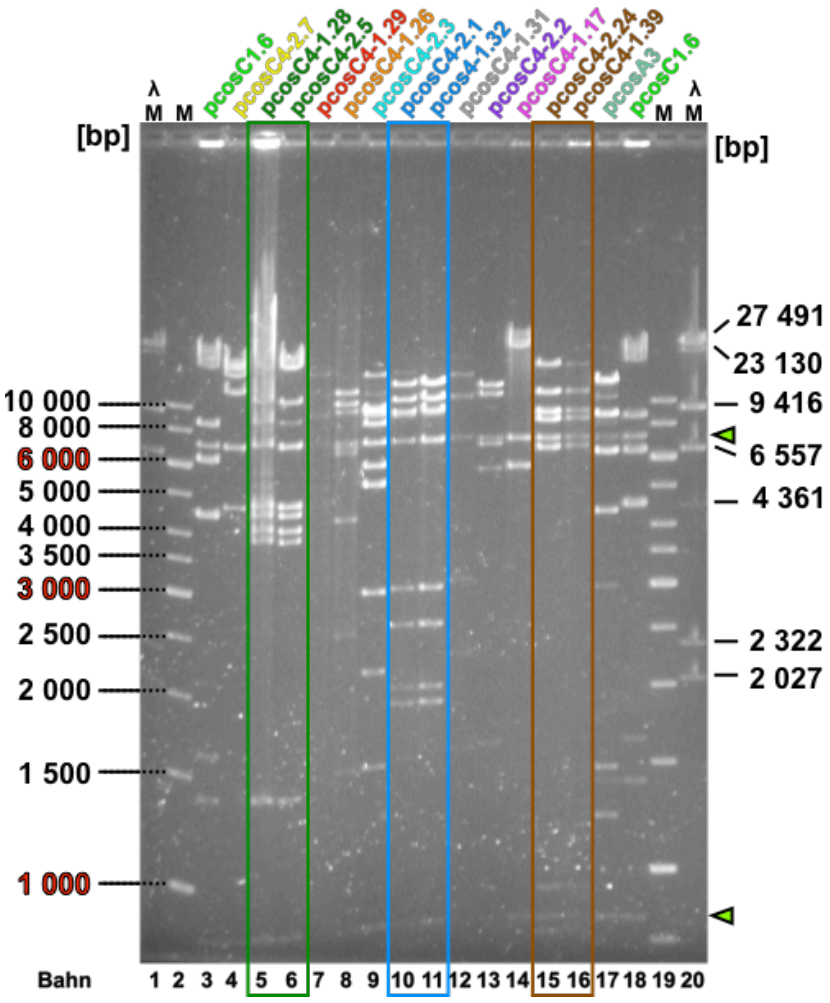

Abb. 3.12: RFLP ausgewählter Cosmide der Selektion S4-1 und S4-2. *Eco*RV/*Xba*I-RFLP von ausgewählten Cosmiden der Selektion S4 zum Vergleich der Cosmidtypen der Zeitpunkte Tag 16 (S4-1) und Tag 30 (S4-2). Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 %-igem Agarosegel, mittels Feldinversions-Gelelekrophorese (FIGE) aufgetrennt. Die DNA wurde durch nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Bahn 1 und 20 wurden mit dem DNA-Längenstandard (λM) Lambda DNA/*Hind*III Marker beladen, dessen Fragmentgrößen rechts im Bild angezeigt sind. Die Bahnen 2 und 19 wurden mit dem DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder* deren Fragmentgrößen am linken Bildrand angegeben sind. Die grünen Pfeile auf der rechten Seite der Gelbilder markieren die vektorspezifischen Banden. Als Referenz wurde das mit *Eco*RV/*Xba*I-verdaute Cosmid pcosC1.6 aufgetragen sowie das Cosmid pcosA3 (homolog zu pcosC1.6, Diplomarbeit L. Trübe, Universität Rostock).

Tabelle 3.5: Zu beiden Zeitpunkten der S4 (S4-1/2; Tag 16/30) vorkommende Cosmidtypen

identische Restriktionsfragmentmuster zu Zeitpunkt S4-1 und S4-2 der untersuchten Cosmide aus Abb. 3.12			Name des Cosmidtyps	Vergleich der Restriktionsmuster aus Abb. 3.12
Tag 16 (S4-1)	entspricht	Tag 30 (S4-2)		
pcosC4-1.28	=	pcosC4-2.5	**pcosC4-1.28**	Bahn 5 und 6
pcosC4-1.32	=	pcosC4-2.1	**pcosC4-1.32**	Bahn 10 und 11
pcosC4-1.39	=	**pcosC4-2.24**	**pcosC4-2.24**	Bahn 15 und 16

Gegenüberstellung der anhand des Restriktionsfragmentmusters identifizierten identischen Cosmide zwischen den Zeitpunkten S4-1 und S4-2 mit zugehöriger Namenvergabe der Cosmidtypen.

Mit dem Restriktionsfragmentmuster-Vergleich aus Abbildung 3.12 konnte gezeigt werden, dass das Cosmid pcosC4-1.28 (pcosC1.6-Homolog) aus S4-1 (Tag 16, 8 % Häufigkeit) dem dominanten Cosmid pcosC4-2.5 der S4-2 (Tag 30, 40 % Häufigkeit) entspricht. Der Cosmidtyp wird im folgenden als pcosC4-1.28 bezeichnet (Tab. 3.5).

Somit konnten in zwei unterschiedlichen Sb(III)-Selektionssystemen auf der Basis von zwei *Leishmania*-Spezies mit der gleichen Cosmidbank-DNA dominante Cosmide identifiziert werden,

die einen gemeinsamen genomischen DNA-Bereich auf dem *L. braziliensis* Chromosom 20 aufweisen. In Kapitel 3.3 wird auf den gemeinsamen DNA-Bereich dieser Cosmide eingegangen.

Umgekehrt zu Cosmidtyp pcosC4-1.28 verhält sich das Auftreten des Cosmidtyps pcosC4-1.32. Dieser dominiert mit 46 % Häufigkeit in S4-1 (Tag 16), während er in S4-2 (Tag 30) an Dominanz verliert (20 % Häufigkeit). Das deutet darauf hin, das unter dem vorliegenden Sb(III)-Selektionsdruck die Cosmid-basierte Überexpression von Genen auf dem Cosmidtyp pcosC4-1.32 das *in vitro*-Wachstum von Promastigoten zunächst fördert, während langfristig der Cosmidtyp pcosC4-1.28 (pcosC1.6-Homolog) den Promastigoten einen Vorteil im *in vitro*-Wachstum vermittelt.

Der ebenfalls zu beiden Zeitpunkten nachgewiesene Cosmidtyp pcosC4-2.24 mit 6 % (S4-1) und 10 % (S4-2) Häufigkeit, spielt in Bezug auf die Sb(III)-Resistenzvermittlung von Promastigoten eine untergeordnete Rolle (Abb. 3.11).

Ein weiterer Cosmidtyp ist pcosC4-2.7, der mit 20 % Häufigkeit in S4-2 (Tag 30) vertreten ist. Sequenzanalysen (2.2.17, TriTrypDB, Version 2) ermitteln, dass die integrierte *insert*-DNA einer Region auf dem Chromosomen 8 von *L. braziliensis* entspricht (Tab. 3.4). Innerhalb dieser Region befindet sich der offene Leserahmen LbrM08_V2.0390, der ein homolog zu dem Miltefosin- und Antimon(III)-Resistenz vermittelnden *L. infantum*-Gen LinJ08_V3.0630 [78] ist. In Abbildung 3.13 (B) ist die ermittelte *insert*-DNA mit den identifizierten offenen Leserahmen des Cosmids pcosC4-2.7 schematisch dargestellt (2.2.17, TriTrypDB, Version 2.0). Abbildung 3.13 (A) zeigt einen Vergleich der Genom-Kontexte von *L. braziliensis, L. major* und *L. infantum* im Chromosomen-Abschnitt (modifiziert nach TriTrypDB, Version 2.0). Diese Vergleiche machen deutlich, dass sich anhand der derzeitigen Sequenzdaten der offene Leserahmen LbrM08_V2.0390 mit Bereichen untranslatierter Regionen zwischen den offenen Leserahmen LbrM08_V2.0370 und -90 befindet, die im *L. major*- und *L. infantum*-Genom einen zusammenhängenden Leserahmen darstellen (Abb. 3.13, A). Das LbrM08_V2.0390-Homolog im *L. major*- und *L. infantum*-Genom befindet sich an anderer Stelle auf dem Chromosom 8. Restriktionsfragment-Analysen zeigen auf, dass das erwartete 3955 bp-Fragment, welches sich theoretisch aus zwei im Leserahmen von LbrM08_V2.0390 enthaltenen *Eco*RV-Restriktonsschnittstellen ergibt, als DNA-Fragment nach dem Verdau nicht in Erscheinung tritt (Abb. 3.12 und 3.13, C). Das deutet darauf hin, dass die Daten aus dem *L. braziliensis*-Genom in diesem Abschnitt nicht korrekt sind und sich möglicherweise der offene Leserahmen LbrM08_V2.0390 nicht, wie vorhergesagt, in dieser Region befindet.

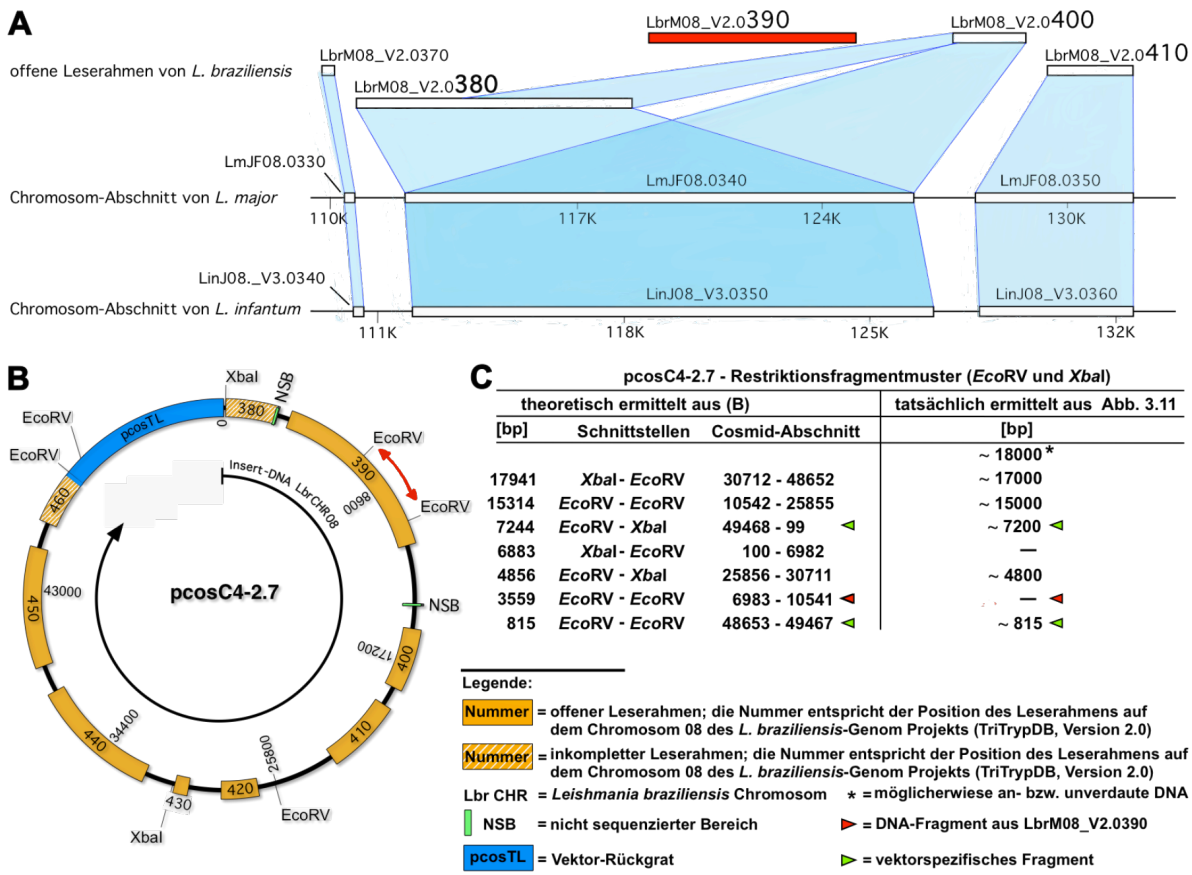

Abb. 3.13 Analysen zum Cosmid pcosC4-2.7. (A) Der genomische Kontext der *insert*-DNA von pcosC4-2.7 in dem Bereich des offenen Leserahmens LbrM08_V2.0390 zu dem Genom von *L. major* und *L. infantum* ist abgebildet. Die Synthenien der Leserahmen zwischen den *Leishmania*-Spezies sind hellblau unterlegt (modifiziert nach TriTrypDB, Version 2.0). (B) Cosmid pcosC4-2.7 ist mit *Eco*RV- und *Xba*I-Restriktionsschnittstellen nach einem theoretischen Verdau mit dem Programm MacVector dargestellt. Der rote Doppelpfeil deutet auf die Region im offenen Leserahmen LbrM08_V2.0390 hin, aus der das erwartete Fragment entsteht. (C) Gegenüberstellung der theoretisch (B) und tatsächlich (Abb. 3.12, Bahn 3) ermittelten DNA-Fragmente.

3.2.7.3 Selektion S4 (S4-1 und S4-2): Auswertung der Cosmidtypen der Wachstumskontrolle

Um den Selektionserfolg zu überprüfen wurde die Cosmid-Verteilung von rekombinanten *L.pe*LC2434[pcosPER104], die über den gesamten Zeitraum der Selektion im Medium S10/2 (2.1.9) mit G418 kultiviert wurden, ebenfalls zu den Zeitpunkten S4-1 und -2 untersucht. Dies soll Cosmide identifizieren, die rein *in vitro* Wachstums-Vorteile vermitteln. Dazu wurde die Cosmid-DNA der Wachstumskontrolle von *L.pe*LC2434[pcosPER104] am Tag 16 und Tag 30 isoliert. Nach der Transformation der Cosmid-DNA in *E. coli* (2.2.13) wurden aus 24 (Tag 16) bzw. 50 (Tag 30) Bakterienklonen Mini-Cosmid-DNA-Präparationen (2.2.7.3) durchgeführt. Anhand von RFLP-Analysen (2.2.11.2) wurden die Cosmidtypen identifiziert (Abb. 3.14).

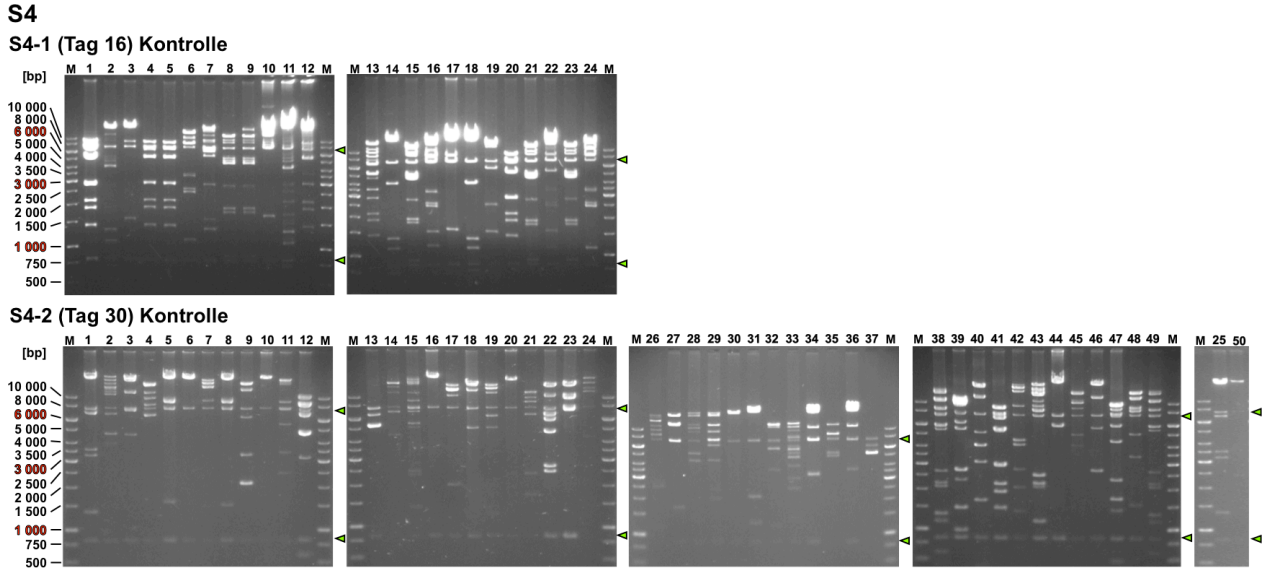

Abb. 3.14 RFLP der isolierten Cosmide aus *L.pe*LC2434[pcosPER104] nach *in vitro*-Kultivierung. *Eco*RV/*Xba*I-RFLP von 24 und 50 Cosmiden nach *in-vitro*-Selektion mit 15 µM Sb(III) von *L.pe*LC2434[pcosPER104] der Zeitpunkte S4-1 (Tag 16) und S4-2 (Tag 30). Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in je 1 %-ige Agarosegele. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Als DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder*, dessen Fragmentgrößen am linken Bildrand angegeben sind. Die grünen Pfeile auf der rechten Seite der Gelbilder markieren die vektorspezifischen Banden.

Die identifizierten Cosmidtypen der *in vitro*-Kultur *L.pe*LC2434[pcosPER104] der Zeitpunkte S4-1 und -2 (Abb. 3.14) sind nicht identisch zu den aus der Sb(III)-Selektion identifizierten Cosmidtypen. Es kommt jedoch auch hier zu gehäuftem Auftretens einzelner Cosmidtypen. Das bestätigt, dass schon in der normalem *in vitro*-Kultur auf Zellen mit bestimmten Cosmidtypen selektiert wird, die möglicherweise ein Vorteil im *in vitro*-Wachstum vermitteln.

3.3 Analysen zum Cosmidtyp pcosC1.6 und seine Homologa

3.3.1 Vergleiche der pcosC1.6-Homologa

Aus zwei unterschiedlichen *in vitro*-Sb(III)-Selektionssystemen (3.2.6 und 3.2.7) wurden die homologen Cosmidtypen pcosC1.6 und -C4-1.28 als jeweils dominanter Cosmidtyp in den überlebenden Parasiten-Populationen identifiziert. Die dabei verwendete Cosmidbank-DNA pcosPER104 stammt aus dem Sb(III)-resistenten Feldisolat PER104 (3.1).

In einem dritten *in vitro*-Sb(III)-Selektionssystem wurde die aus dem Sb(III)-sensitiven Feldisolat PER002 (3.1) stammende Cosmidbank-DNA pcosPER002 verwendet. Aus der rekombinanten Population *L.br*PER002K7[pcosPER002] konnten in zwei aufeinanderfolgenden Sb(III)-Selektionsschritten ein dominanter Cosmidtyp, pcosA3, ausgemacht werden, der ebenfalls ein pcosC1.6-Homolog ist (Diplomarbeit L. Trübe, Universität Rostock, 2009).

Da *in vitro*-Sb(III)-*screens* mit zwei Cosmidbanken, die aus unterschiedlichen Feldisolaten stammen (pcosPER104, $Sb(III)^R$ und pcosPER002, $Sb(III)^S$), dominante Cosmidtypen hervorbringen, die homolog zueinander sind, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den identifizierten Genomabschiten um Stamm-spezifische Resistenzmarker handelt. Vermutlich handelt es sich bei allen drei ermittelten dominanten Cosmidtypen (pcosC1.6, -C4.1.28 und -A3) um einen Gendosiseffekt. Der Überlappungsbereich der isolierten Cosmide, eine

Region auf dem *L. braziliensis* Chromosom 20, umfasst acht vollständige offene Leserahmen und ist in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

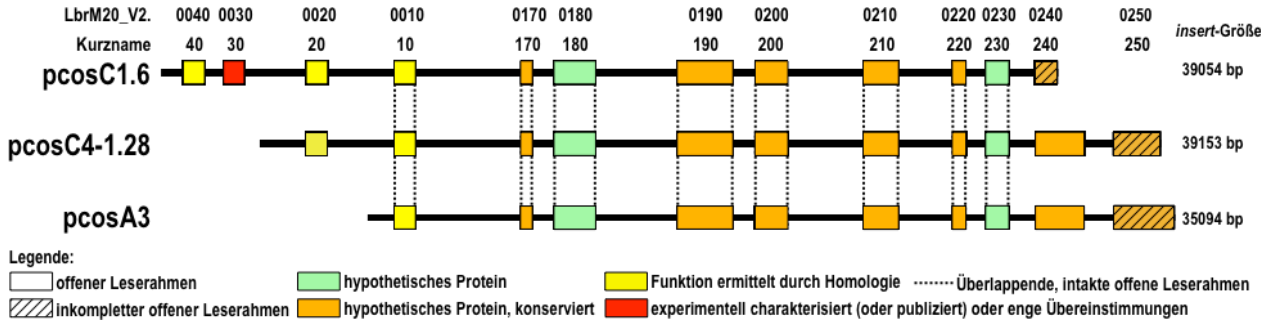

Abb. 3.15 Überlappungen offener Leserahmen der homologen Cosmidtypen pcosC1.6, -C4-1.28 und -A3. Abgebildet sind die *insert*-DNA Bereiche der drei homologen Cosmidtypen pcosC1.6, -C4-1.28 und -A3. Alle drei Cosmidtypen wurden unabhängig voneinander mittels *in vitro*-Sb(III)-*screens* in der überlebenden Parasiten-Population als jeweils dominanter Cosmidtyp ausgemacht. Dabei wurde Cosmidtyp pcosC1.6 aus der Population *L.br*PER002K7[pcosPER104], Cosmidtyp pcosC4-1.28 aus der *L.pe*LC2434[pcosPER104] und Cosmidtyp pcosA3 aus der Population *L.br*PER002K7[pcosPER002] identifiziert. Durch Teilsequenzierung von den Enden der *insert*-DNA dieser Cosmide, Abgleich mit dem *L. braziliensis*-Genomprojekt (TriTrypDB, Version 2.0) sowie ergänzende Sequenzinformationen durch *Primer Walking*-Sequenzierung des Cosmids pcosC1.6 ergibt sich das dargestellte Überlappungsmuster. Die Produkte der überlappenden offenen Leserahmen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

3.3.2 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosC1.6 in *L. braziliensis*

Zur Überprüfung und Quantifizierung der Antimon(III)-Resistenzvermittlung des Cosmidtyps pcosC1.6 wurde das Cosmid pcosC1.6 und als Kontrolle der leere Vektor pcosTL separat in den *in vitro*-Sb(III)-sensitiven Klon PER002K7 transfiziert (2.2.3). Resultierende rekombinante Promastigote wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen eingesät. Die Zelldichten wurden nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bestimmt (2.2.1). Die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen sind als Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.16 zusammengefasst.

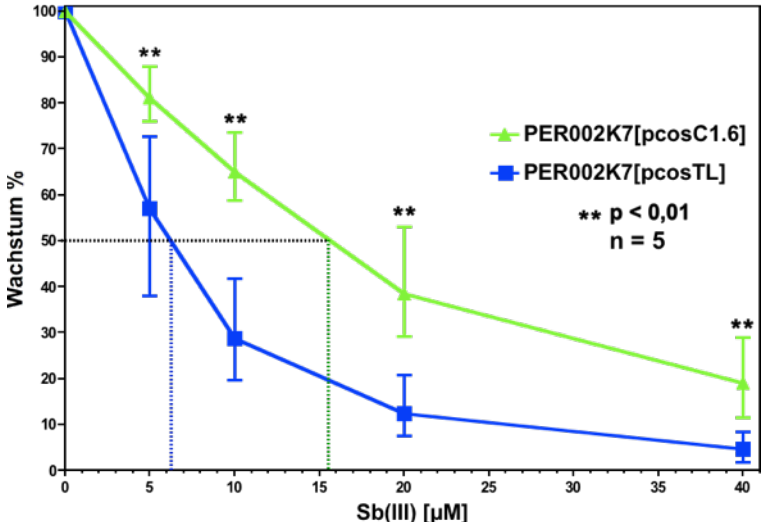

Abb. 3.16 Effekt von Sb(III) auf die Vermehrung von PER002K7[pcosTL] und PER002K7[pcosC1.6]. PER002K7[pcosTL] und PER002K7[pcosC1.6] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider's *Insect Medium*) eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zell-dichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus fünf unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungs-bereich an. Die mit Sternen gekenn-zeichneten p-Werte wurden mit dem *Mann-Whitney U Test* ermittelt. Mit den gestrichelten Linien sind die jeweiligen IC_{50}-Werte für Sb(III) angedeutet.

Wie in Abbildung 3.16 zu sehen ist, besitzt PER002K7[pcosC1.6] einen etwa 2,5-fach höheren IC_{50}-Wert (bei 15,8 µM) für Sb(III) als die Kontrolle PER002K7[pcosTL] (bei 6,2 µM). Damit konnte gezeigt werden, dass das Cosmid pcosC1.6 den promastigoten Parasiten *L. braziliensis* PER002K7 unter Sb(III)-Einwirkung einen *in vitro*-Wachstumsvorteil vermittelt.

3.4 Vom Cosmid zum Gen: Identifizierung des Sb(III)-Resistenz vermittelnden Gens

3.4.1 Verkleinerung von pcosC1.6 durch verschiedene Klonierungsstrategien

Um den offenen Leserahmen mit seinen flankierenden Sequenzen zu identifizieren, der für die Vermittlung der *in vitro*-Sb(III)-Resistenz verantwortlich ist, wurden verkleinerte Cosmid-Konstrukte auf der Basis von pcosC1.6 hergestellt, die Teilbereiche der integrierten *insert*-DNA repräsentieren. Durch eine anschließende kompetitive Sb(III)-Selektion bzw. Bestimmungen der IC_{50}-Werte für Sb(III) sollte der kleinste Resistenz-vermittelnde Genbereich eingegrenzt werden.

3.4.1.1 Klonierung von pcosC1.6-Deletionskonstrukten

Sechs unterschiedliche Regionen der integrierten *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6 wurden durch natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen entfernt, wie in Abbildung 3.17 schematisch dargestellt ist. Diese Deletionen führten zu verkürzten Konstrukten und wurden mit pcosD1, -D2, -D3, -D4, -D5 und -D6 (D = Deletionskonstrukt) benannt.

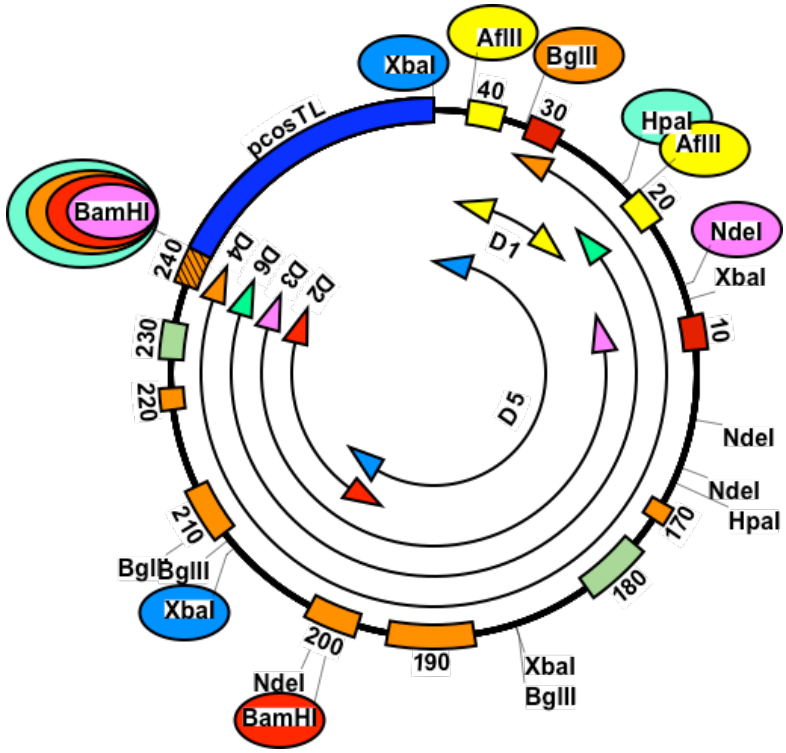

Abb. 3.17 Deletionen von Sequenzabschnitten aus pcosC1.6 zur Herstellung der Konstrukte pcosD1 bis -D6. Durch natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen wurden Sequenzbereiche der integrierten *insert*-DNA von pcosC1.6 entfernt. Die jeweils entfernten Sequenzabschnitte sind mit einem Doppelpfeil gekennzeichnet und mit D1 bis D6 benannt. Aus den resultierenden Fragmenten wurden die Vektor-tragenden Fragmente mittels AGE isoliert und gereinigt. Eine jeweilige Ligiation dieser Fragmente mit sich selbst führte zu den Deletionskonstrukten pcosD1 bis -D6. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Afl*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Hpa*I, *Nde*I und *Xba*I in pcosC1.6 sind gekennzeichnet. Das Vektor-Rückgrat (pcosTL) ist als blauer Kasten dargestellt. Die offenen Leserahmen der *insert*-DNA wurden mit ihren Kurznamen benannt (vergleiche Tabelle 3.3 bzw. Abbildung 3.15).

Aus Abbildung 3.17 wird deutlich, dass die Deletion eines Sequenzabschnitts der *insert*-DNA von pcosC1.6 durch die Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *Afl*I zu Konstrukt pcosD1 führte. Nach einer anschließenden Isolierung und Aufreinigung über ein Agarosegel (2.2.13) wurde das Vektor-tragende Fragment in eine Ligation (2.2.11.4) eingesetzt. Durch eine Ligation der kohäsiven Enden des Fragments sollte das gewünschte Konstrukt (pcosD1) entstehen. Die durch eine Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* (2.2.13) entstandenen Bakterienklone wurden zur Cosmid-DNA-Minipräparation (2.2.7.3) eingesetzt. Anhand von RFLP-Analysen dieser Cosmid-DNA konnten positive Klone identifiziert werden. Ein positiver Klon wurde zur Cosmid-DNA-Maxipräparation (2.2.7.1) eingesetzt. Sequenzanalysen auf der Basis der reinen Cosmid-DNA im Bereich der Ligation sicherte den Erfolg des Konstrukts ab.

Mit der gleichen Vorgehensweise wurden die Konstrukte pcosD2 (pcosC1.6-Behandlung mit *Bam*HI), pcosD3 (pcosC1.6-Behandlung mit *Bam*HI und *Nde*I), pcosD4 (pcosC1.6-Behandlung mit *Bam*HI und *Bgl*II), pcosD5 (pcosC1.6-Behandlung mit *Xba*I) und pcosD6 (pcosC1.6-Behandlung mit *Bam*HI und *Hpa*I) hergestellt (Abb. 3.17). Bei der Herstellung der Konstrukte pcosD3 und pcosD6 wurde ein zusätzlicher Schritt eingebaut. Die nach der Behandlung von pcosC1.6 mit den Endonukleasen entstandenen kohäsiven Enden des Vektor-tragenden Fragments wurden mit einer Klenow-Reaktion (2.2.11.3) aufgefüllt. Die nunmehr glatten Enden konnten somit ligiert werden.

Sequenzanalysen der Konstrukte pcosD2, -D3 und -D5 im jeweiligen Ligationsbereich bestätigten die erwarteten Rekombinationsereignisse.
Abbildung 3.18 zeigt die noch vorhandenen Sequenzabschnitte in den Deletionskonstrukten im Vergleich zur *insert*-DNA von pcosC1.6.

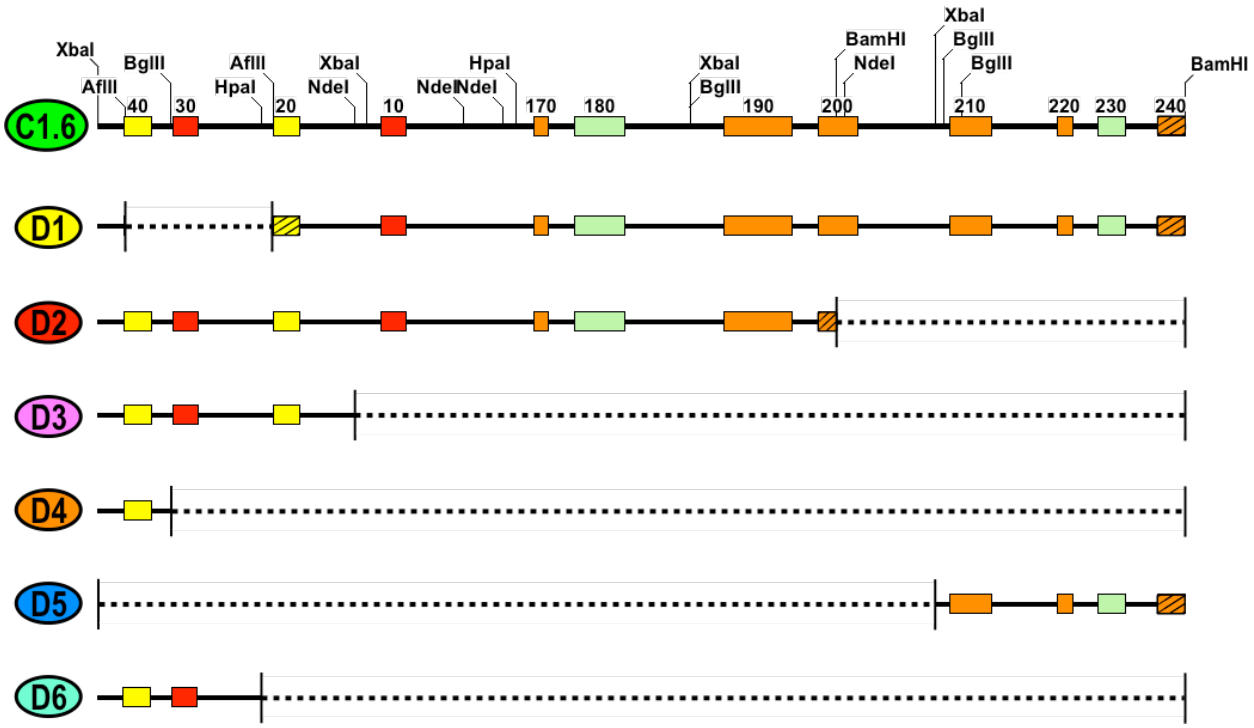

Abb. 3.18 Schematische Darstellung der *insert*-DNA der Deletionskonstrukte pcosD1 bis -D6 im Vergleich zu pcosC1.6. Die jeweils erzeugten Entfernungen aus der *insert*-DNA von pcosC1.6 dieser Konstrukte, hier mit D1, D2, D3, D4, D5 und D6 benannt, sind unterhalb der *insert*-DNA von pcosC1.6 (C1.6) schematisch dargestellt. Die entfernten Regionen sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Afl*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Hpa*I, *Nde*I und *Xba*I sind in der *insert*-DNA von pcosC1.6 gekennzeichnet.

3.4.1.2 Klonierung von Sequenzabschnitten aus pcosC1.6 in den Vektor pcosTL

Durch die Klonierung unterschiedlicher Regionen der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6 in den Vektor pcosTL wurden die Konstrukte pcosK1, -K2, -K3, und -K4 (K = Konstrukt) erzeugt.
Zur Vorbereitung für die Herstellung dieser Konstrukte wurde der Vektor pcosTL mit dem Enzym *Xba*I geöffnet. Um eine Religation des geöffneten Vektors zu verhindern, wurde die DNA im Anschluss dephosphoryliert (2.2.11.1).
Zur Herstellung der Konstrukte pcosK1 und -K4 wurde das Cosmid pcosC1.6 mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Xba*I behandelt. Eine Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente fand durch eine AGE (2.2.14) statt. Es folgte die Isolierung zweier Fragmente einer Größe von etwa 9 300 bp (trägt die Leserahmen 40 - 20) bzw. 5 200 bp (trägt die Leserahmen 210 und 220) aus dem Agarosegel mit anschließender Aufreinigung (2.2.16). Beide Fragmente tragen kohäsive Enden, die mit dem *Xba*I-geöffneten Vektor kompatibel sind. Nach einer Ligation (2.2.11.4) der jeweiligen Fragmente mit dem vorbereiteten Vektor pcosTL folgte eine Transformation in *E. coli* (2.2.13). Nachdem positive Einzelklone identifiziert worden waren, wurden jeweils zwei Klone zur Gewinnung von Cosmid-DNA (2.2.7.1) eingesetzt. Durch Sequenzanalysen der jeweiligen Ligationsbereiche wurde der Erfolg bestätigt.

Bei der Herstellung der Konstrukte pcosK2 und -K3 wurde das Cosmid pcosC1.6 mit dem Restriktionsenzym *Xba*I behandelt. Die Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente erfolgte durch eine AGE (2.2.14). Dabei wurde deutlich, dass die *in silico* ermittelte *Xba*I-Schnittstelle zwischen den Leserahmen 180 und 190 möglicherweise blockiert ist bzw. nicht existiert. Dadurch konnten zwei Fragmente einer Größe von etwa 9 700 bp (trägt die Leserahmen 40 - 20) bzw. 20 000 bp (trägt die Leserahmen 170 bis 200 und 10) aus dem Agarosegel isoliert und anschließend aufgereinigt werden (2.2.16). Die durch den *Xba*I-Verdau entstandenen kohäsiven Enden dieser Fragmente sind mit dem *Xba*I-geöffneten Vektor kompatibel. Nach der Ligation (2.2.11.4) der jeweiligen Fragmente mit dem vorbereiteten Vektor folgte eine Transformation in *E. coli* (2.2.13). Unter den resultierenden Bakterienklonen wurde positive Klone identifiziert. Jeweils zwei dieser Klone wurden zur Gewinnung von Cosmid-DNA (2.2.7.1) eingesetzt. Sequenzanalysen der Cosmid-DNA pcosK3 in den Bereichen der Ligation bestätigten den Erfolg der Rekombinationsereignisse.

In Abbildung 3.19 sind die resultierenden Konstrukte pcosK1 bis -K4 im Vergleich zu pcosC1.6 schematisch dargestellt.

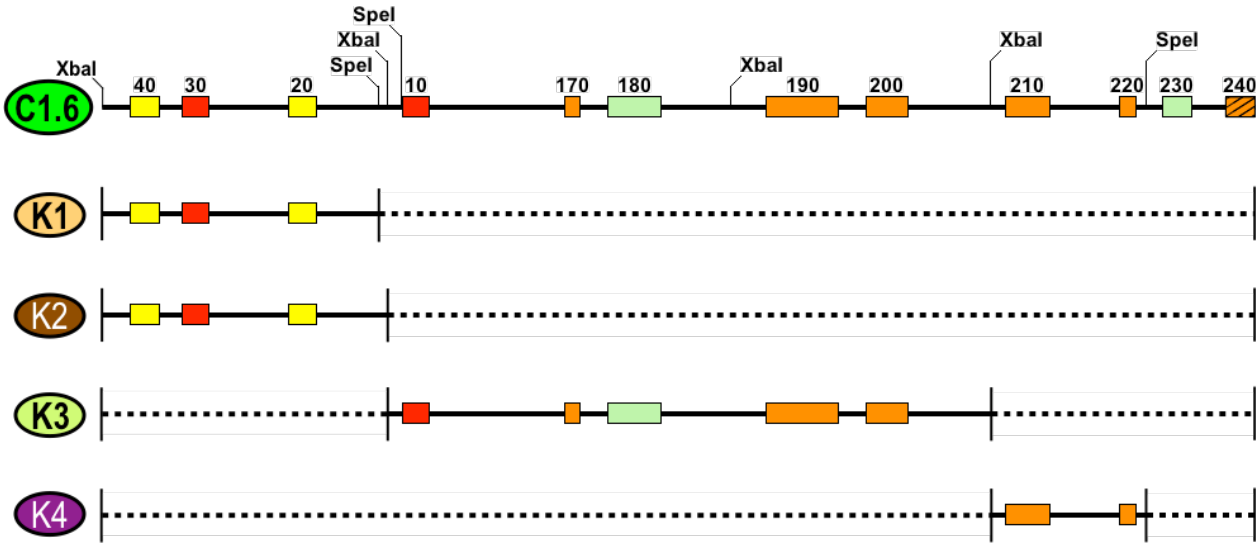

Abb. 3.19 Schematische Darstellung der *insert*-DNA der Konstrukte pcosK1 bis -K4 im Vergleich zu pcosC1.6. Durch natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen wurden Regionen aus der integrierten *insert*-DNA von pcosC1.6 ausgeschnitten und in den Vektor pcosTL kloniert. Die *insert*-DNA der resultierenden Konstrukte pcosK1, -K2, -K3 und -K4 sind unterhalb der *insert*-DNA von pcosC1.6 (C1.6) schematisch dargestellt und mit K1 bis K4 benannt. Die gegenüber der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6 nicht vorhandenen Regionen sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Spe*I und *Xba*I in der *insert*-DNA von pcosC1.6 sind gekennzeichnet.

3.4.2 Selektion S5: Kompetitive *in vitro* Sb(III)-Selektion von pcosC1.6, -D1 bis -D4 und pcosK1

Mit der kompetitiven *in vitro* Sb(III)-Selektion S5 wurde der Einfluss von pcosC1.6 und fünf verkleinerten Konstrukten (pcosD1, -D2, -D3, -D4 und -K1), die unterschiedliche Sequenzbereiche der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6 aufweisen (3.4.1.1 und 3.4.1.2), auf die *in vitro*-Sb(III)-Resistenz hin untersucht. Auf diese Weise können Regionen auf dem Cosmid pcosC1.6 eingegrenzt werden, die eine *in vitro*-Sb(III)-Resistenz bewirken. Sollten einzelne Konstrukte einen gleichwertigen oder stärkeren Effekt der *in vitro*-Sb(III)-Resistenz zu pcosC1.6 vermitteln, so sind

mit hoher Wahrscheinlichkeit die auf dem Konstrukt lokalisierten Sequenzbereiche für den Sb(III)-Resistenz vermittelnden Effekt verantwortlich.

3.4.2.1 Selektion S5: Transfektion von PER002K7 mit pcosC1.6, den Konstrukten pcosD1 bis -D4 und pcosK1

Der Stamm PER002K7 wurde mit der Cosmid-DNA von pcosC1.6 und den fünf Konstrukten pcosD1, -D2, -D3, -D4 und -K1 transfiziert. Dabei erfolgte die Transfektion (2.2.3) mit jeweils 50 µg zweier Gemische der Cosmid-DNA (Gemisch 1 (G1) und 2 (G2)), bei dem die fünf Konstrukte alleine (PER002K7[pcosG1]) bzw. zusammen mit pcosC1.6 (PER002K7[pcosG2]) zu jeweils gleichen Teilen eingesetzt wurden. In Abbildung 3.20 sind die Cosmid-DNA-Gemische und deren Transfektionen schematisch dargestellt.

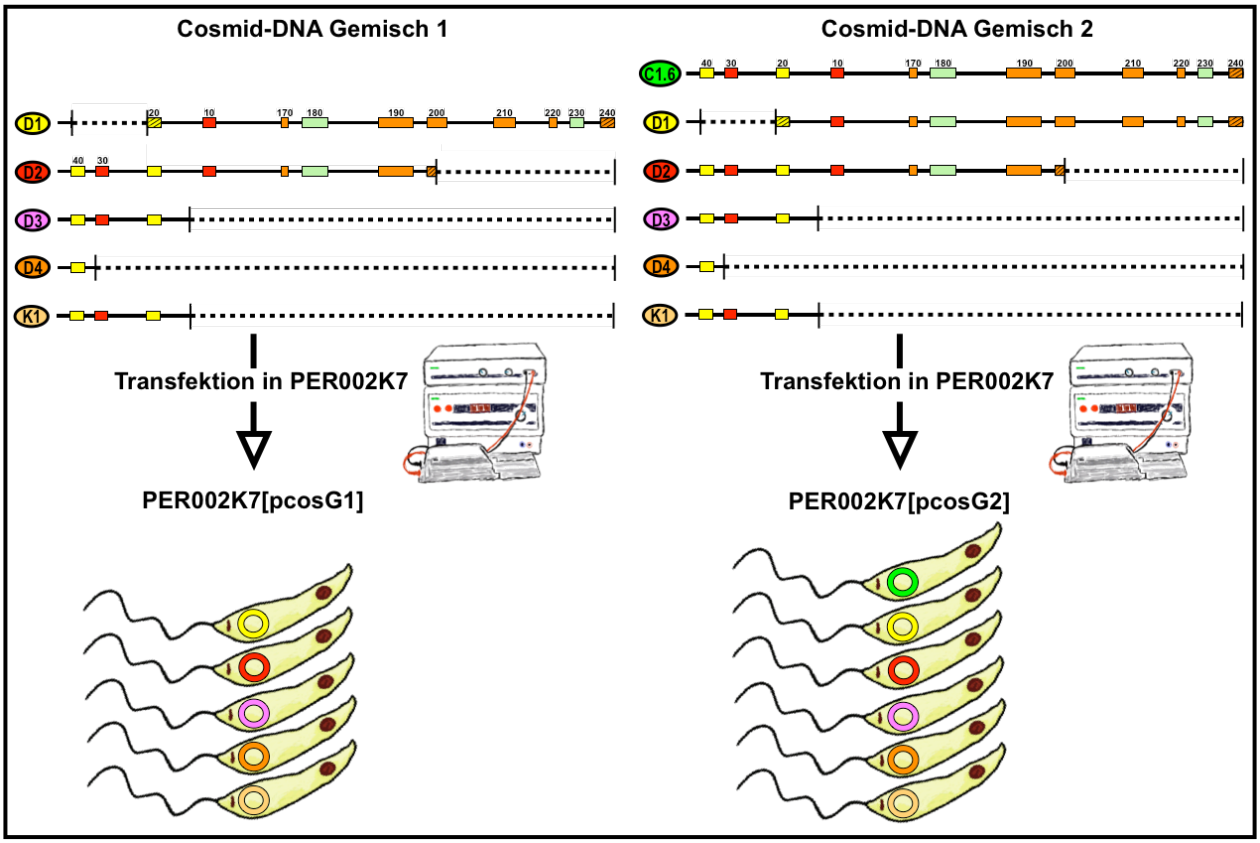

Abb. 3.20 Schematische Darstellung der Transfektion der Konstrukt-Gemische G1 und G2. Die Konstrukte pcosD1, -D2, -D3, -D4 und K1 wurden ohne pcosC1.6 als Gemisch 1 bzw. mit pcosC1.6 als Gemisch 2 in PER002K7 transfiziert. Die erzeugten rekombinanten Populationen wurden mit PER002K7[pcosG1] und PER002K7[pcosG2] benannt.

Als Negativkontrolle für die anschließende Selektion wurde der Stamm PER002K7 mit der Cosmid-DNA des leeren Vektors pcosTL (PER002K7[pcosTL]) transfiziert. Für eine Positivkontrolle fand eine Transfektion der Zellen mit pcosC1.6 (PER002K7[pcosC1.6]) statt. Nach dem Absterben der Zellen des Kontroll-Transfektionsansatzes (ohne DNA) unter G418-Selektion, waren die rekombinanten Promastigoten der Gemische G1 (PER002K7[pcosG1]), G2 (PER002K7[pcosG2]) und der Kontrollen zur Sb(III)-Selektion bereit.

3.4.2.2 Verlauf der Selektion S5

Die rekombinanten Promastigoten der Populationen PER002K7[pcosG1], -[pcosG2], -[pcosC1.6] (Positivkontrolle) und -[pcosTL] (Negativkontrolle) wurden jeweils in einer Zelldichte von 2 x 10^6 Zellen/ml im Medium S10/- (2.2.1.3) mit 60 µM Sb(III) inkubiert. Der schematische Ablauf dieser kompetitiven Selektion ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

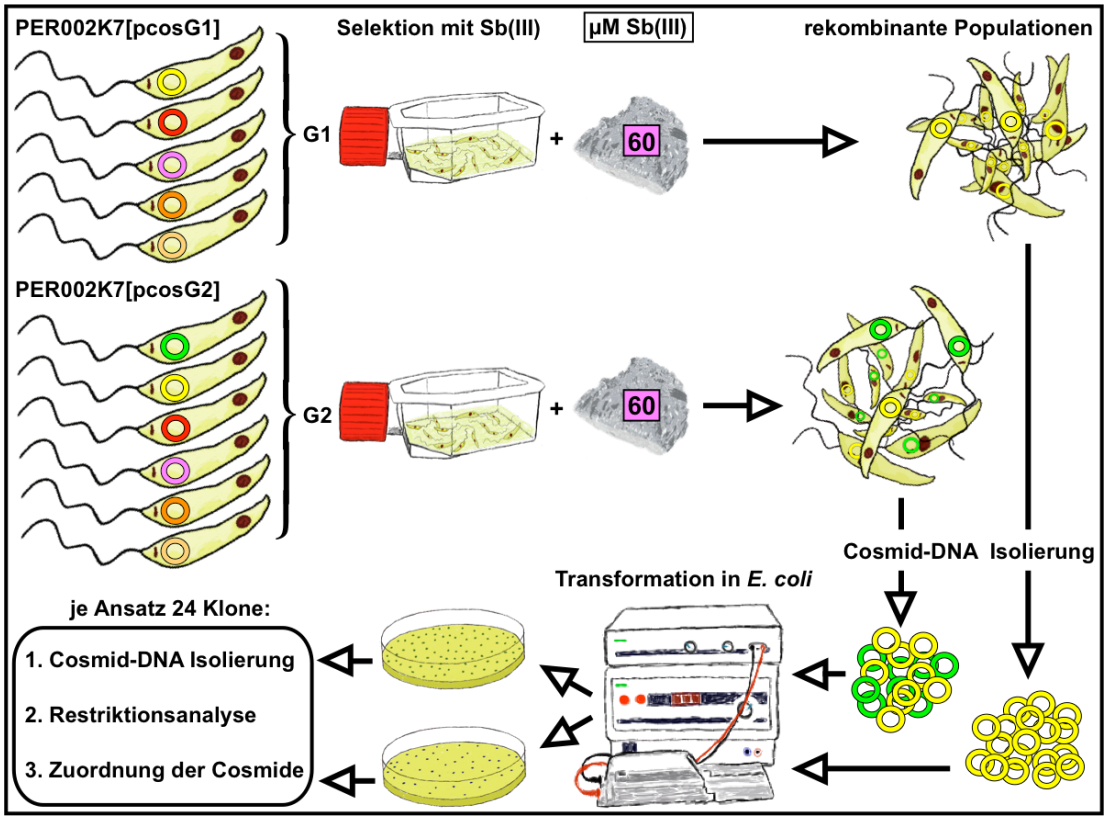

Abb. 3.21 Schematische Darstellung der Selektion S5 und der Identifizierung der Cosmide. Die rekombinanten Populationen PER002K7[pcosG1] und PER002K7[pcosG2] wurden mit 60 µM Sb(III) im Medium S10/- (modifiziertes Schneider's *Insect Medium)* kultiviert. Aus den überlebenden Promastigoten wurde die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Die Cosmid-DNA aus je 24 *E. coli*-Klonen wurde durch *Eco*RV und *Xba*I basierte RFLP-Analysen identifiziert und den Konstrukten bzw. den Cosmid pcosC1.6 zugeordnet.

Diese Populationen (PER002K7[pcosG1], -[pcosG2], -[pcosC1.6] und -[pcosTL]) wurden in Anwesenheit von 60 µM Sb(III) im Medium S10/- (2.2.1.3) für 11 Tage kultiviert. Durch mikroskopische Überwachungen und Bestimmungen der Zelldichten (2.2.1) wurde das Wachstum der Zellen unter Sb(III)-Selektionsdruck dokumentiert. In Abbildung 3.22 ist der Verlauf der Selektion schematisch dargestellt.

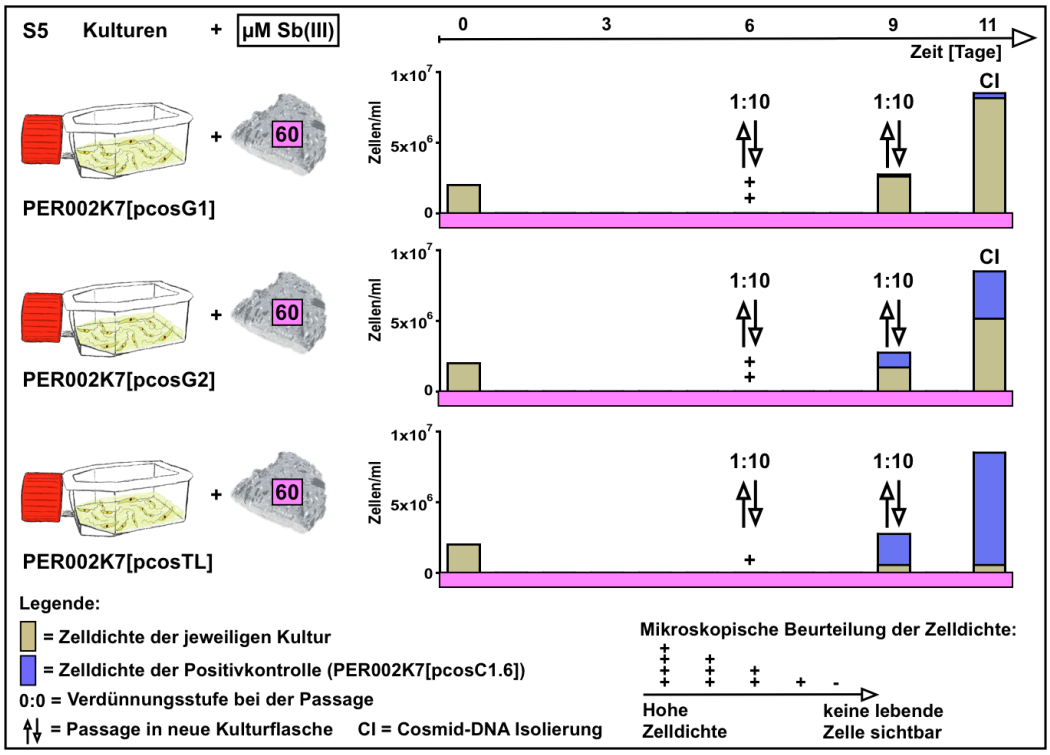

Abb. 3.22 Schematische Darstellung des Verlaufs der Selektion S5. Die rekombinanten Populationen PER002K7[pcosG1], -[pcosG2] zusammen mit den Positiv- und Negativkontrollen (PER002K7[pcosC1.6] und -[pcosTL]) wurden mit jeweils einer Zelldichte von 2 x 10^6 Zellen in 10 ml S10/- (modifiziertes Schneider's *insect Medium*) eingesät und mit 60 µM Sb(III) inkubiert. Der Verlauf der Kulturen PER002K7[pcosG1], -[pcosG2] und -[pcosTL] ist in einem Zeitstrahl dargestellt. Die Zelldichten wurden unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt und sind auf dem Zeitstrahl als Balkendiagramm dargestellt. Die Zelldichten der Positivkontrolle (PER002K7[pcosC1.6]) ist zum Vergleich als Balkendiagramm im Hintergrund des Zeitstrahls der jeweiligen Populationen in Blau dargestellt. Die Passagen und Verdünnungen sind am entsprechenden Tag eingezeichnet. Unter dem jeweiligen Zeitstrahl ist die in der Kultur vorliegende Antimon(III)-Konzentrationen farbig abgebildet. Am Tag 11 wurden aus den überlebenden Parasiten die Cosmid-DNA isoliert (CI) und stellt das Ende der Selektion dar.

Verdünnungen der Kulturen erfolgten simultan, nachdem die Populationen PER002K7[pcosG1] und -[pcosG2] in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten waren. Nach einer elftägigen *in vitro*-Kultivierung unter Sb(III)-Selektionsdruck konnte ein deutlicher Wachstumsvorteil der Kultur PER002K7[pcosG1] (Gemisch ohne pcosC1.6) gegenüber der Negativkontrolle (PER002K7[pcosTL]) festgestellt werden. Der Wachstumsvorteil war dem Wachstum der Positivkontrolle (PER002K7[pcosC1.6]) annähernd identisch. Bei der Kultur PER002K7[pcosG2] (Gemisch mit pcosC1.6) konnte am Tag 11 ebenfalls ein deutlicher Wachstumsvorteil gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden. Weniger stark ausgeprägt war der Wachstumsvorteil dieser Population gegenüber der Positivkontrolle (Abb. 3.22). Die Cosmid-DNA Isolierung der Kulturen PER002K7[pcosG1] und -[pcosG2] wurden aus den überlebenden Zellen vom Tag 11 durchgeführt.

3.4.2.3 Selektion S5: Auswertung der Cosmidtypen

Die isolierten Cosmide aus Selektion S5 vom Tag 11 der überlebenden Zellen der Kulturen PER002K7[pcosG1] und -[pcosG2] wurden mittels *Eco*RV- und *Xba*I-basierten Analysen des RFLP (2.2.11.2) von jeweils 24 untersuchten *E. coli*-Klonen den eingesetzten Konstrukten bzw. des

Cosmidtyps pcosC1.6 zugeordnet, wie in Abbildung 3.23 dargestellt ist. Die erwarteten Fragmentmuster, die zur Identifizierung der eingesetzten Konstrukte bzw. von pcosC1.6 führten, sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Tabelle 3.6: Restriktionsfragmentmuster der in S5 eingesetzten Konstrukte im Vergleich zu pcosC1.6

pcosC1.6	pcosD1	pcosD2	pcosD3	pcosD4	pcosK1
20 375 bp	20 375 bp				
		16 990 bp			
					8 873 bp
7 244 bp	7 244 bp	7 244 bp	7 244 bp	7 244 bp	
6 672 bp		6 672 bp	6 672 bp		6 672 bp
4 598 bp	4 598 bp				
4 558 bp	4 558 bp				
	2 958 bp				
1 635 bp		1 635 bp	1 635 bp	1 635 bp	
1 402 bp	1 402 bp	1 402 bp			
					1 270 bp
				1 223 bp	
			1 153 bp		
815 bp	815 bp	815 bp	815 bp	815 bp	815 bp

Die Tabelle listet die *in silico* ermittelten Restriktionsfragmentmuster der in S5 eingesetzten Konstrukte und pcosC1.6 auf, die durch die Restriktionsendonukleasen *Eco*RV und *Xba*I entstehen würden (MacVector). Die wohl blockiert *Xba*I-Schnittstelle zwischen Leserahmen Nr. 180 und 190 wurde bei den Berechnungen berücksichtigt. Die vektorspezifischen Banden sind grün unterlegt.

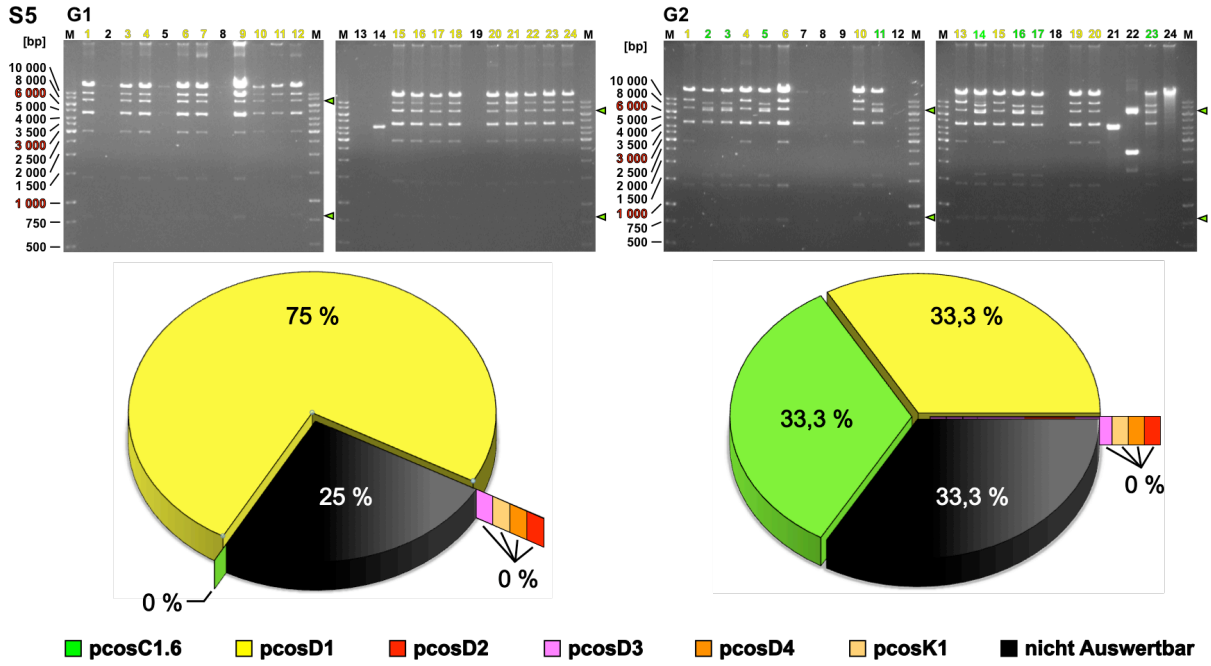

Abb. 3.23 RFLP der isolierten Cosmide und die relative, prozentuale Cosmidverteilung nach der kompetitiven Selektion S5. *Eco*RV/*Xba*I-RFLP von je 24 Cosmiden nach elftägiger *in vitro*-Selektion mit 60 µM Sb(III) von PER002K7 transfiziert mit den Cosmid-Gemischen G1 und G2. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in je 1 %-igen Agarosegelen. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Als DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder*, dessen Fragmentgrößen der Bilder G1 und G2 jeweils am linken Bildrand angegeben sind. Die grünen Pfeile auf der rechten Seite der Gelbilder markieren die vektorspezifischen Banden. Als Kuchendiagramm sind die relativen, prozentualen Verteilungen der Konstrukte und pcosC1.6 dargestellt.

Die Bilder der AGE in Abbildung 3.23 zeigen, dass sich mit überdurchschnittlicher Häufigkeit (25 % (G1) bzw. 33,3 % (G2)) die Restriktionsfragmentmuster nicht zuordnen ließen. In den meisten Fällen lag die Ursache in einer zu geringen Ausbeute an Cosmid-DNA (G1, Nr. 2, 5, 8 und 13; G2, Nr. 7 und 8). Das Fehlen jeglicher DNA-Spuren im Agarosegel (G1, Nr. 13 und 19; G2, Nr. 19) kann ebenfalls die Ursache von zu geringer DNA-Ausbeute sein. Die entstandenen Bandenmuster dreier Klone (G1, Nr. 14 und G2, Nr. 21 und 22) ließ sich jedoch keinem der zu erwartenden Restriktionsfragmentmuster zuordnen. Das deutet darauf hin, das die eingefügte DNA durch Rekombinationsereignisse verändert wurde, wie es im Fall der Selektion S1 bis S3 bei dem Cosmidtyp pcosC1.2 vermutet wird. Dabei ist nicht geklärt, ob die Rekombinationsereignisse in den Promastigoten oder in den *E. coli*-Bakterien stattgefunden haben.
Die identifizierbaren Restriktionsfragmentmuster aus den überlebenden Erregern PER002K7[pcosG1] (ohne pcosC1.6) konnten dem Konstrukt pcosD1 zugeordnet werden. Dagegen wurden die aus PER002K7[pcosG2] (mit pcosC1.6) identifizierbaren Restriktionsfragmentmuster je zur Hälfte dem Cosmid pcosC1.6 und dem Konstrukt pcosD1 zugeordnet (Abb. 3.23). Das deutet darauf hin, dass sich die resistenzvermittelnden Bereiche auf dem Konstrukt pcosD1 liegen und somit die Resistenz einem der Leserahmen von Nr. 200 bis 230 zuzuordnen ist.

3.4.3 Selektion S6 bis S8: Kompetitive Sb(III)-Selektion von pcosC1.6, -D1 bis -D6 und pcosK2 bis -K3

Um den Sb(III)-Resistenz vermittelnden Sequenzabschnitt weiter einzugrenzen, wurden in den kompetitiven *in vitro* Sb(III)-Selektionen S6 bis S8 weitere Konstrukte einbezogen. Im Unterschied zur Selektion S5 wurden hier die Cosmid-Derivate separat in den Klon PER002K7 etabliert. Damit sollte sicher gestellt werden, dass zu Beginn der Selektion die Populationen der Cosmid-Derivate tragenden Parasiten zu gleichen Teilen vertreten sind.

3.4.3.1 Selektion S6 bis S8: Transfektion von PER002K7 mit pcosC1.6, -D1 bis -D6 und pcosK2 bis -K4

Wie bei Selektion S5 wurde der Klon PER002K7 mit dem Cosmid pcosC1.6 und neun Cosmid-Derivaten (pcosD1, -D2, -D3, -D4, -D5, -D6, -K2, -K3 und -K4) transfiziert. Dabei erfolgte die Transfektion (2.2.3) separat mit 50 µg der jeweiligen Cosmid-DNA, wie in Abbildung 3.24 schematisch dargestellt ist. Parasiten der resultierenden rekombinanten Populationen (PER002K7[pcosC1.6], -[pcosD1], -[pcosD2], -[pcosD3], -[pcosD4], -[pcosD5], -[pcosD6], -[pcosK2], -[pcosK3] und -[pcosK4]) wurden zu gleichen Teilen gemischt und in die nachfolgenden Selektionen eingesetzt. Dabei wurden zwei Zusammensetzungen der rekombinanten Populationen hergestellt, die als PER002K7-G3 und -G4 benannt wurden. PER002K7-G4 beinhaltete ein Gemisch aus allen zehn erzeugten rekombinanten Populationen zu gleichen Teilen, während PER002K7-G3 die Populationen PER002K7[pcosC1.6] und PER002K7[pcosD1] aussparte. In Abbildung 3.24 sind die Populationsgemische schematisch dargestellt.

Als Negativkontrolle für die anschließende Selektion diente auch hier die mit dem leeren Vektor pcosTL transfizierte Population PER002K7 (PER002K7[pcosTL]).

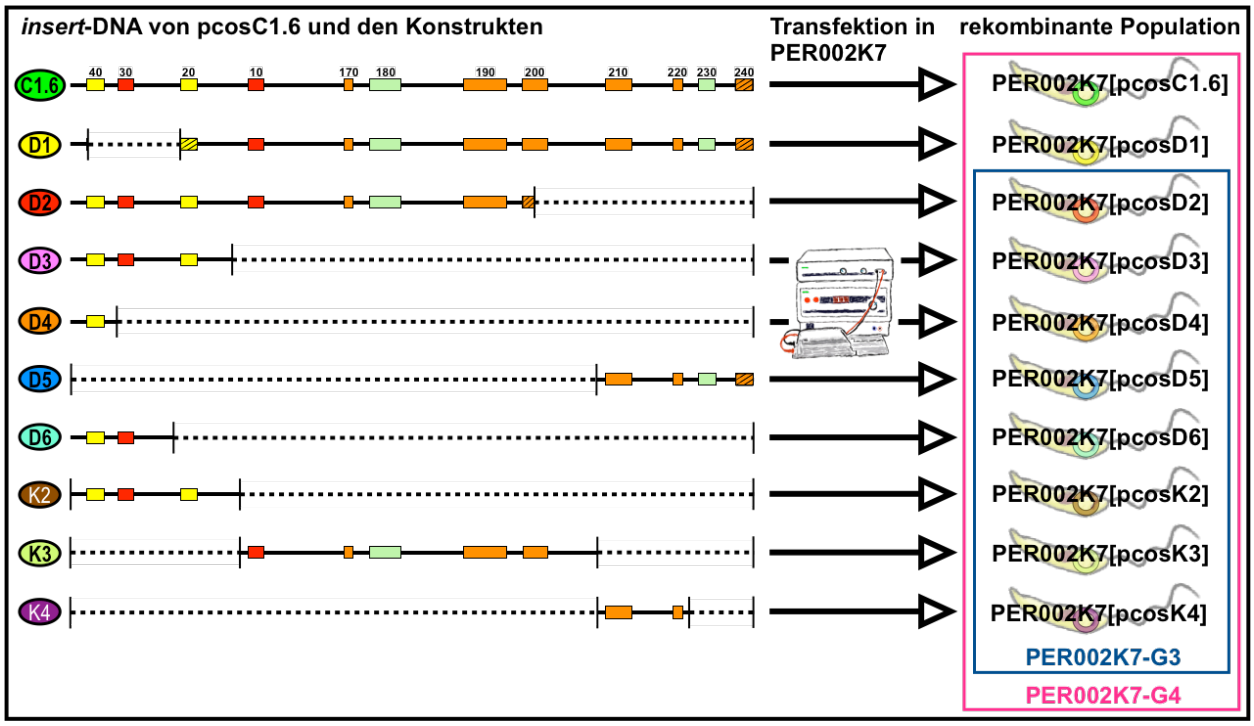

Abb. 3.24 Schematische Darstellung der Transfektion der Cosmid-Derivate und Cosmid C1.6 in Klon PER002K7 zur Vorbereitung der Selektionen S6, S7 und S8. Das Cosmid pcosC1.6 und die Konstrukte pcosD1, -D2, -D3, -D4, -D5, -D6, -K2, -K3 und K4 wurden separat in PER002K7 transfiziert. Die erzeugten rekombinanten Populationen wurden in der Zusammensetzung PER002K7-G3 (blaue Umrahmung) bzw. PER002K7-G4 (rosa Umrahmung) zu gleichen Teilen in den Selektionen S6 bis S8 eingesetzt.

3.4.3.2 Verlauf der Selektionen S6 bis S8

In den Selektionen S6 bis S8 wurden die rekombinanten Populationsgemische mit jeweils einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen/ml im Medium S10/2 (2.1.9) eingesät. In der Selektion S6 wurden die rekombinanten Populationen des Gemischs PER002K7-G3 mit 65 µM Sb(III) inkubiert, während in der Selektion S7 das gleiche Populationsgemisch mit 80 µM Sb(III) inkubiert wurde. In der Selektion 8 wurden die rekombinanten Populationen des Gemisches PER002K7-G4 mit 80 µM Sb(III) inkubiert. Der Sb(III)-Selektionsdruck wurde bei Selektion S6 für 15 Tage und bei Selektionen S7 und S8 für neun Tage aufrecht erhalten. Der schematische Ablauf dieser kompetitiven Selektionen ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

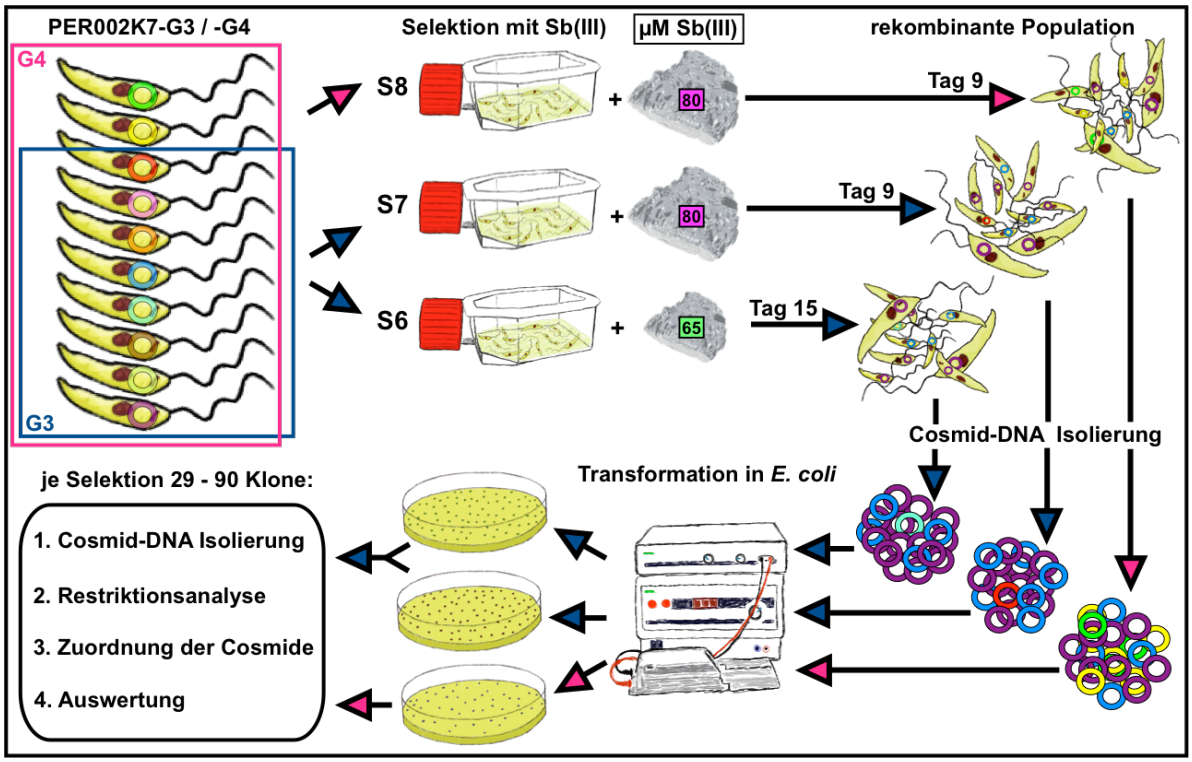

Abb. 3.25 Schematische Darstellung der Selektion S6 bis S8 und der Identifizierung der Cosmid-Derivate. Die rekombinanten Populationsgemische PER002K7-G3 (G3) und -G4 (G4) wurden mit 65 µM bzw. 80 µM Sb(III) im Medium S10/- (modifiziertes Schneider's *Insect Medium)* kultiviert. Aus den überlebenden Promastigoten wurde die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Die Cosmid-DNA aus je 29 - 45 *E. coli*-Klonen wurde durch *Eco*RV und *Xba*I basierte RFLP-Analysen identifiziert und den Cosmid-Konstrukten bzw. dem Cosmid pcosC1.6 zugeordnet.

Ebenfalls wurden zu jeder Selektion die Populationen PER002K7[pcosC1.6] (Positivkontrolle) und -[pcosTL] (Negativkontrolle) mit den entsprechenden Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Als Wachstumskontrollen wurden rekombinanten Populationsgemische PER002K7-G3 und -G4 ohne Sb(III)-Selektionsdruck über den gleichen Zeitraum kultiviert.

Das Wachstum der Zellen unter Sb(III)-Selektionsdruck wurde durch mikroskopische Überwachungen und Bestimmungen der Zelldichten (2.2.1) dokumentiert. In Abbildung 3.26 ist exemplarisch der Verlauf der Selektion S6 schematisch dargestellt. Das Wachstum der Zellen der Selektionen S7 und S8 war entsprechend der Sb(III)-Konzentration vergleichbar.

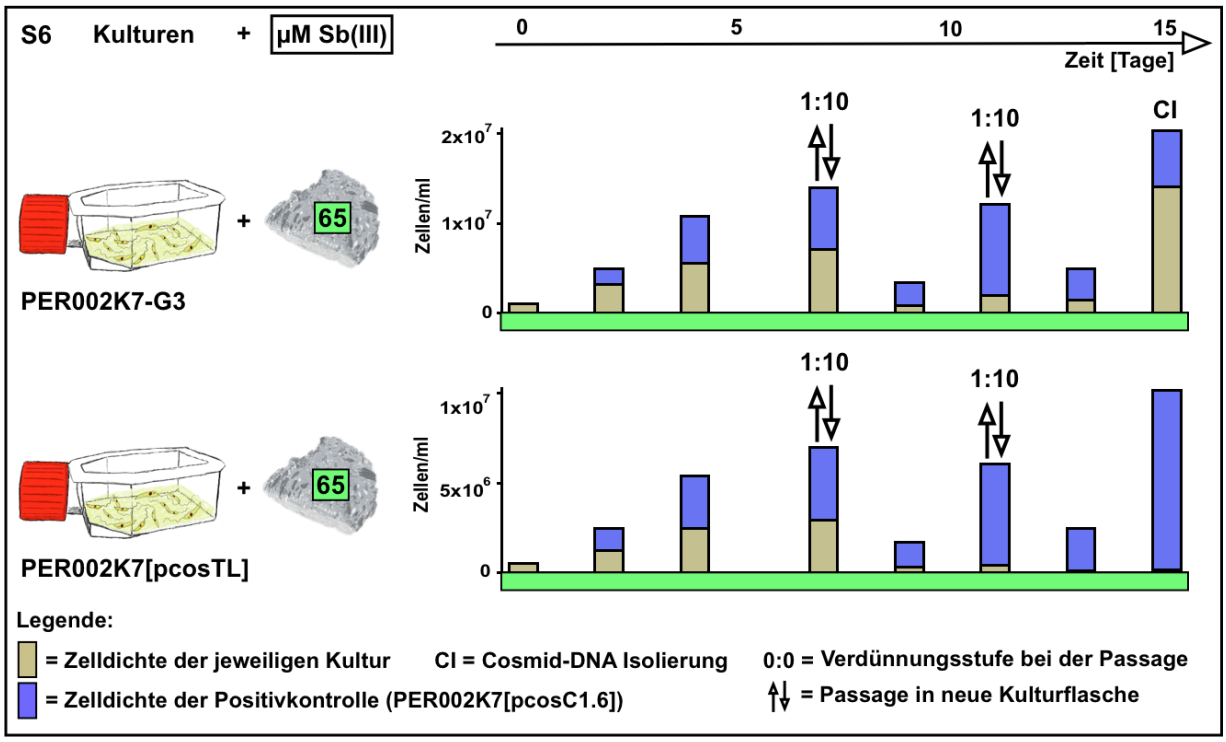

Abb. 3.26 Schematische Darstellung des Verlaufs der Selektion S6. Das rekombinante Populationsgemisch PER002K7-G3 zusammen mit den Positiv- und Negativkontrollen (PER002K7[pcosC1.6] und -[pcosTL]) wurden mit jeweils einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen in 10 ml S10/2 (modifiziertes Schneider's *insect Medium*) eingesät und mit 65 µM Sb(III) inkubiert. Der Verlauf der Kulturen PER002K7-G3 und PER002K7[pcosTL] ist in einem Zeitstrahl dargestellt. Die Zelldichten wurden unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt und sind auf dem Zeitstrahl als Balkendiagramm dargestellt. Die Zelldichten der Positivkontrolle (PER002K7[pcosC1.6]) sind zum Vergleich als Balkendiagramm im Hintergrund des Zeitstrahls der beiden Populationen in Blau dargestellt. Die Passagen und Verdünnungen der Kulturen sind am entsprechenden Tag eingezeichnet. Unter dem jeweiligen Zeitstrahl ist die in der Kultur vorliegende Antimon(III)-Konzentrationen farbig abgebildet. Am Tag 15 wurden aus den überlebenden Parasiten die Cosmid-DNA isoliert (CI) und stellt das Ende der Selektion dar.

Verdünnungen der Kulturen der jeweiligen Selektion erfolgten simultan, nachdem die Populationsgemische PER002K7-G3 bzw. -G4 in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten waren. Nach einer fünfzehntägigen (S6) bzw. neuntägigen (S7 und S8) *in vitro*-Kultivierung unter Sb(III)-Selektionsdruck konnte ein deutlicher Wachstumsvorteil der Kulturen des Gemisches PER002K7-G3 bzw. -G4 gegenüber der entsprechenden Negativkontrolle (PER002K7[pcosTL]) festgestellt werden. Das Wachstum der Population PER002K7-G4 war unter Sb(III)-Selektionsdruck gegenüber dem Wachstum der Population PER002K7-G3 im Vergleich zur Positivkontrolle (PER002K7[pcosC1.6]) stärker, jedoch der Positivkontrolle unterlegen. Die Cosmid-DNA Isolierungen wurden aus den überlebenden Zellen vom Tag 15 (S6) bzw. vom Tag 9 (S7 und S8) durchgeführt. Des weiteren fand eine Cosmid-DNA Isolierung der jeweiligen Wachstumskontrolle (Populations-gemische PER002K7-G3 und -G4 kultiviert ohne Sb(III)-Selektionsdruck) zu den gleichen Zeitpunkten statt.

3.4.3.3 Selektion S6 bis S8: Auswertung der Cosmidtypen

Die isolierten Cosmide aus den Selektionen S6 bis S8 und den Wachstumskontrollen wurden mittels *Eco*RV- und *Xba*I-basierten Analysen des RFLP (2.2.11.2) den Cosmid-Derivaten zugeordnet. Dabei wurden jeweils 29 bis 90 *E. coli*-Klone pro Zeitpunkt untersucht. Die Ergebnisse

der Selektion S6 und S7 wurden in der Auswertung zusammengefasst, da in beiden Fällen die Population PER002K7-G3 einem Sb(III)-Selektionsdruck ausgesetzt wurde (Abb. 3.25) und die separaten Ergebnisse vergleichbar waren. In Abbildung 3.27 sind die Cosmidverteilungen der Selektionen S6/7 und S8 mit den zugehörigen Kontrollen dargestellt.

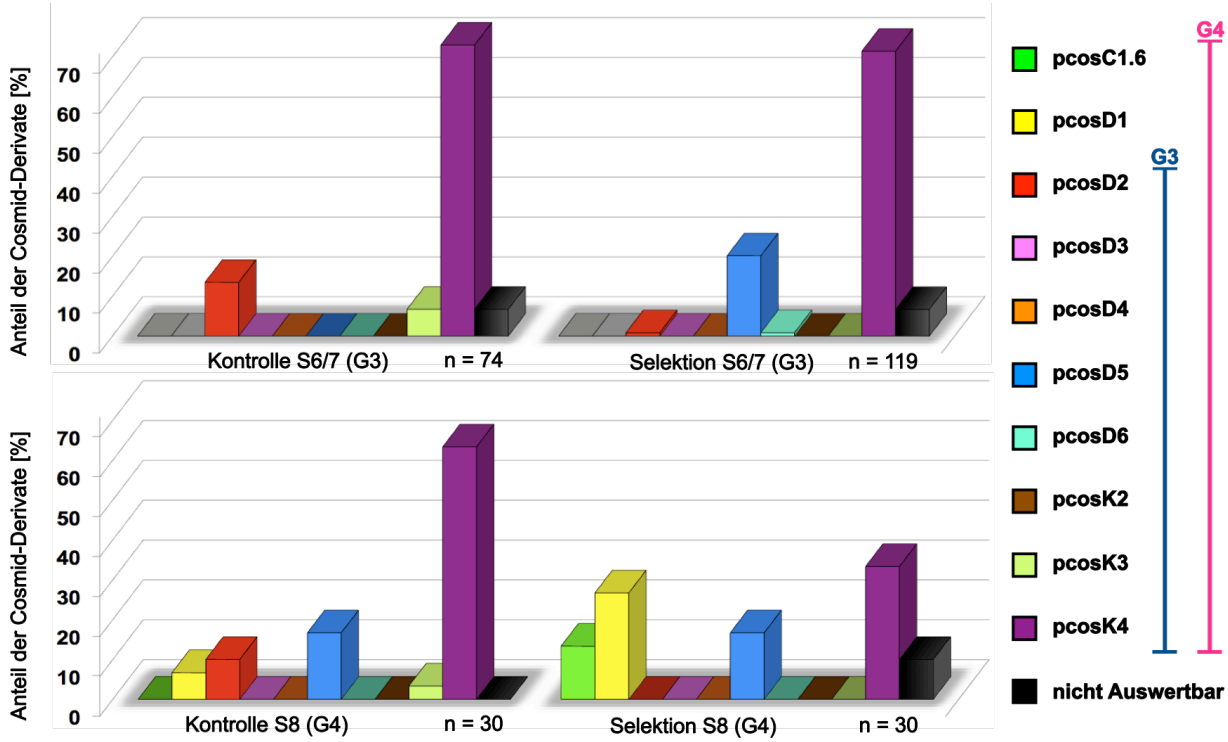

Abb. 3.27 Die relativen, prozentualen Cosmidverteilungen nach den kompetitiven Selektion S6 bis S8 und den Wachstumskontrollen. Cosmid-DNA der überlebenden Zellen der Populationsgemische PER002K7-G3 und PER002K7-G4 nach einer *in vitro*-Sb(III)-Selektion wurde analysiert. EcoRV/XbaI-RFLP von jeweils 29 bis 90 *E. coli*-Klonen pro Selektionszeitpunkt wurden den Cosmid-Derivaten zugeordnet. Die Selektionesergebnisse von S6 und S7 (PER002K7-G3 (G3)) und deren Kontrollen wurden zusammengefasst. Als Balkendiagramm sind die relativen, prozentualen Cosmidverteilungen der Selektion S6/7 und der entsprechenden Wachstumskontrolle (oben) und der Selektion S8 (PER002K7-G4) mit zugehöriger Wachstumskontrolle (unten) dargestellt.

Es ist auffällig, dass sich sowohl in den überlebenden Zellen der Selektionen S6 bis S8 als auch in den Zellen zugehörigen Wachstumskontrollen das Konstrukt pcosK4 (trägt die Leserahmen Nr. 210 und 220) dominiert.

In den überlebenden Zellen der Selektionen S6/7 wurde ebenfalls das Konstrukt pcosD5 (20 % Häufigkeit) identifiziert, dass zu Konstrukt pcosK4 eine Sequenzübereinstimmung in den Leserahmen Nr. 210 und 220 aufweist. Die weiterhin in der Selektion identifizierten Konstrukte pcosD2 und -D6 mit jeweils 0,8 % Häufigkeit sind in Bezug auf die Sb(III)-Resistenzvermittlung zu vernachlässigen.

In der Kontrolle S6/7 hingegen treten neben dem Konstrukt pcosK4 die Konstrukte pcosD2 (14 % Häufigkeit) und pcosK3 (7 % Häufigkeit) auf, die keine Sequenzübereinstimmungen zu dem Konstrukt pcosK4 aufweisen. Somit haben sich in den überlebenden Zellen der Selektionen S6/7 ausschließlich Konstrukte durchgesetzt, die die Leserahmen 210 und 220 gemeinsam haben, während in der Kontrolle ein breites Spektrum von Leserahmen in den identifizierten Konstrukten zu finden ist (Abb. 3.27 und 3.24).

Alle identifizierten Cosmid-Derivate (pcosC1.6, -D1, -D5 und -K4) der überlebenden Zellen der Selektion 8 weisen ebenfalls eine Sequenzüberlappung im Bereich der Leserahmen Nr. 210 und 220 auf. In den Zellen der Wachstumskontrolle hingegen wurden neben den Konstrukten pcosK4 und -D5 die Konstrukte pcosD2 (10 % Häufigkeit) und pcosK3 (3 % Häufigkeit) identifiziert, die keine Überlappungen im Bereich der Leserahmen Nr. 210 und 220 aufweisen (Abb. 3.27 und 3.24).
Die Ergebnisse der Selektionen S6/7 und S8 deuten darauf hin, dass sich der in Selektion S5 identifizierte resistenzvermittelnde Bereich auf die Leserahmen Nr. 210 und 220 eingrenzen lässt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Überexpression der Gene 210 und 220 ein allgemeiner *in vitro*-Wachstumsvorteil hervorgerufen wird.

3.4.4 Klonierung der Leserahmen Nr. 210 und 220 aus pcosK4 in den Vektor pcosTL

Weitere Untersuchungen sollten nun klären, ob der Sb(III)-Resistenzvermittelnde Bereich auf einen der identifizierten Leserahmen, Nr. 210 oder 220 (*Lb*-210, *Lb*-220), eingegrenzt werden kann. Um das zu prüfen, wurden die Konstrukte pcosK5 und -K6 hergestellt, die jeweils einen dieser Leserahmen tragen.
Die Herstellung dieser Konstrukte ist in Abbildung 3.28 (A) schematisch angedeutet. Um Konstrukt pcosK5 herzustellen, wurde das Konstrukt pcosK4 mit den Restriktionsenzymen *Bcl*I und *Xba*I behandelt. Durch eine Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente durch eine AGE (2.2.14) konnte das Fragment mit dem Leserahmen *Lb*-210 aus dem Agarosegel isoliert und anschließend aufgereinigt (2.2.16) werden. Die kohäsiven Enden des Fragments sind kompatibel mit dem *Xba*I-geöffneten Vektor pcosTL (3. 4.1.2). Nach einer Ligation (2.2.11.4) mit dem vorbereiteten Vektor folgte eine Transformation in *E. coli* (2.2.13). Nachdem positive Einzelklone identifiziert worden waren, wurden zwei Klone zur Gewinnung von Cosmid-DNA (2.2.7.2) eingesetzt. Durch Sequenzanalysen der jeweiligen Ligationsbereiche wurde der Erfolg bestätigt.
Mit der gleichen Vorgehensweise wurde das Konstrukt pcosK6 hergestellt mit dem Unterschied, dass das Konstrukt pcosK4 mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Xba*I behandelt wurde (Abb. 3.28 (A)).
Die erzeugten Konstrukte pcosK5 (trägt den Leserahmen *Lb*-210) und pcosK6 (trägt den Leserahmen *Lb*-220) sind im Vergleich zu Cosmid pcosC1.6 und Konstrukt pcosK4 schematisch in Abbildung 3.28 (B) dargestellt.

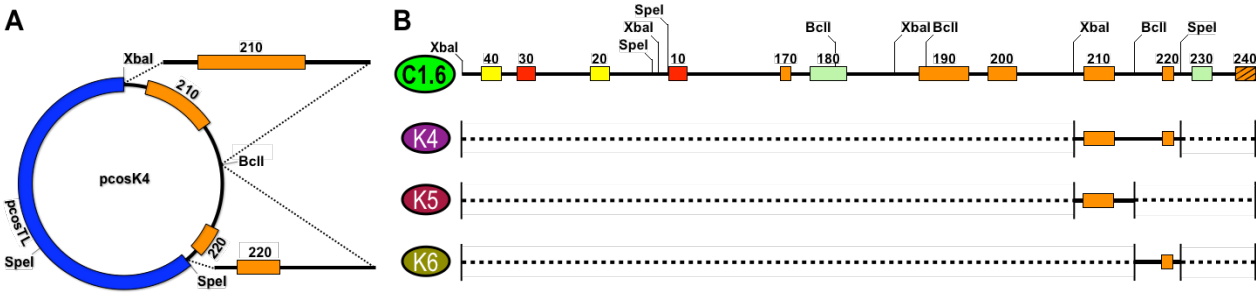

Abb. 3.28 Schematische Darstellung der Herstellung der Konstrukte pcosK5 und -K6 und Vergleich der verbleibenden *insert*-DNA zu pcosC1.6 und pcosK4. (A) Durch natürlich vorkommende Restriktionsschnittstellen wurden zwei Bereiche aus der *insert*-DNA von pcosK4 ausgeschnitten und separat in den Vektor pcosTL kloniert. Die *insert*-DNA der resultierenden Konstrukte pcosK5 und -K6 tragen nunmehr die einzelnen Leserahmen Nr. 210 (pcosK5) bzw. 220 (pcosK6). (B) Die *insert*-DNA der Konstrukte sind unterhalb der *insert*-DNA von pcosK4 (K4) und pcosC1.6 (C1.6) schematisch dargestellt und sind mit K5 und K6 benannt. Die gegenüber der *insert*-DNA des Cosmids pcosC1.6 nicht vorhandenen Regionen sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Bcl*I, *Spe*I und *Xba*I in der *insert*-DNA von pcosC1.6 (A) bzw. von pcosK4 (B) sind gekennzeichnet.

3.4.4.1 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosK5 und -K6 in *L. braziliensis*

Zur Überprüfung und Quantifizierung der Antimon(III)-Resistenzvermittlung der Konstrukte pcosK5 und -K6 fand eine Transfektion der beiden separat in den *in vitro*-Sb(III)-sensitiven Klon PER002K7 und Klon PER002K11 statt (2.2.3). Resultierende rekombinante Promastigote wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen eingesät. Als Kontrolle dienten die mit dem leeren Vektor pcosTL transfizierten Parasiten PER002K7[pcosTL] bzw. PER002K11[pcosTL]. Die Zelldichten wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bestimmt (2.2.1). Die Ergebnisse von drei bzw. fünf unabhängigen Versuchen sind als Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.29 zusammengefasst.

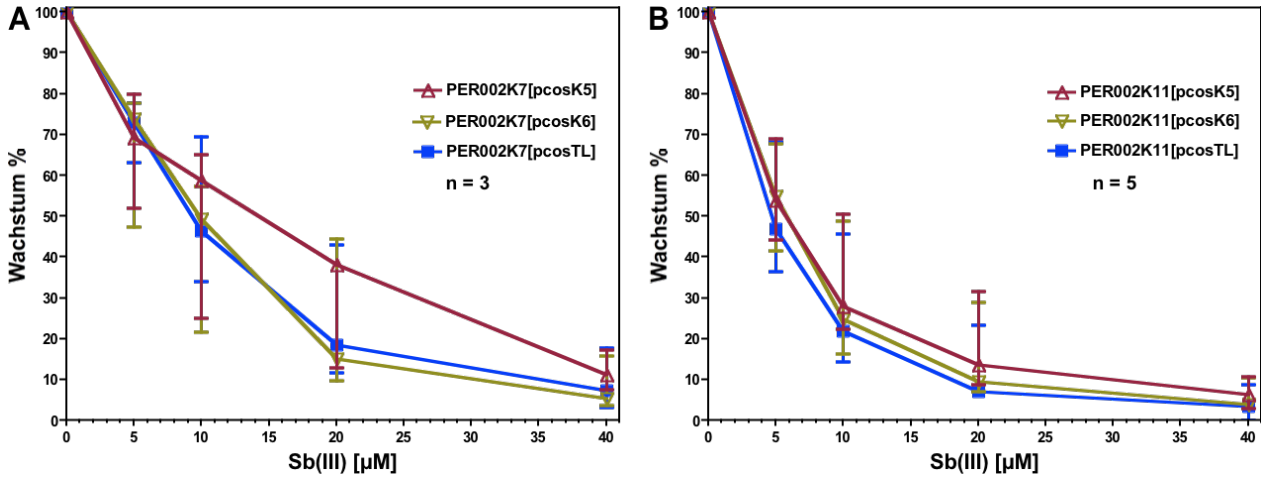

Abb. 3.29 Effekt von Sb(III) auf die Vermehrung von PER002K7[pcosTL], -[pcosK5] und -[pcosK6] sowie von PER002K11[pcosTL], -[pcosK5] und [pcosK6]. (A) Die rekombinanten Parasiten PER002K7[pcosTL], -[pcosK5] und -[pcosK6] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml im Medium S10/2 (modifiziertes Schneider's *Insect Medium*) eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zelldichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an. (B) Ebenso wurden die rekombinanten Parasiten PER002K11[pcosTL], -[pcosK5] und -[pcosK6] getestet. Hier ergibt sich der dargestellt Median aus fünf unabhängig durchgeführten Experimenten.

Wie in Abbildung 3.29 zu sehen ist, konnte kein *in vitro*-Wachstumsvorteil unter Sb(III)-Einwirkung der untersuchten rekombinanten Parasiten in diesem Versuchssystem nachgewiesen werden. Auffällig sind die stark schwankenden Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen untereinander. Die nicht dargestellten Wachstumskontrollen der untersuchten rekombinanten Populationen zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen *in vitro*-Wachstumsunterschied.
Ebenfalls stark inkonsistente Ergebnisse des *in vitro*-Wachstums unter Sb(III)-Einwirkung der Populationen *L. braziliensis* PER002K7 und PER002K11 wurden im gleichen Versuchssystem mit den Cosmid-Derivaten pcosD2 und -D3 beobachtet, während hingegen die rekombinanten Populationen PER002K7[pcosC1.6] und PER002K11[pcosC1.6] einen konsistenten *in vitro*-Wachstumsvorteil unter Sb(III)-Einwirkung gegenüber den Kontrollpopulationen aufwiesen.
Neuere Informationen aus dem *L. braziliensis*-Genomprojekt machten deutlich, dass das Genom von *L. braziliensis* im Gegensatz zu den Genomen von *L. major* und *L. infantum* über putative Gene verfügt, die für eine RNAi Maschinerie essentiell sind [95]. Somit besteht die Möglichkeit, dass RNAi Effekte in *L. braziliensis* auftreten können. Solche Effekte können eine Erklärung für die hier ermittelten inkonsistenten Ergebnisse sein.

3.4.5 Wechsel des Versuchsorganismus von *L. braziliensis* zu *L. infantum*

Um für unsere Untersuchungen RNAi Effekte auszuschließen, wurden die nachfolgenden Versuche mit den identifizierten Sequenzabschnitten aus *L. braziliensis* in der *Leishmania* Art *L. infantum* (Subgenus *Leishmania* (Alte Welt), Tab. 2.1) durchgeführt. Der verwendete Klon *L. infantum* MON-1, Klon 3511 (Tab. 2.1) wird im folgenden mit MON-1K3511 bezeichnet. Dieser Organismus wurde bereits erfolgreich in der Funktionellen Komplementation eingesetzt [78]. Tests auf RNAi Effekte in den *Leismania* Arten *L. major* und *L. donovani,* die ebenfalls der Untergattung *Leishmania* (Alte Welt) angehören, waren negativ [96]. Damit ist Wahrscheinlichkeit, dass *L. infantum* über RNA-Interferenz verfügt, sehr gering.

3.4.5.1 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosC1.6 in *L. infantum*

Zunächst sollte geklärt werden, ob die *L. braziliensis-insert*-DNA im Cosmid pcosC1.6 in *L. infantum* ebenfalls das *in vitro*-Wachstum unter Sb(III)-Einwirkung verbessert. Dazu wurde der Klon MON-1K3511 mit dem Cosmid pcosC1.6 und dem leeren Vektor (Kontrolle) separat transfiziert (2.2.3). Resultierende rekombinante Promastigote wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen eingesät. Die Zelldichten wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bestimmt (2.2.1). Die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen sind als Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.30 zusammengefasst.

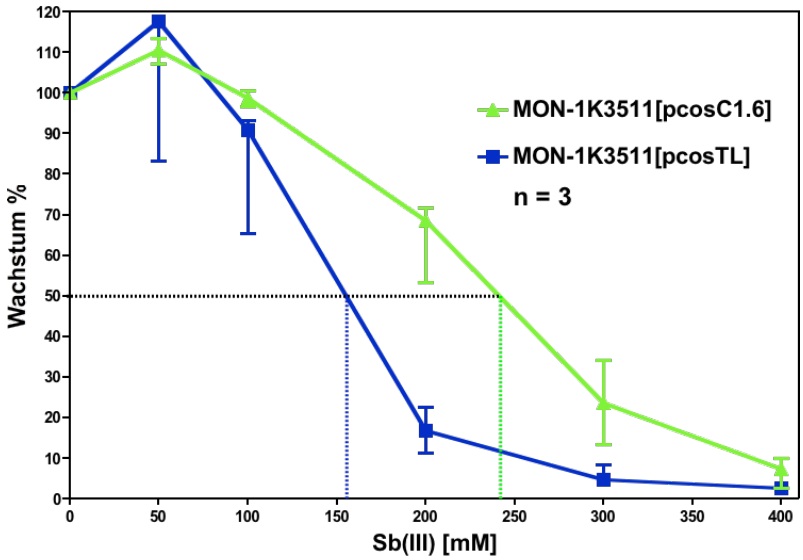

Abb. 3.30 Effekt von Sb(III) auf die Vermehrung von MON-1[pcosTL] und -[pcosC1.6]. Die rekombinanten Parasiten MON-1K3511[pcosTL] und -[pcosC1.6] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml im modifizierten M199 Medium eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zelldichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an. Mit den gestrichelten Linien sind die jeweiligen IC_{50}-Werte für Sb(III) angedeutet.

Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, besitzt MON-1K3511[pcosC1.6] einen etwa 1,6-fach höheren IC_{50}-Wert für Sb(III) (bei 247 µM) als die Kontrolle PER002K7[pcosTL] (bei 155 µM). Damit konnte gezeigt werden, dass das Cosmid pcosC1.6 mit der *insert*-DNA aus *L. braziliensis* den promastigoten Parasiten *L. infantum* MON-1K3511 unter Sb(III)-Einwirkung einen *in vitro*-Wachstumsvorteil vermittelt, wenn auch weniger stark ausgeprägt als im Vergleich zum *L. braziliensis* Klon PER002K7 (etwa 2,5-fach höherer IC_{50}-Wert für Sb(III), Abb. 3.16).

3.4.5.2 Selektion S9 und S10: Kompetitive Sb(III)-Selektion von pcosC1.6 und seinen Derivaten in *L. infantum*

Mit dem Ergebnis, dass die eingebrachte *L. braziliensis* DNA in den *L. infantum* Parasiten vergleichbare *in vitro*-Wachstumseffekte unter Sb(III)-Druck vermittelt, sollten nun weitere kompetitite Selektionen mit den vorhandenen Cosmid-Derivaten von pcosC1.6 im *L. infantum*-System durchgeführt werden. Hierfür wurde das Panel der verwendeten DNA-Konstrukte um pcosK5 und -K6 (Abb. 3.28) erweitert. Hierdurch sollte geklärt werden, ob die Sb(III)-Resistenz einem der beiden identifizierten Leserahmen (Nr. 210 bzw. 220) zugeordnet werden kann.

3.4.5.2.1 Selektion S9 und S10: Transfektion von MON-1K3511 mit pcosC1.6, -D1, -D2, -K2, -K4, -K5 und -K6

Es wurden sechs Cosmid-Derivate (pcosD1, -D2, -K2, -K4, -K5 und -K6) und das Cosmid pcosC1.6 in den *L. infantum* Klon MON-1K3511 transfiziert. Dabei erfolgte die Transfektion (2.2.3) separat mit 50 µg der jeweiligen Cosmid-DNA, wie in Abbildung 3.31 schematisch dargestellt ist. Parasiten der resultierenden rekombinanten Populationen (MON-1K3511[pcosC1.6], -[pcosD1], -[pcosD2], -[pcosK2], -[pcosK4], -[pcosK5] und -[pcosK6]) wurden zu gleichen Teilen gemischt und

in die nachfolgenden Selektionen eingesetzt. Das entstandene Gemisch wurde als MON-1K3511-G5 bezeichnet. Als Negativkontrolle für die anschließende Selektion diente auch hier die mit dem leeren Vektor pcosTL transfizierte Population MON-1K3511 (MON-1K3511[pcosTL]).

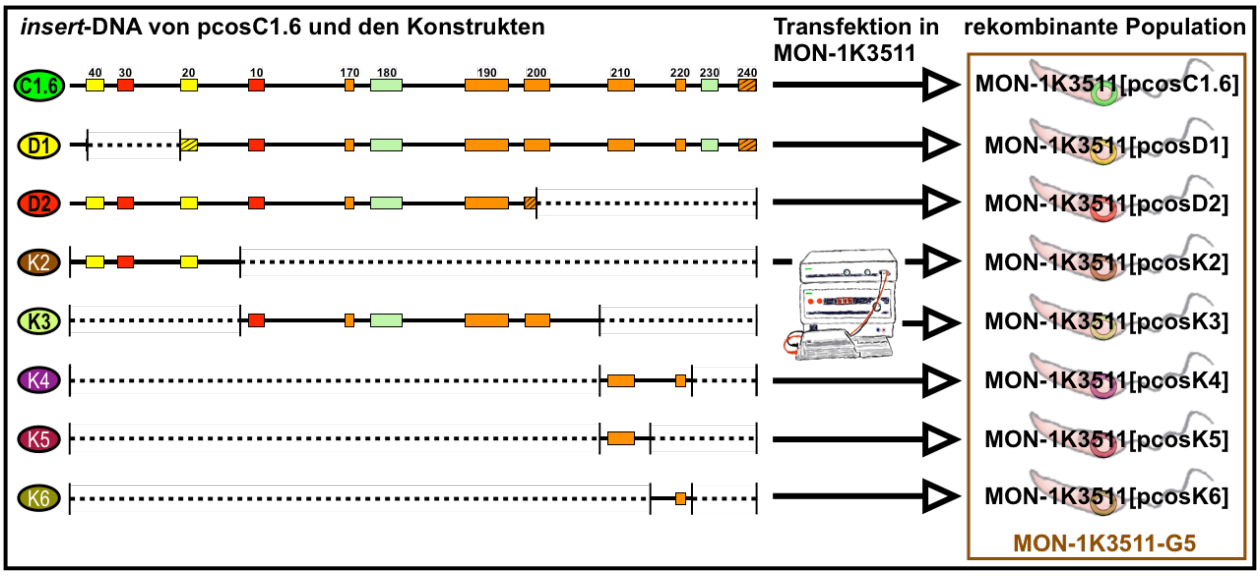

Abb. 3.31 Schematische Darstellung der Transfektion der Cosmid-Derivate und Cosmid C1.6 in Klon MON-1K3511 zur Vorbereitung der Selektionen S9 und S10. Das Cosmid pcosC1.6 und die Konstrukte pcosD1, -D2, -K2, -K3, -K4, -K5 und K6 wurden separat in MON-1K3511 transfiziert. Die erzeugten rekombinanten Populationen wurden zu gleichen Teilen gemischt. Dieses Gemisch (MON-1K3511-G5, braune Umrahmung) wurde dann in den Selektionen S9 und S10 eingesetzt.

3.4.5.2.2 Verlauf der Selektionen S9 und S10

In den Selektionen S9 und S10 wurde das Populationsgemisch MON-1K3511-G5 mit jeweils einer Zelldichte von 4 x 10^5 Zellen/ml im modifizierten M199 Medium (2.1.9) eingesät. In der Selektion S9 wurde das Populationsgemisch mit 400 µM Sb(III) inkubiert, während in der Selektion S10 das gleiche Populationsgemisch mit 500 µM Sb(III) inkubiert wurde. Der Sb(III)-Selektionsdurck wurde bei Selektion S9 für 21 Tage und bei Selektionen S10 für 12 Tage aufrecht erhalten. Der schematische Ablauf dieser kompetitiven Selektionen ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

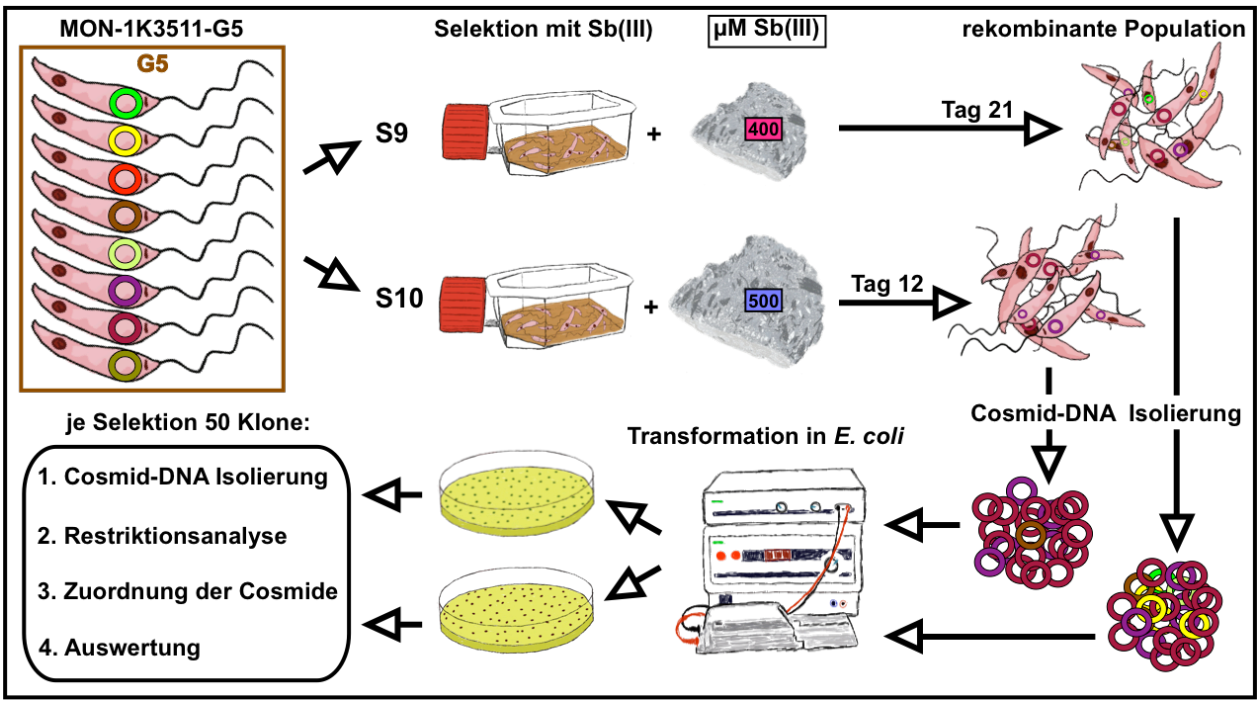

Abb. 3.32 Schematische Darstellung der Selektion S9 und S10 und der Identifizierung der Cosmid-Derivate. Das rekombinante Populationsgemisch MON-1K3511-G5 (G5) wurde mit einer Zelldichte von 4 x 10^5 Zellen/ml in je 10 ml modifizierten M199 Medium eingesät. In Selektion S9 wurde die Population mit 400 µM Sb(III) für 21 Tage bzw. in Selektion S10 mit 500 µM Sb(III) für 12 Tage kultiviert. Aus den überlebenden Promastigoten wurde die Cosmid-DNA isoliert und in *E. coli* transformiert. Die Cosmid-DNA aus je 50 *E. coli*-Klonen wurde durch *Eco*RV und *Xba*I basierte RFLP-Analysen identifiziert und den Cosmid-Konstrukten bzw. dem Cosmid pcosC1.6 zugeordnet.

Ebenfalls wurden zu jeder Selektion die Population MON-1K3511[pcosTL] als Negativkontrolle mit den entsprechenden Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Als Wachstumskontrollen wurde das rekombinante Populationsgemisch MON-1K3511-G5 ohne Sb(III)-Selektionsdruck über den gleichen Zeitraum kultiviert.

Das Wachstum der Zellen unter Sb(III)-Selektionsdruck wurde durch mikroskopische Überwachungen und Bestimmungen der Zelldichten (2.2.1) dokumentiert. In Abbildung 3.33 ist der Verlauf der Selektionen S9 und S10 schematisch dargestellt.

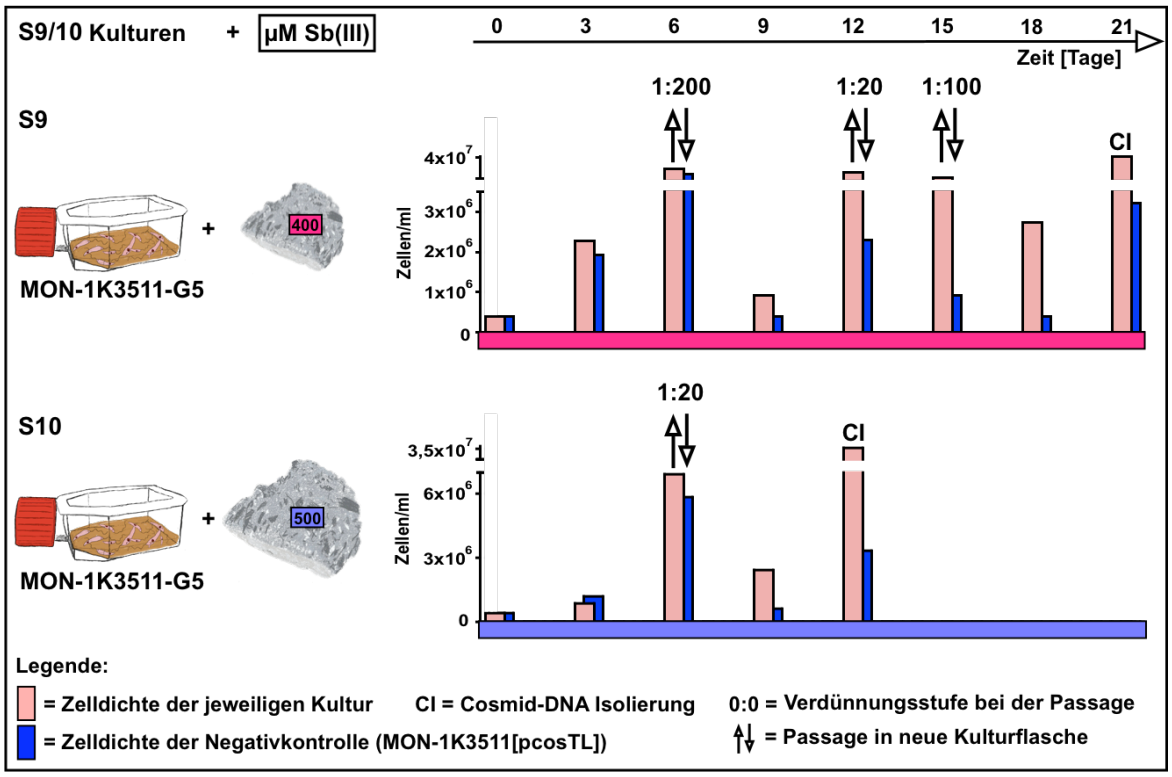

Abb. 3.33 Schematische Darstellung der Verläufe der Selektionen S9 und S10. Das rekombinante Populationsgemisch MON-1K3511-G5 und die jeweiligen Negativkontrollen (MON-1K3511[pcosTL]) wurden mit jeweils einer Zelldichte von 4 x 10^5 Zellen in 10 ml modifiziertes M199 Medium eingesät und mit 400 µM Sb(III) (Selekion S9) bzw. 500 µM Sb(III) (Selekion S10) inkubiert. Der Verlauf der Kulturen MON-1K3511-G5 der Selektion S9 bzw. S10 sind jeweils in einem Zeitstrahl als Balkendiagramm dargestellt (hellrot). Die entsprechenden Kontroll-populationen (MON-1K3511[pcosTL]) sind im Hintergrund ebenfalls als Balkendiagramm dargestellt (blau). Die Zelldichten wurden unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Die Passagen und Verdünnungen der Kulturen sind am entsprechenden Tag eingezeichnet. Unter dem jeweiligen Zeitstrahl ist die in der Kultur vorliegende Antimon(III)-Konzentrationen farbig abgebildet. Am Tag 21 (Selektion S9) bzw. am Tag 12 (Selektion S10) wurden aus den überlebenden Parasiten die Cosmid-DNA isoliert (CI) und stellt das jeweilige Ende der Selektion dar.

Verdünnungen der Kulturen der jeweiligen Selektion erfolgten simultan, nachdem das Populations-gemisch MON-1K3511-G5 in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten war. Nach einer 21-tägigen (S9) bzw. zwölftägigen (S10) *in vitro*-Kultivierung unter Sb(III)-Selektionsdruck konnte ein deutlicher Wachstumsvorteil der Kulturen des Gemisches MON-1K3511-G5 gegenüber der entsprechenden Negativkontrolle (MON-1K3511[pcosTL]) festgestellt werden. Die Cosmid-DNA Isolierungen wurden aus den überlebenden Zellen vom Tag 21 (S9) bzw. vom Tag 12 (S10) durchgeführt. Ausserdem fand eine Cosmid-DNA Isolierung der jeweiligen Wachstumskontrolle zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 12 und Tag 21 statt.

3.4.5.2.3 Selektion S9 und S10: Auswertung der Cosmidtypen

Die isolierten Cosmide aus den Selektionen S9 und S10 und den Wachstumskontrollen wurden mittels *Eco*RV- und *Xba*I-basierten Analysen des RFLP (2.2.11.2) den Cosmid-Derivaten zugeordnet. Dabei wurden jeweils 50 *E. coli*-Klone pro Zeitpunkt untersucht. In Abbildung 3.34 sind die Cosmidverteilungen der Selektionen S9 und S10 mit den zugehörigen Kontrollen dargestellt. Exemplarisch sind in dieser Abbildung die RFLP-Analysen der Selektion S10 abgebildet.

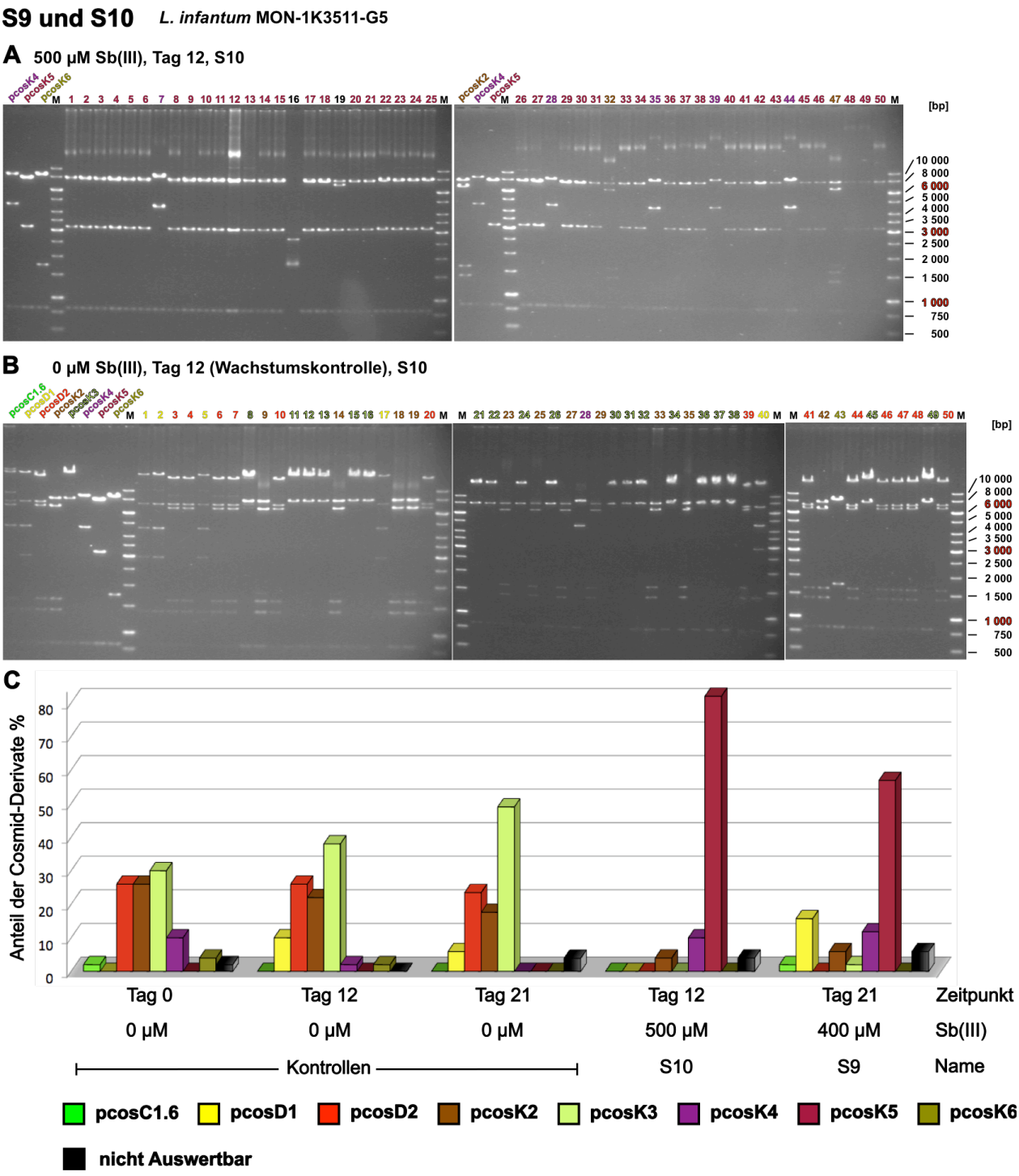

Abb. 3.34 RFLP der isolierten Cosmide und die relative, prozentuale Cosmidverteilung der kompetitiven Selektionen S9 und S10. *Eco*RV/*Xba*I-RFLP von je 50 *E. coli*-Klonen pro Selektionszeitpunkt bzw. Wachstumskontrollen wurden den Cosmid-Derivaten zugeordnet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in je 1 %-igen Agarosegelen. Durch eine Färbung mit Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. In (A) sind die Agarosegele mit den Proben der Selektion S10 gezeigt. Die zugehörigen Proben der Wachstumskontrolle sind in (B) abgebildet. Als DNA-Längenstandard (M) diente der *GeneRuler*™ 1 kb *Ladder*, dessen Fragmentgrößen jeweils am rechten Bildrand angegeben sind. Als Balkendiagramm sind die relativen, prozentualen Cosmidverteilungen der Selektionen S9 (21-tägige *in vitro*-Selektion mit 400 µM Sb(III)) und S10 (zwölftägige *in vitro*-Selektion mit 500 µM Sb(III)) und den Wachstumskontrollen dargestellt.

Aus Abbildung 3.34 (C) wird zunächst deutlich, dass innerhalb einer relativ kurzen *in vitro*-Kultivierung (3 Tage zum Anwachsen des Zellmaterials für die Cosmidisolierung, 2.2.7.2) in der

Wachstumskontrolle am Tag 0 eine ungleiche prozentuale Identifizierung der zu gleichen Teilen eingesetzten Cosmid-Derivate auftrat. Dabei waren die Derivate pcosD2, -K2 (je 26 % Häufigkeit) und -K3 (30 % Häufigkeit) am Stärksten vertreten, was auf einen möglichen *in vitro*-Wachstumsvorteil dieser Cosmid-tragenden Zellen deuten kann. Die schon am Tag 0 sichtbare Dominanz des Cosmid-Derivats pcosK3 wurde am Tag 12 (38 % Häufigkeit) bzw. am Tag 21 (49 % Häufigkeit) verstärkt. Diese konsistenten Ergebnisse sprechen für reproduzierbare Ergebnisse der Methode der Funktionellen Komplementation mit *L. braziliensis* Sequenzabschnitten im *L. infantum*-System.

Im Gegensatz zu den Wachstumskontrollen wurde das Konstrukt pcosK5 (trägt ausschließlich den Leserahmen *Lb*-210) in beiden Sb(III)-Selektionen (S9 und S10) als jeweils dominantes Cosmid-Derivat identifiziert. Der prozentuale Anteil der Cosmidverteilung von Konstrukt pcosK5 in S10 mit 500 µM Sb(III)-Selektionsdruck von 82 % bzw. in S9 mit 400 µM Sb(III)-Selektionsdruck von 56,9 % deutet darauf hin, dass durch Überexpression des Gens 210 die Promastigoten einen *in vitro*-Wachstumsvorteil mit zunehmendem Sb(III)-Selektionsdruck aufweisen.

In S10 wurde zudem das Cosmid-Derivat pcosK4 mit 10 % Häufigkeit identifiziert, dass zu Konstrukt pcosK5 eine Sequenzübereinstimmung im Leserahmen *Lb*-210 aufweist. In S9 wurden neben pcosK5 die Cosmid-derivate pcosD1 (15,7 % Häufigkeit), pcosK4 (11,8 % Häufigkeit) und das Cosmid pcosC1.6 (2 % Häufigkeit) identifiziert, die alle zu dem Konstrukt pcosK5 eine Sequenzüberlappung im Leserahmen *Lb*-210 aufweisen.

Die weiterhin in den Selektionen identifizierten Konstrukte pcosK2 (4 % Häufigkeit (S10) bzw. 5,9 % Häufigkeit (S9)) und pcosK3 (2 % Häufigkeit (S9)) sind den oben erwähnten Cosmid-Derivaten zuzuordnen, die in den jeweiligen Kontrollpopulationen am häufigsten identifiziert worden waren und ist somit eher in einem Zusammenhang mit allgemeinen *in vitro*-Wachstumsvorteilen zu sehen.

Damit haben sich mit 92 % Häufigkeit (S10) bzw. 86,4 % Häufigkeit (S9) Cosmid-Derivate in der überlebenden Population durchgesetzt, die eine eingegrenzte Sequenzübereinstimmung im Leserahmen *Lb*-210 aufweisen. Das deutet darauf hin, dass sich der in den vorhergehenden Selektionen identifizierte resistenzvermittelnde Bereich auf den Leserahmen *Lb*-210 eingrenzen lässt. Im Gegensatz zu den Kontrollversuchen in *L. braziliensis* konnte ein *in vitro*-Wachstumsvorteils durch die Überexpression der Gene *Lb*-210 und *Lb*-220 im *L. infantum*-System nicht bestätigt werden.

3.4.5.3 Überprüfung der Sb(III)-Resistenzvermittlung von pcosK5 in *L. infantum*

Um den resistenzvermittelnden Effekt des Leserahmens *Lb*-210 im *L. infantum*-System zu bestätigen, sollte zunächst eine Überprüfung und Quantifizierung der Antimon(III)-Resistenzvermittlung des Konstrukts pcosK5 in *L. infantum* erfolgen. Dazu wurde das Konstrukt pcosK5 und als Kontrollen das Konstrukt pcosK6 (trägt Leserahmen *Lb*-220) und der leere Vektor pcosTL separat in den Klon MON-1K3511 transfiziert (2.2.3). Resultierende rekombinante Promastigote wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen eingesät. Die Zelldichten wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bestimmt (2.2.1). Die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen sind als Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.35 zusammengefasst.

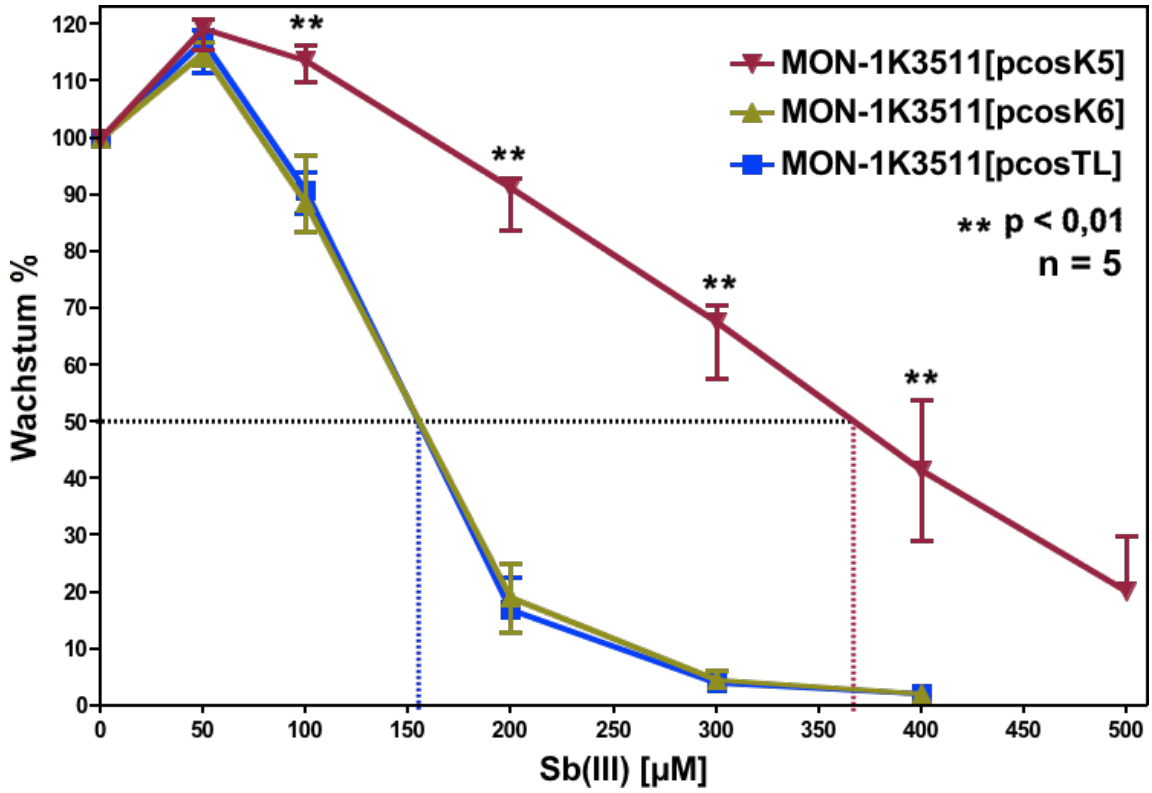

Abb. 3.35 Effekt von Sb(III) auf die Vermehrung von MON-1K3511[pcosTL], -[pcosK5] und -[pcosK6]. MON-1K3511[pcosTL], -[pcosK5] und -[pcosK6] wurden mit jeweils einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml in modifiziertes M199 Medium eingesät und mit unterschiedlichen Sb(III)-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zelldichten unter Nutzung des CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus fünf unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an. Mit den gestrichelten Linien sind die jeweiligen IC_{50}-Werte für Sb(III) angedeutet. Die mit Sternen gekennzeichneten p-Werte wurden mit dem *Mann-Whitney U Test* ermittelt. Mit den gestrichelten Linien sind die jeweiligen IC_{50}-Werte für Sb(III) angedeutet.

Wie in Abbildung 3.35 zu sehen ist, besitzt MON-1K3511[pcosK5] einen etwa 2,3-fach höheren IC_{50}-Wert für Sb(III) (bei 365 µM) als die Kontrolle MON-1K3511[pcosTL] (bei 155 µM). Im Gegensatz dazu verhält sich das Wachstum der rekombinanten Parasiten *L. infantum* MON-1K3511 mit dem *L. braziliensis* Leserahmen *Lb*-220 (Konstrukt pcosK6) unter Sb(III)-Einwirkung wie die Vektorkontrolle. Damit konnte gezeigt werden, dass ausschließlich der *L. braziliensis* Leserahmen *Lb*-210 (Konstrukt pcosK5) den promastigoten Parasiten *L. infantum* MON-1K3511 unter Sb(III)-Selektionsdruck einen *in vitro*-Wachstumsvorteil vermittelt.

3.4.5.4 Überprüfung der Genexpression des *L. braziliensis* Leserahmens *Lb*-210 in *L. infantum* MON-1K3511

Um zu überprüfen, ob der in *L. infantum* Parasiten eingeführte *L. braziliensis* Leserahmen Nr. 210 (*Lb*-210) exprimiert wird, wurde die Genexpression mittels semi-quantitativer *real time* RT-PCR (2.2.19) ermittelt. Die erzeugte cDNA aus den rekombinanten Promastigoten *L. infantum* Klon MON-1K3511[pcosTL], -[pcosC1.6], -[pcosK5], und -[pcosK6] diente als *template*-DNA. Als endogene Kontrolle wurde der ermittelte Ct-Wert von dem Gen *L. infantum* Actin verwendet.

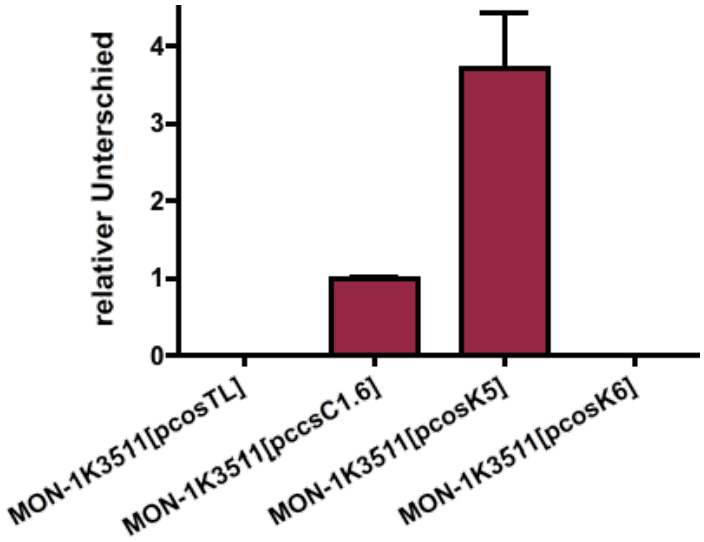

Abb. 3.36 Relativer Unterschied der Genexpression des *L. braziliensis* Leserahmens Nr. 210 (LbrM20_V2.0210) in *L. infantum* Klon MON-1K3511[pcosTL], -[pcosC1.6], -[pcosK5], und -[pcosK6]. Die RNA-Isolierung aus 2 x 10^7 rekombinanten Promastigoten MON-1K3511[pcosTL], -[pcosC1.6] -[pcosK5] und -[pcosK6] erfolgte aus Kulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die aus der RNA hergestellte cDNA wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden, spezifisch für einen Sequenzabschnitt auf dem Leserahmen Nr. 210 amplifiziert. Als endogene Kontrolle wurde die Amplifizierung von *L. infantum* Actin durchgeführt. Die Expression (der relative Unterschied, RU) wurde mittels der ΔΔCt-Methode ermittelt. Der jeweils dargestellte Median ergibt sich aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der Fehlerbalken zeigen den Schwankungsbereich an.

Aus Abbildung 3.36 geht zunächst hervor, dass in den rekombinanten Parasiten MON-1K3511[pcosTL] und -[pcosK6] keine *Lb*-210-Genexpression nachgewiesen werden konnte. Das ergibt sich aus der Spezifität der eingesetzten Oligonukleotide für die *L. braziliensis* Sequenz. Im Gegensatz dazu konnte eine *Lb*-210-Genexpression in den rekombinanten Parasiten MON-1K3511[pcosC1.6] und -[pcosK5] nachgewiesen werden, die beide das *Lb*-210 Gen auf der eingefügten Cosmid-DNA tragen. Damit konnte gezeigt werden, dass das eingebrachte *L. braziliensis* Gen *Lb*-210 in den rekombinanten *L. infantum* Parasiten transkribiert wird und als RNA in den promastigoten Zellen vorliegt. Die relative *Lb*-210-Genexpression der rekombinanten Parasiten MON-1K3511[pcosK5] ist mehr als drei mal so hoch wie in den pcosC1.6-tragenden Parasiten MON-1K3511[pcosC1.6]. Die ermittelten *Lb*-210-Genexpressionsraten der Parasiten MON-1K3511[pcosC1.6] und -[pcosK5] stehen im direkten Einklang mit den ermittelten Anstiegen der IC_{50}-Werte für Sb(III) (MON-1K3511[pcosC1.6] versus -[pcosTL] etwa 1,6-fach (Abb. 3.30) und MON-1K3511[pcosK5] versus -[pcosTL] etwa 2,3-fach (Abb. 3.35)) sowie mit den Sb(III)-Selektionsergebnissen aus S9 und S10 (Abb.3.34).

3.5 Charakteristika des Genprodukts von *Lb*-210 (LbrM20_V2.0210)

3.5.1 Erweiterte Datenbank-Recherchen zum Gen *Lb*-210

Einfache Datenbank-Recherchen von Gen *Lb*-210 lieferten allgemeine Daten zum Molekulargewicht, zum isoelektrischen Punkt und zur Peptid-Größe. Das Produkt des Gens *Lb*-210 wird als konserviertes, hypothetisches Protein ohne bekannte Funktion in den Datenbanken geführt (Tab. 3.3). Um weitere Anhaltspunkte zur biologischen Funktion von Gen *Lb*-210 zu erhalten, wurden weitergehende Datenbankrecherchen durchgeführt.

Recherchen nach Sequenz-Homologien des Gens *Lb*-210 auf Protein-Ebene unter Verwendung des Programms www.ebi.ac.uk/Tools/ führten zu 13 homologen *L. braziliensis*-Genen, die in Tabelle 3.7 aufgelistet sind.

Tabelle 3.7: Homologe Gene zu *Lb*-210

Name	AA	Produkt	S	I	P	E-Wert	DUF1935
LbrM20_V2.0210	518	hypothetisches Protein, konserviert	1532	100	100	1,00E-168	4
LbrM20_V2.0200	491	hypothetisches Protein, konserviert	1330	37	53	1,00E-144	4
LbrM04_V2.0490	856	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	457	28	40	3,00E-43	1
LbrM14_V2.0830	115	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	402	38	58	8,00E-37	1
LbrM14_V2.0820	115	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	400	38	58	1,00E-36	1
LbrM17_V2.1070	444	hypothetisches Protein, konserviert	381	36	52	2,00E-34	1
LbrM31_V2.0510	863	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	360	20	32	6,00E-32	1
LbrM35_V2.3400	1404	Adenylatcyclase Rezeptor-ähnliches Protein	346	25	39	2,00E-30	1
LbrM25_V2.2240	139	hypothetisches Protein, konserviert	322	28	42	1,00E-27	1
LbrM31_V2.0590	947	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	318	19	33	4,00E-27	1
LbrM31_V2.0580	890	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	316	19	32	7,00E-27	1
LbrM31_V2.0620	714	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	292	17	34	4,00E-24	1
LbrM25_V2.1350	705	Calpain-Familie Cysteinprotease-ähnliches Protein	282	20	32	6,00E-23	1
LbrM31_V2.0520	1497	Calpain-ähnliche Cysteinpeptidase, putativ	244	19	36	2,00E-18	1

AA = Anzahl der Aminosäuren
S = *Score*
I = Sequenzidenität der Aminosäuren in %
P = Gesamt-Aminosäuresequenzähnlichkeit in %
DUF1935 = Anzahl der identifizierten Proteindomänen DUF1935 unbekannter Funktion

Die Tabelle listet homologe Gene zu *Lb*-210 auf, die mit Hilfe des Programms NCBI-blastp (Modus PSI-Blast) ermittelt wurden (www.ebi.ac.uk/Tools). Die Anzahl der Proteindomänen DUF1935 der jeweiligen Sequenzen wurden mit dem Programm Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) ermittelt.

Aus Tabelle 3.7 geht hervor, dass die Produkte mehrerer *Lb*-210-homologer Gene möglichen Funktionen zugeordnet werden. Darunter befindet sich zum einen eine große Gruppe von Genen, deren Produkte Calpain-ähnlichen Cysteinpeptidasen zugeordnet werden. Zum anderen wird ein Gen-Produkt als Adenylatcyclase-Rezeptor-ähnliches Protein beschrieben. Alle identifizierten, *Lb*-210-homologen Gene weisen eine oder mehrere Proteindomänen unbekannter Funktion auf, die mit DUF1935 (*Domain of unknown function,* PFAM *database,* http://pfam.sanger.ac.uk/, Systematischer Name: Pf09149) benannt sind.
Tabelle 3.7 macht zudem deutlich, dass Gen LbrM20_V2.0200 (Leserahmen Nr. 200, *Lb*-200) die höchsten Sequenzübereinstimmungen zu Gen *Lb*-210 aufweist. Gen *Lb*-200 ist ein direkter Nachbar zum Gen *Lb*-210 im *L. braziliensis*-Genom und beide Leserahmen wurden in den Sb(III)-Selektionen untersucht. Dabei wurde ausschließlich der Leserahmen *Lb*-210 als Resistenz-vermittelnd identifiziert (3.4.5). Somit könnten strukturelle Unterschiede dieser Gen-Sequenzen Hinweise auf die Spezifität der Genprodukte und zugleich Hinweise auf den Sb(III)-Resistenzmechanismus liefern. Daher wurden die Datenbankrecherchen auf beide Gene (*Lb*-210 und *Lb*-200) ausgedehnt.

3.5.2 Charakteristika des Gens *Lb*-210 im Vergleich zu Gen *Lb*-200

Das Produkt des Gens *Lb*-200 wird ebenso wie das Genprodukt von *Lb*-210 als konserviertes, hypothetisches Protein in der Datenbank geführt (Tab. 3.3, TriTrypDB, Version 2.1).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Gen *Lb*-200 und *Lb*-210 mit dem Programm MacVector ergab eine Gesamt-Aminosäuresequenzähnlichkeit von 54%, die sich zusammensetzt aus einer Sequenzidenität von 37% und einer Sequenzähnlichkeit von 17%.

Gemeinsam sind beiden Proteinsequenzen je vier repetitive Aminosäuresequenzabschnitte, die jeweils der konservierten Proteindomäne DUF1935 zugeordnet werden können (Tabelle 3.7). Ein direkter Vergleich der Anordnungen dieser Proteindomänen DUF1935 zwischen *Lb*-210 und *Lb*-200 ist in Abbildung 3.37 schematisch dargestellt.

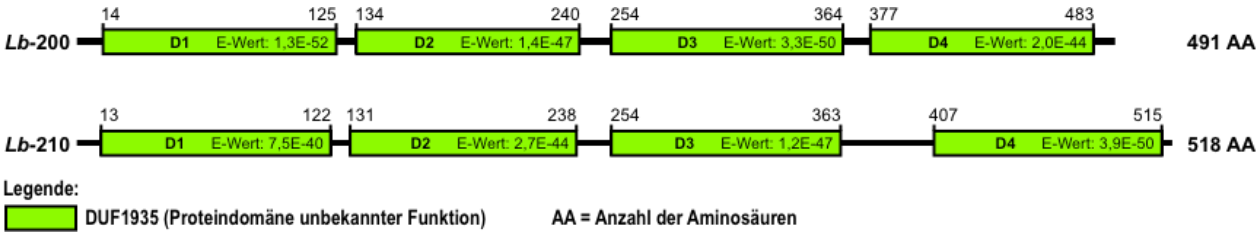

Abb. 3.37 Schematische Darstellung der Proteindomänen DUF1935 in den Proteinsequenzen der Gene *Lb*-200 und *Lb*-210. Die Ermittlung der Proteindomänen auf den Aminosäuresequenzen von *Lb*-200 und *Lb*-210 wurden mit dem Programm Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) durchgeführt. Die Proteindomänen DUF1935 sind jeweils als grüner Kasten dargestellt. Die Position der Start- bzw. Endaminosäuren der einzelnen Domänen sind angegeben. Jede Proteindomäne der Proteinsequenzen *Lb*-200 bzw. -210 wurde mit D1 bis D4 nummeriert. Der E-Wert der jeweiligen Domänen wurde dem Programm Motif Scan (*global models*) entnommen und ist in den jeweiligen Domänen angegeben. Die Anzahl der Aminosäuren (AA) der jeweiligen Sequenzen sind am Ende angegeben.

Wie aus Abbildung 3.37 ersichtlich ist, repräsentieren beide Proteinsequenzen eine konforme Anordnung der vier Proteindomänen DUF1935 Nr. D1, D2, D3 und D4 (D1 - D4). Ein markanter Unterschied dieser Anordnung ist ein Einschub von Aminosäuren zwischen Domäne D3 und D4 in *Lb*-210. Dieser Einschub könnte für abweichende Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Genprodukte von *Lb*-200 bzw. *Lb*-210 verantwortlich sein, die zu Funktionsunterschieden zwischen den Proteinen führen.
Ein Vergleich der Genom-Kontexte der Region um die Gene *Lb*-210 und *Lb*-200 von *L. braziliensis*, *L. major*, *L. infantum* und *T. brucei* ist in Abbildung 3.38 dargestellt.

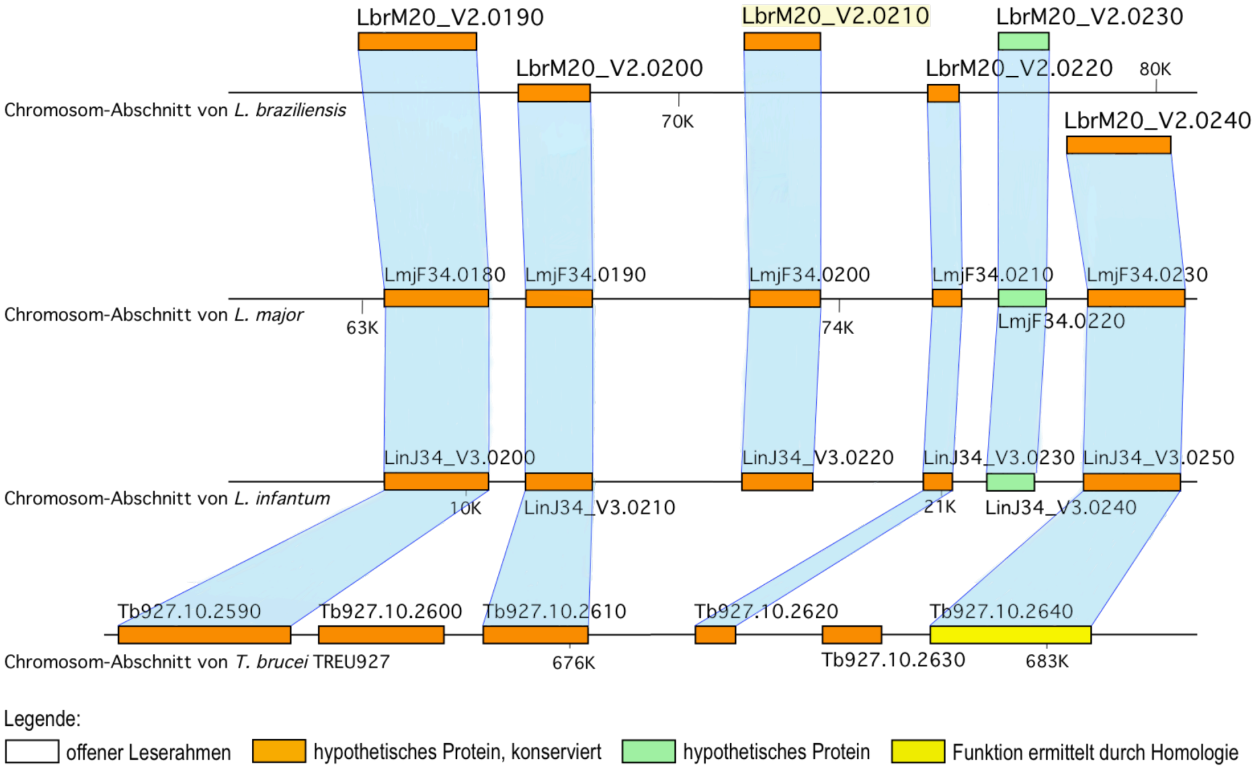

Abb. 3.38 Vergleich genomischer Kontexte von *L. braziliensis* mit *L. major*, *L. infantum* und *T. brucei* der Region um Gen *Lb*-210 bzw. Gen *Lb*-200. Der genomische Kontext der Region um das Gen *Lb*-210 bzw. Gen *Lb*-200 zu dem Genom von *L. major*, *L. infantum* und *T. brucei* ist abgebildet. Die Synthenien der Leserahmen zwischen den Spezies sind hellblau unterlegt (modifiziert nach TriTrypDB, Version 2.1).

Aus Abbildung 3.38 geht hervor, dass es zu *Lb*-210 je ein direktes orthologes Gen in den Genomen von *L. major* (LmjF34.0200) und *L. infantum* (LinJ34_V3.0220) gibt, jedoch nicht in *T. brucei*. Im Gegensatz dazu ist zu *Lb*-200 auch ein orthologes Gen im Genom von *T. brucei* vorhanden. Das deutet darauf hin, dass Gen *Lb*-200 eine Funktion innerhalb der Familie der Trypanosomatidae ausübt, während Gen *Lb*-210 eine spezifische Funktion innerhalb der Gattung *Leishmania* ausübt.

Die Datenbank TriTrypDB listet zu Gen *Lb*-210 bzw. *Lb*-200 drei bzw. neun orthologe Gene auf. In Abbildung 3.39 sind die phylogenetischen Beziehungen zwischen den identifizierten Proteinsequenzen dargestellt. Die Produkte dieser Gene werden ebenfalls als konservierte, hypothetische Proteine in den Datenbanken aufgeführt (TriTrypDB, Version 2.1; GeneDB) und weisen zudem jeweils vier repetitive Proteindomänen DUF1935 auf (MyHits).

Um Erkenntnisse über den Verwandtschaftsgrad und die mögliche Entstehungsgeschichte der Proteinsequenzen *Lb*-210 bzw. *Lb*-200 zu erlangen, wurden phylogenetische Analysen dieser Proteinsequenzen zusammen mit den orthologen Sequenzen durchgeführt.

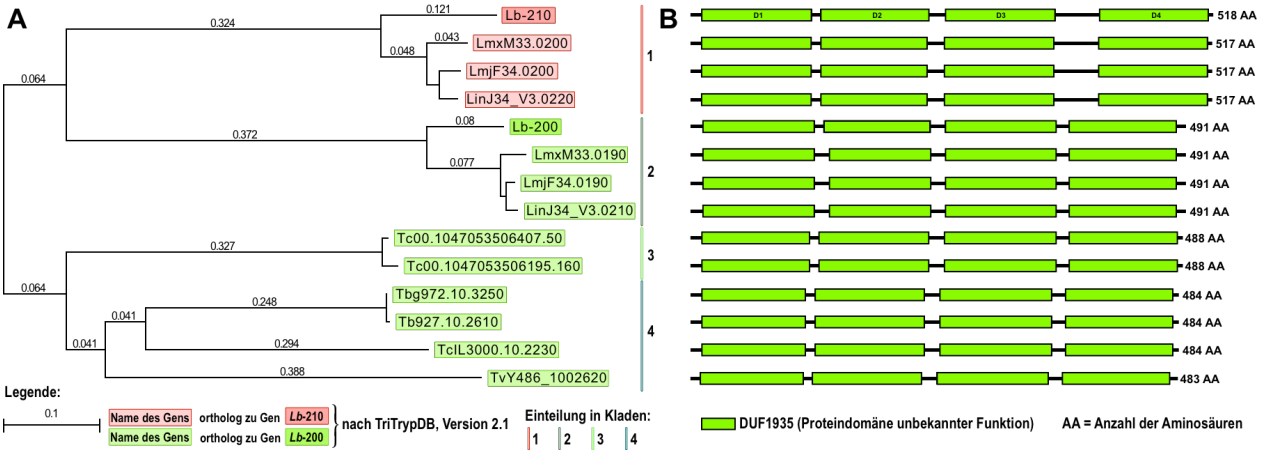

Abb. 3.39 Phylogenetische Beziehung zwischen den Proteinsequenzen der Gene *Lb*-210 und *Lb*-200 mit deren orthologen Genen und die Anordnungen der Proteindomänen DUF1935. (A) Die phylogenetische Beziehung der Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm MacVector erstellt (Methode: *Neighbor Joining, Best tree*, *tie breaking* = *Systemic*, *Gaps distributed proportionally*). Einbezogen wurden orthologe Gene zu Gen *Lb*-200 (grün unterlegt) bzw. orthologe Gene zu Gen *Lb*-210 (rot unterlegt), die mit dem Programm TriTrypDB, Version 2.1 identifiziert wurden. Die Aufteilung in vier Kladen ist mit farbigen Balken (1 - 4) gekennzeichnet. (B) Die Anordnungen der Proteindomänen DUF1935 Nr. D1 bis D4 der zu (A) korrespondierenden Genen ist schematisch abgebildet.

Die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der Gene *Lb*-210 und *Lb*-200 und deren Orthologa in Abbildung 3.39 (A) weist eine Unterteilung in vier Kladen auf. Klade Nr. 1 und 2 wird von den *Leishmania* Genen *Lb*-210 bzw. von *Lb*-200 mit den jeweiligen orthologen Genen gebildet (*Lb*-210-Orthologa bzw. *L.-Lb*-200-Orthologa). In einer dritten und vierten Klade sind die zu *Lb*-200 orthologen *Trypanosoma* Gene eingeordnet *(T.-Lb*-200-Orthologa). Anhand der in Abbildung 3.39 (B) schematisch dargestellten Anordnungen der Proteindomänen DUF1935 wird deutlich, dass sich die Gene der Klade Nr. 1 (*Lb*-210-Orthologa) durch eine Einschub von Aminosäuren zwischen Domäne D3 und D4 abhebt.

Um weitere Informationen über den Unterschied von *Lb*-210 zu *Lb*-200 zu erhalten, wurde eine phylogenetische Analyse der Proteinsequenzen der einzelnen Proteindomänen DUF1935 Nr. D1 bis D4 aller orthologer Gene durchgeführt, die in Abbildung 3.40 dargestellt ist.

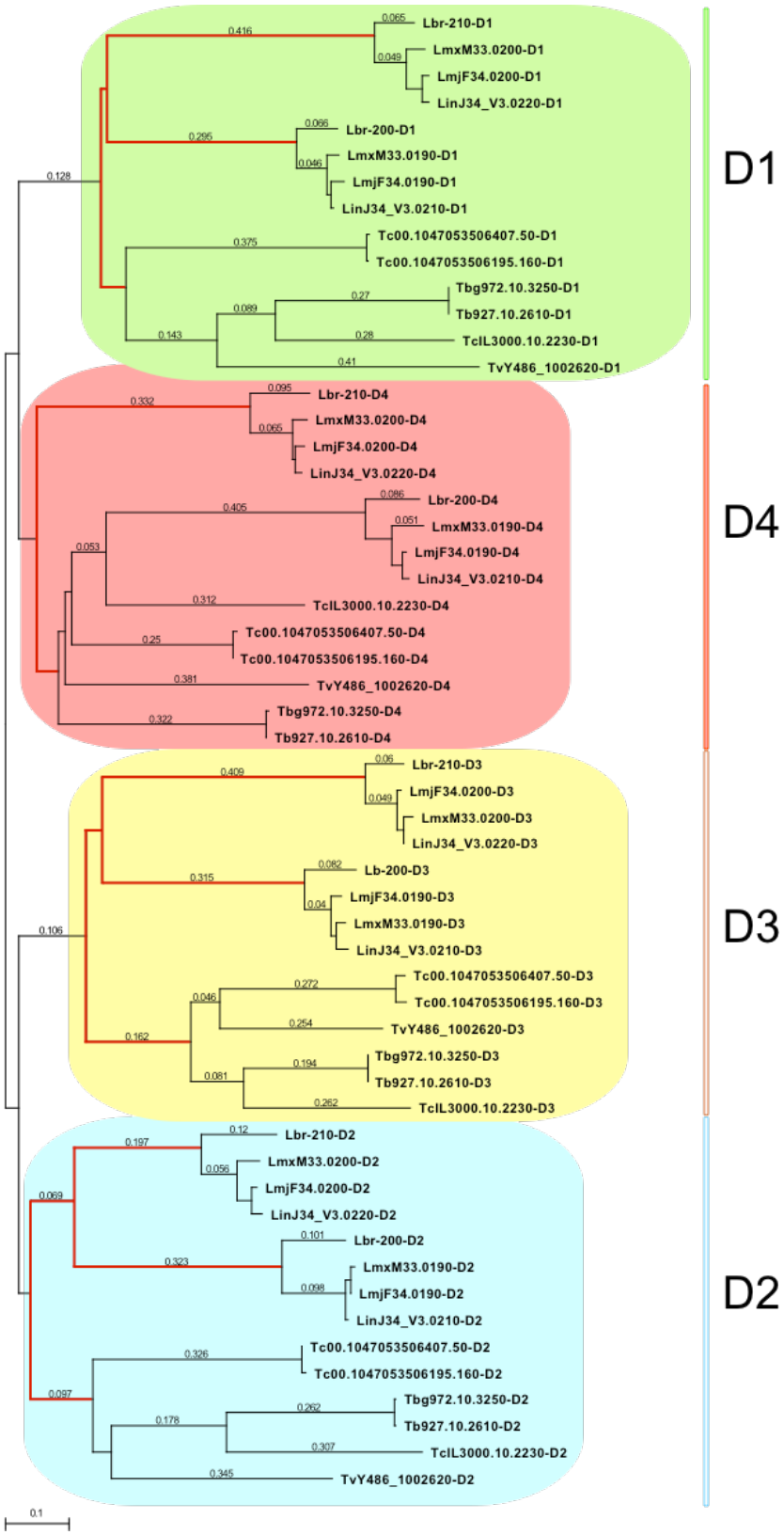

Abb. 3.40 Phylogenetische Beziehung zwischen den Proteindomänen DUF1935 der Proteinsequenzen der Gene *Lb*-210 und *Lb*-200 mit deren Orthologa. Die phylogenetische Beziehung zwischen den jeweiligen Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteindomänen DUF1935 Nr. D1 bis D4 wurde mit dem Programm MacVector erstellt (Methode: *Neighbor Joining, Best tree*, *tie breaking = Systemic*, *Gaps distributed proportionally*). Einbezogen wurden orthologe Gene zu Gen *Lb*-200 bzw. orthologe Gene zu Gen *Lb*-210, die mit dem Programm TriTrypDB, Version 2.1 identifiziert wurden. Die eingeteilten Kladen wurden farblich markiert und mit D1 bis D4 benannt. Die rot unterlegten genetischen Distanzen weisen auf Unterschiede zwischen den Kladen hin.

Aus Abbildung 3.40 geht hervor, dass sich vier Kladen, D1 bis D4, bilden. In jeder dieser Kladen gruppieren sich die Sequenzen mit der gleichen Domänen-Nummer. Das bedeutet, dass die Domänen der jeweiligen Position höhere Übereinstimmungen zu den gleich positionierten Domänen eines orthologen Gens aufweisen als zu den weiteren Domänen innerhalb des gleichen Proteins. Das deutet darauf hin, dass die einzelnen Domänen eines Proteins spezifische Aufgaben erfüllen und sie nicht innerhalb eines Proteins austauschbar sind.
Ein Vergleich der Untergruppen in den Kladen D1 bis D3 (Abb 3.40) zeigt eine sehr ähnliche Aufteilung in jeweils vier Gruppen, wie sie in den phylogenetischnen Untersuchungen der Gesamt-Proteinsequenzen (Abb. 3.39) beobachtet wurde. In der Klade D4 hingegen heben sich die Gene der *Lb*-210-Orthologa deutlich von den Genen der *L.-, bzw. T.-Lb*-200-Orthologa ab (Abb. 3.40, rot unterlegte genetische Distanzen). Das bedeutet, dass der genetische Verwandtschaftsgrad der Domänen D4 der *Lb*-210-Orthologa zu den äquivalenten Domänen der *L.-, bzw. T.-Lb*-200-Orthologa weiter entfernt sind als es bei den Domänen D1 bis D3 der Fall ist. Das deutet darauf hin, dass sich die Domäne D4 der *Lb*-210-Orthologa aufgrund von Evolutionsfaktoren divergent zu der Domäne D4 der *Lb*-200-Orthologa entwickelt hat und dadurch möglicherweise den Proteinen ein anderes Wirkungsfeld ermöglicht.

Weitere Proteinsequenzanalysen nach möglichen Transmembrandomänen, Signalsequenzen, GPI-Ankern, funktionalen Sequenzen und Hinweisen zur Lokalisation wurden durchgeführt. In Tabelle 3.8 sind die Ergebnisse der Analysen und die verwendeten Programme zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Charakteristika der Proteine *Lb*-210 und *Lb*-200 im Vergleich

Eigenschaften	*Lb*-210	*Lb*-200	Quelle(n)
Molekulare Masse	58038 Da	56064,8 Da	A
Isoelektrischer Punkt	pH 4,74	pH 4,90	A/B
Gesamtladung	-24	-19	B
Proteindomänen	4 x DUF1935	4 x DUF1935	C/D/O
Signalsequenzen	0	0	D/E/P
Transmembrandomänen	0	0	D/F
Transmembrandomänen	1	1	P
GPI-Anker	0	0	G/H
9aa TAD	1	0	I
N-terminale Myristoylierung	0	0	J
N-Glykosylierungsstellen	4	5	K - M
Phosphorylierungsstellen	8	12	K - M
Myristoylierungsstellen	3	1	K - M
Amidierungsstellen	0	1	K - M
Sulfatierungen von Tyrosin-Resten	2	0	N
Regionen niedriger Komplexität	3	1	O
Sekundärstruktur	39 β-Faltblätter (je 9/DUF1935) 2 α-Helices	40 β-Faltblätter (je 9/DUF1935) 0 α-Helices	P
Konformationswechsel	9 Regionen	3 Regionen	Q
Biologische Funktion	unbekannt	unbekannt	B/D

Quellen:

A = http://expasy.org/tools/protparam.html
B = http://www.genedb.org/
C = http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan
D = http://tritrypdb.org/tritrypdb/
E = http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
F = http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
G = http://gpi.unibe.ch/
H = http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html
I = http://www.es.embnet.org/Services/EMBnetAT/htdoc/9aatad/
J = http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm
K = http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/index.html
L = http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html
M = http://expasy.org/tools/scanprosite/
N = http://www.expasy.ch/tools/sulfinator/
O = http://smart.embl-heidelberg.de/
P = http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/web_servers/
Q = http://www.predictprotein.org/

Die Tabelle listet verschiedene Charakteristika der Proteinsequenzen von *Lb*-210 und *Lb*-200 auf. Mit Hilfe der angegebenen Programmen wurden die Aminosäuresequenzen hin analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

Ein markanter Unterschied der in Tabelle 3.8 gegenübergestellten Charakteristika der Proteinsequenzen *Lb*-210 und *Lb*-200 besteht in den vorhergesagten Sekundärstrukturen. Die Proteinsequenz von *Lb*-210 verfügt demnach über zwei α-Helices während in der Proteinsequenz von *Lb*-200 ausschließlich β-Faltblattstränge vorhergesagt werden. Eine α-Helix wird zwischen den Proteindomänen DUF1935 Nr. D1 und D2 vorhergesagt, wohingegen sich am äquivalenten Ort in *Lb*-200 ein β-Faltblatt befindet. Die zweite α-Helix wird im Sequenzeinschub von *Lb*-210 zwischen DUF1935 Nr. D3 und D4 vorhergesagt (Abb. 3.41). Diese putativen Unterschiede in der Sekundärsequenz können zu individuellen Ausbildungen der Tertiärstruktur der Genprodukte *Lb*-200 bzw. *Lb*-210 führen und damit die individuellen Aufgabenspektren der Proteine erklären.

Abbildung 3.41 zeigt ein Sequenzvergleich der C-terminalen Bereiche der Aminosäuresequenzen von *Lb*-200 und *Lb*-210 und deren orthologen Gene. Zudem ist in der Abbildung eine Auswahl an Unterschieden aus Tab 3.8 schematisch dargestellt und die Domäne DUF1935 D4 wird dem HMM-Logo DUF1935 gegenübergestellt.

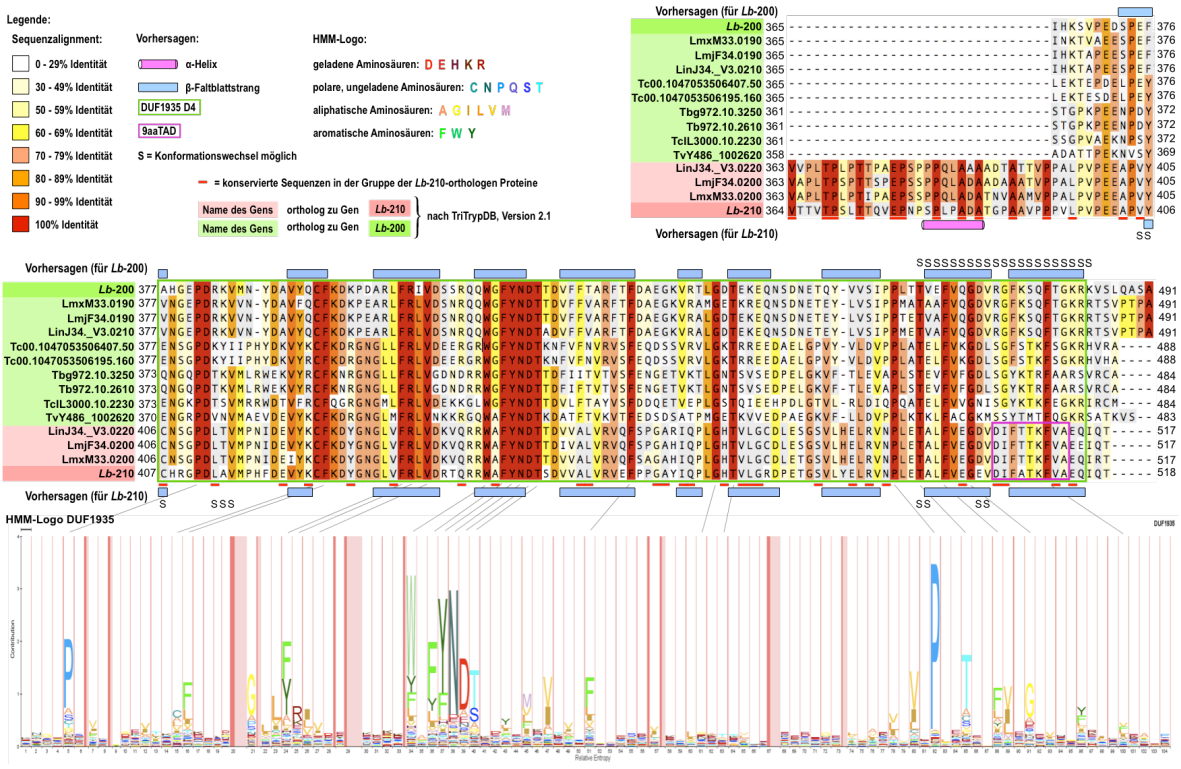

Abb. 3.41 Sequenzvergleich der C-terminalen Region der Proteine *Lb*-210 und *Lb*-200 mit deren orthologen Genen und Vergleich der DUF1935 D4 mit dem HMM-Logo DUF1935. Das Sequenzalignment (ClustalW, MacVector) zeigt die C-terminale Bereich mit der Domäne DUF1935 D4 (D4) von *Lb*-200 und *Lb*-210 und deren orthologen Genen einschließlich der vorangehenden Sequenz ab DUF1935 D3. Ausgewählte Unterschiede der Proteine aus Tabelle 3.8 sind über (*Lb*-200) bzw. unter (*Lb*-210) der Sequenz schematisch dargestellt. Die Domänen D4 und 9aa TAD umrahmen die jeweilige Sequenz farbig. Zum Vergleich ist das HMM-Logo DUF1935 (Pf09149) unterhalb der Domäne D4 abgebildet. Ausgewählte, konservierte Aminosäuren sind durch graue Linien den entsprechenden Stellen im HMM-Logo zugeordnet. Die innerhalb der *Lb*-210-Orthologa konservierten Aminosäuren sind rot unterstrichen.

Neben den oben erwähnten Unterschieden der Sekundärstrukturen geht aus Abbildung 3.41 hervor, dass alle Sequenzen der *Lb*-210-Orthologa (rot unterlegte Gen-Namen) positive Treffer anhand eines Vorhersage-Programms zur Identifizierung einer Transaktivierungsdomäne, der sog. 9aa TAD (*nine amino acid trans activation Domain*), aufweisen. Dieses Motiv wurde in verschiedenen Transkriptionsfaktoren identifiziert und ist in vielen Fälle für die Transaktivierung verantwortlich [97].

Eine Vielzahl von konservierten Aminosäuren in den *Lb*-210-orthologen Proteinesequenzen hebt die Gruppe von den *Lb*-200 orthologen Proteinen ab (Abb. 3.41, rot unterstrichene Bereiche). Drei dieser konservierten Aminosäuren sind im Motiv 9aa TAD lokalisiert. Ein weiterer Unterschied sind Regionen im N-terminalen Bereich der Domäne D4 von *Lb*-210, in denen ein Konformationswechsel erfolgen kann, die ebenfalls mit konservierten Aminosäuren der *Lb*-210-Orthologa korrespondieren.

3.6 Ermittlung der Genexpression von *Lb*-210 in *L. braziliensis* Feldisolaten Sb(V)$^{R/S}$

3.6.1 Auswahl der zu untersuchenden *L. braziliensis* Feldisolate

Um die Expression von Gen *Lb*-210 in einen Zusammenhang mit dem Sb(V)-Therapieverlauf zu setzten, wurden Untersuchungen in Feldisolaten durchgeführt. Die Feldisolate wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Die Feldisolate wurden vor dem Therapiebeginn aus den Patienten isoliert, kultiviert und als Kryopräservat langzeitgelagert.
- Die Patienten verfügen über einen dokumentierten, abgeschlossenen Sb(V)-Behandlungszyklus ohne Therapieunterbrechung.
- Die Feldisolate wurden durch eine Feintypisierung der Spezies *L. braziliensis* zugeordnet.

Tabelle 3.9 listet die untersuchten Feldisolate auf. Ausgewählte Informationen zum Krankheitsverlauf der jeweils infizierten Patienten sind angegeben. Die Feldisolate und die zugehörigen Hintergrundinformationen wurden uns von Prof. Arevalo (Lima, Peru) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.9: Informationen zum Krankheitsverlauf der mit den Feldisolaten infizierten Patienten

Name des Feldisolats	D	Begleiterkrankung	Leishmaniasis-Anamnese	Läsionsgröße [cm^2]	Sb(V)-Gesamtdosis [mg/kg]	Anzahl der Dosen	Endeinstufung der Therapie
PER002	CL	keine	keine	1,84 cm^2	317,5 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER005	CL	keine	keine	9,42 cm^2	223,7 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER006	CL	keine	keine	4,36 cm^2	277,2 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER029	CL	keine	keine	0,16 cm^2	235,3 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER065	CL	keine	keine	1,57 cm^2	344,8 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER067	CL	keine	Ja (a)	7,11 cm^2	333,3 mg/kg	20	Erfolglos (s)
PER073	CL	keine	keine	10,99 cm^2	289,9 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER104	CL	keine	Ja (a)	8,42 cm^2	298,5 mg/kg	20	Erfolglos (s)
PER178	CL	keine	keine	0,71 cm^2	285,7 mg/kg	20	Erfolgreich (12M)
PER186	CL	keine	Ja (a)	113,04 cm^2	393,4 mg/kg	20	Erfolglos (p)
PER193	ML	keine	Ja (a)	0,00 cm^2	589,3 mg/kg	30	Erfolgreich (6M)
PER201	ML	keine	keine	4,91 cm^2	565,2 mg/kg	30	Erfolgreich (12M)
PER207	CL	keine	keine	1,32 cm^2	400,0 mg/kg	20	Erfolgreich (12M)
PER212	CL	keine	Ja (a)	12,56 cm^2	400,0 mg/kg	20	Erfolglos (s)
PER215	ML	Strongyloidiose	Ja (b)	0,00 cm^2	569,6 mg/kg	29	Erfolgreich (6M)
PER227	CL	keine	keine	12,76 cm^2	342,9 mg/kg	20	Erfolgreich (6M)
PER228	CL	keine	keine	5,18 cm^2	400,0 mg/kg	20	Erfolgreich (12M)
PER231	ML	keine	Ja (b)	0,00 cm^2	600,0 mg/kg	30	Erfolgreich (12M)
PER304	ML	keine	Ja (b)	0,00 cm^2	600,0 mg/kg	30	Erfolgreich (12M)
PER334	ML	keine	Ja (a)	0,00 cm^2	615,4 mg/kg	30	Erfolgreich (3M)
PER348	CL	keine	keine	3,80 cm^2	393,4 mg/kg	20	Erfolgreich (12M)

Legende:		D	=	Diagnose
CL	= kutane Leishmaniasis	3M	=	Endeinstufung der Therapie erfolgte 3 Monate nach Behandlungsende
ML	= mukokutane Leishmaniasis	6M	=	Endeinstufung der Therapie erfolgte 6 Monate nach Behandlungsende
Ges.	= Gesamtzahl	12M	=	Endeinstufung der Therapie erfolgte 12 Monate nach Behandlungsende
p	= primär	a	=	Leishmaniasis-Anamnese mit Sb(V)-Behandlung
s	= sekundär	b	=	Leishmaniasis-Anamnese ohne Behandlung

Die Tabelle listet *L. braziliensis* Feldisolate auf. Ausgewählte Informationen des jeweiligen Krankheitsverlaufs der mit den Feldisolaten infizierten Patienten sind angegeben.

Insgesamt wurden 21 Feldisolate untersucht. Annähernd die Hälfte der Patienten wurde erfolglos mit der angegebenen Sb(V)-Behandlung therapiert, während die andere Hälfte erfolgreich therapiert wurde (Tab. 3.9). Unterschieden wird zwischen primärer (p) und sekundärer (s) Therapie, wobei „sekundär“ eine zeitnah vorausgegangene, erfolglose Therapie impliziert.

3.6.2 Bestimmung der Genexpression von *Lb*-210 in *L. braziliensis* Feldisolaten

Die Bestimmung der Genexpression fand mittels semi-quantitativer *real-time* RT-PCR (2.2.19) statt. Die cDNA wurde aus den Promastigoten der in Tab. 3.9 gelisteten Feldisolaten hergestellt (2.2.19) und diente als *template*-DNA. Als endogene Kontrolle wurde der ermittelte Ct-Wert von dem Gen *L. braziliensis* Actin verwendet. In Abbildung 3.42 sind die Ergebnisse dargestellt.

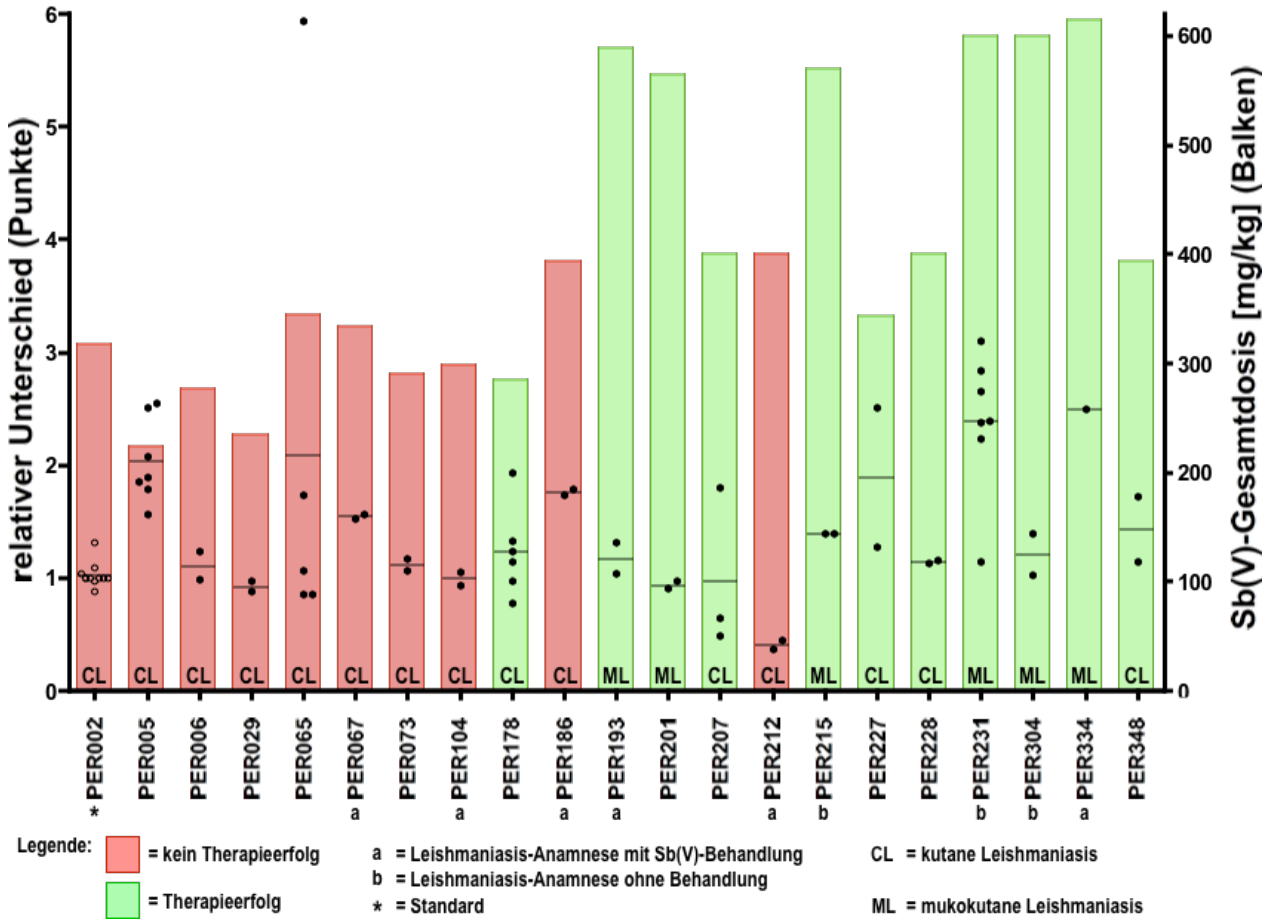

Abb. 3.42 Relativer Unterschied (RU) der Genexpression des Gens *Lb*-210 in 22 *L. braziliensis* Feldisolaten. Die Expression (RU) wurde mit der ΔΔCt-Methode ermittelt. Die Einzelwerte der Genexpression sind als Punkte dargestellt, wobei als Standard die RNA-Expression des Feldisolats PER002 diente. Der jeweilige Gruppen-Median ist als Strich dargestellt. Als Balkendiagramm sind die jeweiligen Gesamtgaben an Sb(V) pro kg Körpergewicht des Therapiezyklus (aus Tab. 3.9) angegeben. Die RNA-Isolierung aus je 2 x 10^7 promastigoten *L. braziliensis* Feldisolaten erfolgte aus Kulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die aus der RNA hergestellte cDNA wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden, spezifisch für einen Sequenzabschnitt auf dem Gen *Lb*-210 amplifiziert. Als endogene Kontrolle wurde die Amplifizierung von *L. braziliensis* Actin durchgeführt.

Abbildung 3.42 zeigt, das Gen *Lb*-210 in den untersuchten Feldisolaten unterschiedlich exprimiert wird. Es konnte jedoch in dieser vorläufigen Analyse keine strikte Korrelation zwischen einer Überexpression von *Lb*-210 und dem Sb(V)-Behandlungserfolg festgestellt werden. Allerdings weisen drei von elf Feldisolaten (PER005, PER067 und PER186) eine erhöhte *Lb*-210-Expression auf. Alle stammen aus Patienten mit einer erfolglosen Sb(V)-Behandlung. Da Untersuchungen an Laborstämmen auf Antimon-Resistenz Hinweise auf vielfältige Resistenzmechanismen ergaben [98] ist anzunehmen, dass auch Feldisolate über das Potential zur Entwicklung mehrerer Resistenzmechanismen haben. Um eine statistisch relevante Aussage über eine Korrelation zwischen der *Lb*-210-Expression und dem Sb(V)-Behandlungserfolg zu treffen, sollten daher weitere Feldisolate untersucht werden. Zudem bietet sich das Isolat PER005 für weitergehende Laboruntersuchungen an.

4. Diskussion

Leishmania-Infektionen des Menschen werden seit über 60 Jahren mit Antimonpräparaten therapiert, die bis heute, entsprechend den Leitlinien der WHO, als Standardtherapie eingesetzt werden. Weltweit ansteigende Resistenzentwicklungen in *Leishmania spp.* gegenüber Antimonpräparaten stellen ein immer größer werdendes Problem für die Behandlung dar [17, 19, 99]. Zudem wurde in der Vergangenheit wenig in die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie der Leishmaniasis investiert, was sich bis heute in der begrenzten Anzahl an verfügbaren Therapeutika widerspiegelt. Um so wichtiger ist es, die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Medikamente zu erhalten.
Die Aufklärung von Antimon-Resistenzmechanismen in *Leishmania* leistet dazu einen wichtigen Beitrag. Mit dem Wissen um Resistenzmechanismen können z.B. molekulare Resistenzmarker identifiziert werden, mit denen Prognosen über die Wirksamkeit von Therapeutika in Endemiegebieten durchgeführt werden könnten. Angesichts der starken Nebenwirkungen der Antimon-Therapeutika ist es von Bedeutung, bereits bei der Diagnose einer *Leishmania*-Infektion über Informationen zu verfügen, die unwirksame Therapeutika anzeigen. Damit ist der behandelnde Arzt in der Lage, dem Patienten eine Therapie zukommen zu lassen, die eine hohe Aussicht auf Erfolg hat. Auch werden durch geeignete Therapien die Behandlungskosten im Hinblick auf eine unnötige Zweittherapie gesenkt. Aus sozioökonomischer Sicht ist eine effiziente Therapie, gerade in Ländern der Dritten Welt, von Bedeutung, um den Ausfall der Arbeitskraft und damit auch die Existenzgrundlage vieler betroffener Patienten so gering wie möglich zu halten. Besonders in Regionen, die einen anthroponotischen Übertragungszyklus aufweisen, trägt eine verkürzte Infektionszeit zudem zur Eindämmung der Weiterverbreitung dieser Infektionskrankheit bei. Auch erfolgt keine Selektion auf noch ausgeprägtere Resistenz, wie dies bei Dosiserhöhung erfolgt. Weiterhin kann das Wissen über Resistenzmechanismen auf die bislang weitgehend unbekannten Wirkungsmechanismen der Medikamente bei der Eliminierung der Parasiten hinweisen. Die Erkenntnisse könnten zur Entwicklung verbesserter Rezepturen von Therapeutika dienen.

Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Antimon-Resistenzmaker in *L. braziliensis* Feldisolaten zu identifizieren. Mit dem Prinzip der Funktionellen Komplementation ist es gelungen, ein Antimon-Resistenz vermittelndes Gen zu identifizieren.

4.1 Funktionelle Komplementation als Strategie zur Identifizierung von Sb(III)-Resistenzmarker-Genen

4.1.1 Funktionelle Komplementation: Vor- und Nachteile dieser Strategie

Erste Resistenzmarker in *Leishmania* wurden durch einfache Vergleiche verdauter genomischer DNA von resistenten Parasiten mit der von sensitiven Parasiten auf Agarosegelen identifiziert [100]. Diese simple Methode spürt nur deutliche Veränderungen von Gen-Amplifikationen auf. Empfindlichere Methoden zur Identifizierung von Resistenzmaker sind Vergleiche von Karyotypen mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), DNA *microarrays*, zur Analyse von Änderungen

der RNA-Mengen oder Proteom-Studien durch Vergleiche von Änderungen der Proteinmengen bzw. posttranslationalen Modifikationen. Diese Methoden sind sehr arbeitsintensiv und können durch unterschiedliche Faktoren negativ beeinflusst werden [90].
Die hier angewendete Funktionelle Komplementation ist eine leistungsstarke Methode, die es ermöglicht, in relativ kurzer Zeit das komplette Genom eines Organismus unvoreingenommen auf verschiedenste Merkmale hin zu untersuchen.
Die Verwendung von Cosmid- an Stelle von cDNA-Plasmid-Banken hat folgende Gründe: Da das Genom von *Leishmania* keine Introns besitzt und es kompakt genug ist, kann es als gDNA in Cosmide kloniert werden. Damit können die Funktionen der Gene in ihrem natürlichen genomischen Kontexten untersucht werden. Das ist insbesondere wichtig, um die in den 3‘- bzw. 5‘-UTRs vermuteten regulatorischen Bereiche (1.2.1) mit in die Analysen einzubeziehen. Durch die Aufnahme großer genomischer Abschnitte in die Cosmide kann das gesamte Genom in einer relativ geringen Anzahl von unabhängigen Cosmid-Klonen repräsentiert werden, wie in 3.2.3.2 beschrieben ist [90].

Allerdings hat diese Methode auch Limitationen. Eine liegt in der Herstellung der rekombinanten Populationen. Der dabei verwendete Vektor trägt einen Selektionsmarker, bei dem es sich üblicherweise um ein Antibiotikum-Resistenzgen handelt. Die Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums und die Expression des Selektionsmarker-Gens geht mit einer metabolischen Last und zellulärem Stress einher. Daher wurden alle hier durchgeführten Überprüfungen zur Resistenzvermittlung der Sequenz-Abschnitte in den Dosis-Wirkungskurven ohne das Antibiotikum (hier G418) durchgeführt. Auch die Durchführung von Selektion S1 fand ohne G418 statt und wies vergleichbare Ergebnisse wie in den nachfolgenden Selektionen auf, die in Anwesenheit von G418 durchgeführt wurden.
Weiterhin zu bedenken ist die erforderliche *in vitro*-Kultivierung zur Vorbereitung der Cosmid-Isolierung aus z.B. selektierten *Leishmania*. Bereits während dieser Kultivierung kann es zu Begünstigungen von Parasiten mit einem schnelleren *in vitro*-Wachstum kommen, was möglicherweise selektierte *Leishmania*-Parasiten, die Resistenz-Cosmide tragen, verdrängen kann. Die Kontrolle der Selektion S9 und S10 am Tag 0 zeigt eindrucksvoll, dass das ein nicht zu vernachlässigendes Problem ist. Obgleich die Anteile der *Leishmania*-Parasiten mit verschiedenen Cosmid-Derivaten zu gleichen Teilen eingesetzt wurden, dominierten bereits nach einer dreitägigen *in vitro*-Kultivierung zur Vorbereitung der Cosmid-Isolierung drei von neun eingesetzten Derivaten (Abb. 3.34).
Die in dieser Arbeit angewendete dominant positive Strategie ermittelt dominante Resistenz-merkmale. Rezessive Merkmale können mit dieser Methode durch eine dominant negative Strategie aufgespürt werden (Abb. 1.2), was in dieser Arbeit nicht zur Anwendung kam.
Zudem war, wie sich herausstellte, bei der Anwendung in *L. braziliensis* das Auftreten von RNAi Effekten zu bedenken. Bei Selektionen auf bestimmte Gene der integrierten Cosmidbank-DNA könnten RNAi Effekte die Ergebnisse unvorhergesehen beeinflussen, wie in Kapitel 4.2 näher erläutert wird.

4.1.2 Funktionelle Komplementation: Beispiele in der Anwendung mit *Leishmania spp.*

Funktionelle Komplementation wurde erstmalig in *Leishmania* angewendet, um Faktoren, die an der Synthese von Lipophosphoglykan beteiligt sind zu analysieren. Die Untersuchungen wurden mit dem Organismus *L. donovani* durchgeführt und führten zur Identifizierung von Gen *LPG1* [101]. Erste Resistenzmarkergene in *L. major bzw. L. tarentolae* wurden mit dieser Methode in Studien zur Antifolat-Resistenz untersucht und führten zur Identifizierung der Resistenzmarker BT1 (Biopterin Transporter), PTR1 (Pteridin Reduktase) und DHFR-TS (Dihydrofolat Reduktase-Thymidylat Synthase) [102].
Antimon-Resistenzmarker wurden mit dieser Herangehensweise anhand von *in vitro* erzeugten Antimon-resistenten Zelllinien untersucht. Dabei wurden mit einer dominant positiven Strategie (1.9) in den Organismen *L. tarentolae* und *L. infantum* die Gene *HSP70* und *HSC70* (ein *HSP70* verwandtes Gen) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass *HSP70* und *HSC70* den *Leishmania*-Parasiten Hitzetoleranz und Schutz vor einem Sb(III)-Stress gewährt [76]. Mit einer dominant negativen Strategie konnte im Organismus *L. mexicana* das Gen *AQP1* (*aquaglyceroporin*) identifiziert werden. Dabei zeigten Untersuchungen von verschiedenen Labor-resistenten Zellen, dass ein verminderter *AQP1*-RNA-Spiegel mit einer verminderten Anhäufung an Sb(III) in der Zelle korreliert [75]. Dieses Gen wurde bereits zuvor als ein Transporter identifiziert, über den Sb(III) in die *Leishmania*-Parasiten gelangt [64]. Untersuchungen an resistenten und sensitiven *L. donovani*-Feldisolaten bestätigten die Korrelation einer verminderten *AQP1*-RNA Expression mit einer eingeschränkten Sb(III) Aufnahme [84]. In einer kürzlich durchgeführten Studie an *L. donovani*-Feldisolaten konnte diese Korrelation in 7 von 9 untersuchten Sb-resistenten Isolaten bestätigt werden [85].
Auch für das kürzlich eingeführte Impavido™ (mit dem Wirkstoff Miltefosin) konnten mit Hilfe der Komplementations-Genetik bereits zwei Resistenzmarker identifiziert werden. Zum einen wurde mit der dominant negativen Strategie das Gen *Ld*MT (Miltefosin-Translokase) identifiziert, das zu einer neuen Gruppe von P-Typ ATPasen, einer Subfamilie der Aminophospholipid-Translokasen, gehört [103]. Zum anderen wurde durch eine dominant positive Strategie ein 299 kDa *L. infantum* Gen (LinJ08_V3.0630) identifiziert, das bei Überexpression eine Resistenz gegenüber Miltefosin vermittelt und eine Kreuzresistenz zu Sb(III) verursacht [78].

4.2 RNA-Interferenz (RNAi) und Genetische Komplementation

4.2.1 Wirkmechanismus der RNAi

Die Möglichkeit Gene mit Doppelstrang-RNA (dsRNA) mittels RNAi herabzuregulieren, ist evolutionär konserviert und scheint eine natürliche Funktion in der Abwehr von mobilen genetischen Elementen wie Transposons und Viren zu haben [104].

Der RNAi-Wirkmechanismus kann in zwei Schritte eingeteilt werden: 1) Schneiden der dsRNA in *small interfering* RNAs (siRNA) gefolgt durch 2) den Abbau der Ziel-mRNA.
Bei dem Eintritt der dsRNA in der Zelle wird diese von Dicer, ein RNase III-Enzym, erkannt, gebunden und in 21 bis 25 bp siRNAs prozessiert. Die siRNA wird vom AGO2-RISC-Komplex aufgenommen und entwunden. Der *sense*-Strang wird abgebaut und aus dem AGO2-RISC-

Komplex entfernt. Der *antisense*-Strang hingegen bindet die Ziel-mRNA komplementär, woraufhin diese abgebaut wird [105, 106].
Versuche in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melongaster* zeigten, dass synthetische siRNAs ähnliche Effekte wie dsRNAs erzeugen [107, 108]. Seither werden neben dsRNAs auch synthethische siRNAs für die funktionelle Untersuchung zellulärer Gene experimentell genutzt.

4.2.2 RNAi in *Leishmania spp.*

Bisher konnten weder in *L. major* noch in *L. donovani* die Methode der RNAi erfolgreich angewendet werden [96]. Eine Ausnahme stellen dabei Arbeiten mit den A2-Genen in *L. donovani* dar. Durch eine gezielte Überexpression des Leserahmens eines A2-Proteins in *antisense*-Richtung konnten die A2 Gene herabreguliert werden, das mit einer reduzierten Virulenz der Parasiten einherging [109]. Anders als bei den zu *Leishmania* nahe Verwandten Organismus *T. brucei* konnten jedoch dsRNAs, die durch eine Anordnung von *antisense*- und *sense*-Sequenzen auf eingeführten Konstrukten entstanden, nicht regulierend auf die Genexpression einwirken [110].
Fortschritte der Genomprojekte machten deutlich, dass das Genom von *L. braziliensis* im Gegensatz zu dem Genom von *L. major* und *L. infantum* über intakte orthologe Gene verfügt, die für die RNAi-Maschinerie essentiell sind [95]. Somit besteht die Möglichkeit, dass RNAi Effekte in *L. braziliensis* auftreten können.

4.2.3 Funktionelle Komplementation und RNAi

Aus anderen Studien ist bekannt, das die Ableserichtung der eingefügten extrachromosomalen DNA in *Leishmania* bidirektional ist [111]. Das hat zur Folge, dass *antisense*- und *sense*-Transkripte entstehen. Diese könnten sich zu dsRNA zusammen lagern und entweder direkt zum Abbau homologer mRNA führen, oder die mittels intakter RNAi-Maschinerie entstehenden siRNAs könnten homologe mRNA destabilisieren. Damit ist nach einer Selektion auf bestimmte Cosmide nicht klar, ob der selektierte Effekt diese Cosmide durch die Überexpression bzw. Komplementation einer oder mehrere Gene ausgeht oder ob Bereiche des selektierten Cosmids durch RNAi-Effekte regulierend auf die Expression der Gene wirken.

4.3 Allgemeine Schwierigkeiten bei Untersuchungen der natürlichen Antimon-Resistenz in *Leishmania*

Natürliche Mechanismen der Antimon-Resistenz, insbesondere der Spezies *L. braziliensis*, wurden bisher kaum untersucht. Das hat mehrere Gründe:

1. Viele Patienten-Isolate lassen sich nicht *in vitro* kultivieren. Eine Vielzahl verschiedener *in vitro*-Kulturmedien existieren, die mit unterschiedlichen Erfolgen eingesetzt werden. Als besonders schwierig zu kultivieren gilt *L. braziliensis* [112]. Damit findet bereits bei der *in vitro* Kultivierung eine ungewollte Selektion statt.
2. Wenig Isolate sind verfügbar, zu denen ein dokumentierter Antimon-Behandlungszyklus existiert und bei denen der Patient keine Begleiterkrankungen aufwies.

3. Patienten-Isolate sind üblicherweise ein Gemisch aus unterschiedlichen klonalen Populationen, daher müssen für eingehende Untersuchungen der Parasiten klonierungen vorangehen.
4. Die Resistenz der Parasiten muss zunächst in aufwändigen Laboruntersuchungen mit Sb(III) und Sb(V) getestet werden, um die Korrelation zwischen Behandlungs-Misserfolg und inherenter Resistenz zu belegen. Da diese Methoden nicht Labor-übergreifend standardisiert sind, ist es oft nicht möglich die Ergebnisse zu vergleichen [113, 114].
5. Viele Methoden, die zur Identifizierung von Resistenzmechanismen eingesetzt werden, benötigen phylogenetisch nahestehende Parasiten, die sich in der Sensitivität gegenüber den zu untersuchenden Medikamenten unterscheiden.

4.4 Dominante, homologe Cosmide nach Sb(III)-Selektionen

4.4.1 Merkmale der verwendeten *L. braziliensis* Feldisolate PER002 und PER104

Diese Arbeit basiert auf einer genetischen Komplementations-Strategie (Funktionelle Komplementation), bei der ein Sb(III)-sensitiver Akzeptor-Klon mit einer aus einem Sb(III)-resistenten Donor-Stamm stammende Cosmidbank transfiziert wurde. Bei einem *screen* der rekombinanten Population auf Sb(III)-resistente Organismen sollten Cosmide selektiert werden, deren Gene den Organismen durch Überexpression oder durch Sequenzvariation unter Selektionsbedingungen Vorteile verschaffen. Die verwendeten *L. braziliensis*-Feldisolate, PER104 und PER002, stammen beide aus Patienten, deren *Leishmania*-Infektion mit Sb(V)-Präparaten erfolglos behandelt wurde. Im Gegensatz zu PER104 konnte die Infektion mit PER002 in einem zweiten Therapiezyklus erfolgreich behandelt werden (Tab.3.1). Beide Stämme weisen eine *in vitro*-Sb(V)-Resistenz auf, unterscheiden sich aber in der *in vitro*-Sb(III)-Empfindlichkeit. Stamm PER002 wird als Sb(III)-sensitiv eingestuft, wohingegen Stamm PER104 als Sb(III)-resistent eingestuft wird [19].

Nachdem eine Adaptation der Isolate PER002 und PER104 an das hier verwendete Kulturmedium durch mehrere *in vitro*-Passagen erfolgreich verlief, fanden Analysen des Wachstumsverhaltens statt. Dabei wurde deutlich, dass PER104 im Vergleich zu PER002 eine niedrigere Verdoppelungsrate und eine geringere Zelldichte in der späten logarithmischen Phase aufwies. Trotz dieser Nachteile wies PER104 einen etwa 2-fach höheren IC_{50}-Wert für Sb(III) auf. Damit konnten die in der Literatur beschriebenen Unterschiede in der Sb(III)-Sensitivität bestätigt werden. Dass diese Unterschiede der *in vitro*-Sb(III)-Sensitivität beider Stämme auch nach veränderten Kulturbedingungen und nach mehreren *in vitro*-Passagen bestehen bleibt, deutet darauf hin, dass es sich dabei um stabile Merkmale handelt. Ebenfalls deuteten diese Ergebnisse die Möglichkeit an, das sich die Erlangung einer Antimon-Resistenz in den Parasiten auf Kosten der Fitness niederschlägt.

Bei Vieren wurde beobachtet, dass Medikamenten-Resistenzen mit einer reduzierten Fitness einhergehen [115]. In Studien an Glibenclamid (ABC-Transporter-Inhibitor) resistenten *L. amazonensis* führten Vergleiche des Zell-Wachstums zwischen sensitiven und resistenten Zellen jedoch nur zu geringfügigen Unterschieden [116, 117]. Generell konnten in *Leishmania* eine Vielzahl an Veränderungen von physiologischen Parametern in resistenten Zellen beobachtet

werden, sind aber bislang nicht systematisch untersucht worden. Bei ausreichender Validierung könnten auch diese Parameter potentiell als Resistenzmarker dienen [118].

4.4.2 Sb(III)-Selektionen

Drei unabhängige Sb(III)-Selektionen der Population *L.br*PER002K7[pcosPER104], bei der die Cosmidbank-DNA aus resistenten PER104 ($Sb(III)^R$) in den sensitiven Klon PER002K7 ($Sb(III)^S$) eingebracht wurde, führten jeweils zur Identifizierung des selben dominanten Cosmidtyps, der pcosC1.6 genannt wurde. Dabei war die prozentuale Häufigkeit des Cosmids pcosC1.6 in der selektierten Population um so höher, je stringenter die Sb(III)-Selektionen erfolgten und reichte von 66 % bis hin zu 98 % (Abb. 3.7). Das deutet darauf hin, das eine Cosmid-basierte Überexpression von Genen des Cosmids pcosC1.6 das *in vitro*-Wachstum von Promastigoten unter hohen Sb(III)-Konzentrationen erlaubt. Auf der *insert*-DNA, die einer Region auf dem Chromosom 20 entspricht, wurden 11 offene Leserahmen ermittelt (Abb. 3.8, Tab. 3.3).

Die *L. braziliensis*-Cosmidbank pcosPER104 wurde auch in der nahe verwandten Spezies *L. peruviana* auf Sb(III)-Resistenzmarker hin durchsucht. Dabei konnte nach einer zweiwöchigen Inkubation mit Sb(III) ein zu pcosC1.6 homologes Cosmid pcosC4-1.28 nachgewiesen werden. Dieses Cosmid setzte sich nach weiteren zwei Wochen Sb(III)-Selektion gegenüber allen anderen identifizierten Cosmiden durch (Abb. 3.11). Das Cosmid pcosC4-1.28 überlappt in acht intakten offenen Leserahmen mit pcosC1.6 (Abb. 3.15).

Um zu unterscheiden, ob die beobachteten Effekte auf Sequenz-Varianzen (qualitative Unterschiede) zwischen Antimon-resistenten und -sensitiven Erreger-Isolaten, oder auf quantitativen Effekten beruhen, wurde ein dritter *in vitro*-Sb(III)-*screen* durchgeführt, bei dem die Cosmidbank-DNA aus sensitiven PER002 ($Sb(III)^S$) in den Klon PER002K7 des gleichen, sensitiven Isolats eingebracht wurde. In zwei aufeinanderfolgenden Sb(III)-Selektionsschritten setzte sich ein dominantes Cosmid, pcosA3, durch (Diplomarbeit L. Trübe, Universität Rostock, 2009), das ebenfalls ein pcosC1.6-Homolog ist und, ähnlich wie Cosmidtyp pcosC4-1.28, in den gleichen acht intakten offenen Leserahmen mit Cosmidtyp pcosC1.6 überlappt (Abb. 3.15). Somit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den identifizierten Genomabschnitten um Stamm-spezifische Resistenzmarker handelt und es ist von einem dominanten Gendosis-Effekt auszugehen.

4.5 Gen *Lb*-210 (LbrM20_V2.0210) vermittelt Antimon-Resistenz

Durch gezielte Deletionen im Cosmid pcosC1.6 mit nachfolgenden kompetitiven Selektionen bzw. IC_{50}-Bestimmungen für Sb(III) sollte der *in vitro*-Sb(III)-Resistenz vermittelnde Bereich eingegrenzt werden. Die erzielten Ergebnisse im *L. braziliensis*-System waren jedoch inkonsistent (Kap. 3.4). Im Gegensatz dazu war es möglich mit den *L. braziliensis*-Deletionskonstrukten im *L. infantum*-System den *in vitro*-Sb(III)-Resistenz-vermittelnden Bereich reproduzierbar auf das Gen LbrM20_V2.0210 (*Lb*-210) einzugrenzen (Abb. 3.34 und 3.35). Dieser Effekt konnte trotz einer durchschnittlichen Aminosäuresequenz-Identität von nur 77 % und einer durchschnittlichen

Nukleotidsequenz-Identität von nur 81 % (*L. infantum*-Genom versus *L. braziliensis*-Genom [95]) erzielt werden. Durch *real-time* RT-PCR konnte gezeigt werden, dass das *L. braziliensis* Gen in *L. infantum* transkribiert wird. Somit deutet alles darauf hin, dass das Gen *Lb*-210 durch eine Überexpression in *L. infantum* Sb(III)-Resistenz vermittelt (Abb. 3.36). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *L. braziliensis* Gen in dem Organismus *L. infantum* Funktion ausüben kann.

Genamplifikation ist ein bekannter *in vitro*-Resistenzmechanismus in *Leishmania* [119-121]. Viele Untersuchungen auf Antimon-Resistenz wurden mit *in vitro* erzeugten Sb-resistenten *Leishmania* durchgeführt, die mit ihrem sensitiven Ursprungsstamm verglichen wurden. Dabei konnten folgende amplifizierte Gene bzw. Genom-Abschnitte identifiziert werden, die mit Antimon-Resistenz korrelieren:

- Das ABC-Transporter-Gen *MRPA* wies korrelierende Genamplifikationen mit *in vitro* erzeugter Antimon-Resistenz in *L. guyanensis*, *L. tarentolae* und *L. infantum* auf [122-125].
- Gen *GSH1* wies korrelierend zu *MRPA* Genamplifikationen in *in vitro* erzeugten Antimon-Resistenten *L. tarentolae* auf und führte zur Steigerung der intrazellulären Trypanothion-Konzentration [124]. Sb(III) und Trypanothion bilden ein Konjugat und werden via MRPA-Transporter aus der Zelle sequestriert [73].
- Eine Überexpression des bis dato unbekannten Gens *ORFSbV* wurde in der Spezies *L. tarentolae* ebenfalls mit einer *in vitro* erzeugten Antimon-Resistenz in Verbindung gebracht [68].
- Ein amplifiziertes extrachromosomales Element, das als G-*circle* bezeichnet wurde, konnte in einem *in vitro*-erzeugten Sb-resistenten Stamm der Spezies *L. tropica* identifiziert werden [77]. Ein Zusammenhang des G-*circle* mit dem Gen *MRPA* und Genen des Thiol-Metabolismus wurden ausgeschlossen.

In den wenigen Studien, die natürliche Antimon-Resistenzmechansimen untersuchen, konnten die beschriebenen *in vitro* erzeugten Genamplifikationen nur zum Teil wiedergefunden werden. Untersuchungen an fünf *L. braziliensis*- und *L. guyanensis*-Sb-resistenten Feldisolaten wiesen keine Amplifikation des *MRPA*-Gens auf [82]. In einer Studie mit vier resistenten *L. donovani*-Feldisolaten konnte in dreien eine Amplifikation des *MRPA*-Gens nachgewiesen werden, jedoch wurde in nur einem der Isolate eine Ko-Amplifikation von *GSH1* festgestellt und keines dieser Isolate wies eine erhöhte intrazelluläre Trypanothion-Konzentration auf [81]. In vergleichenden Proteom-Analysen eines Sb-sensitiven *L. donovani* Feldisolats mit dem entsprechenden resistenten Stamm konnte eine Überexpression von HSP90, auch HSP83 genannt, im resistenten Stamm demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von HSP90 die Sb-Resistenz steigert und den wirkstoffvermittelten programmierten Zelltod, der durch eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials eingeleitet wird, reduziert. In diesem Vergleich konnte keine unterschiedliche Expression von *MRPA* und *GSH1* festgestellt werden [83]. In einer weiteren Studie wurden in zwei von acht untersuchten *L. donovani*-Sb-resistenten Feldisolaten ein auf Chromosom 9 lokalisierter amplifizierter Leserahmen identifiziert, der nach einer Transfektion den Parasiten Antimon-Resistenz verlieh [88]. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde zwar ein Sb-resistentes *L.*

donovani Feldisolat verwendet, jedoch fand vor den Analysen eine zusätzlich *in vitro* Sb(III)-Resistenz Erzeugung statt. Bei Vergleichen dieses Isolats mit einem sentitiven Feldisolat wurden Gen-Amplifikationen der Histone *H1*, *H2A* und *H4*, sowie Amplifikationen zweier hypothetischer Gene (LinJ35_V3.3990 und LinJ04_V3.0630) nachgewiesen. Eine Transfektion des Gens *H2A* in sensitive *L. donovani*-Parasiten führte zu einer Steigerung der Antimon-Resistenz [89].

Diese Studien belegen, dass natürliche Resistenzmechansimen durch Überexpression von Genen in *Leishmania* auftreten können. Es zeigt auch, dass Feldisolate Resistenzmechanismen aufweisen, die nicht mit den *in vitro* erzeugten Resistenzmechanismen übereinstimmen. Aufgrund der Hinweise auf die Mannigfaltigkeit natürlicher Resistenzmechansimen in *Leishmania* ist stark anzunehmen, dass Feldisolate über das Potential zur Entwicklung mehrerer, noch unentdeckter Resistenzmechanismen haben.

Um zu überprüfen, ob die hier *in vitro* erzielten Ergebnisse für die Situation im Feld relevant sind, wurden 21 *L. braziliensis*-Patienten-Isolate aus Peru auf *Lb*-210-Überexpression getestet. Tatsächlich konnten drei Isolate (PER005, PER067 und PER186) ausgemacht werden, die eine erhöhte Expression von *Lb*-210 aufwiesen und die zudem alle aus Patienten mit behandlungsresistenten Infektionen stammen (Abb. 3.42). Dieses Ergebnis erlaubt die Vermutung, dass *Lb*-210-Überexpression Teil eines natürlichen Resistenzmechanismus ist. Wegen der bereits diskutierten Vielfalt von Resistenzmechanismen in *Leishmania* ist es nötig, weitere Feldisolate auf die Expression von *Lb*-210 zu testen um signifikante Aussagen treffen zu können. Ausserdem würden weitere Untersuchungen mit resistenten und sensitiven *L. donovani* Feldisolaten, der Erreger der viszeralen Leishmaniasis, weitere Auskünfte über einen möglichen Spezies-übergreifenden, natürlichen Resistenzmechanismus liefern.

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass es möglich war, durch Genetische Komplementation im *L. braziliensis*-System reproduzierbar auf bestimmte Cosmide zu selektieren (Kap. 3.2). Sobald jedoch Analysen eingeengter Cosmid-DNA folgten um den selektierten Genabschnitt zu identifizieren, wurden keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt (Kap. 3.4). Diese Effekte lassen sich durch eine wohl intakte RNAi-Maschinerie in *L. braziliensis* erklären (Kap 4.2.2/3). Wie schon in Kap. 4.1.2 erwähnt, führte die Methode der Funktionellen Komplementation unter anderem im *L. infantum*-Modell zur Identifizierung eines Miltefosin- und Sb(III)-Resistenz-vermittelnden Gens [78]. Mit diesem prinzipiell erbrachten Nachweis der erfolgreichen Anwendung dieser Methode im *L. infantum*-Modell, sowie einer sehr wahrscheinlich nicht vorhandenen RNAi-Maschinerie in *L. infantum* [95, 96] lag es nahe, die vorhandenen *L. braziliensis*-Deletionskonstrukte im *L. infantum*-System zu analysieren. Dieser Strategieansatz erlaubte die Identifizierung des Sb(III)-Resistenz-vermittelnden Gens *Lb*-210.
Das hieraus resultierende Wissen eröffnet nun eine breitere Anwendung dieser leistungsstarken Methode, mit der die Genetische Komplementation auch in den potentiell RNAi-fähigen *Leishmania* des Subgenus *Viannia* angewendet werden kann. Dabei sollte ein Wechsel auf einen möglichst nahe verwandten Organismus stattfinden, der episomale Expression unterstützt, sobald Analysen zur Identifizierung von Teilbereichen der selektierten Cosmid-DNA erfolgen.

4.6 Mögliche biologische Funktion von Gen *Lb*-210 (LbrM20_V2.0210)

In dieser Arbeit wurde *Lb*-210 als Antimon-Resistenz vermittelndes Gen identifiziert. Die Funktion des Proteins ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. In diesem Kapitel wird über die biologische Funktion von *Lb*-210 spekuliert.

Datenbank-Recherchen zur Identifizierung *Lb*-210-homologer Proteine zeigten die höchste Übereinstimmung mit Gen *Lb*-200 (LbrM20_V2.0200, Tab. 3.7), das ein direkter Nachbar von *Lb*-210 auf dem Chromosom 20 ist. Dabei ist eine tandemartige Anordnung homologer Gene auf den Chromosomen kennzeichnend für *Trypanosoma* und *Leishamania*, und es wird angenommen, dass sie durch Gen-Duplikationen bzw. durch lokale chromosomale Veränderung der Gen-Anordnungen herrühren [126-129]. Diese nach einer Duplikation divergierten Gene werden auch als paraloge Gene bezeichnet (www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/Orthology.html). Interessant dabei ist, dass *Lb*-200 ebenfalls Bestandteil der kompetitiven Sb(III)-*screens* war, sich aber nicht durchgesetzt hat und somit offensichtlich nicht relevant für das Überleben der Parasiten unter Sb(III)-Druck ist (Kap. 3.4.5). Demnach können Unterschiede dieser paralogen Gene Hinweise auf die Wirkungsweise von *Lb*-210 im Zusammenhang mit der Antimon-Resistenz geben.

Auffällig ist, dass die Sequenzen dieser paralogen Gene jeweils vier repetitive Domänen DUF1935 (D1, D2, D3 und D4) aufweisen, deren Anordnungen sich deutlich durch eine in *Lb*-210 vorhandene Einschubsequenz (lokalisiert zwischen DUF1935-Domäne D3 und D4) unterscheiden (Abb. 3.37).

Gezielte Datenbank-Recherchen ermitteln zu Gen *Lb*-210 und *Lb*-200 drei bzw. neun orthologe Gene, wobei sich die darunter befindlichen *Trypanosoma*-Gene ausschließlich in die Gruppe der *Lb*-200-Orthologa einordnen. Das deutet darauf hin, dass in *Trypanosoma* keine vergleichbare Gen-Duplikation stattfand. Ein Vergleich der Genom-Kontexte von *L. major*, *L. infantum* und *T. brucei* bestätigt, dass *T. brucei* über kein zu *Lb*-210 orthologes Gen verfügt (Abb. 3.38). Da sich demnach paraloge Gene dieses Genabschnitts ausschließlich in den *Leishmania*-Spezies befinden, fand die initiale Verdoppelung vermutlich nach der Aufspaltung der Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma* statt, die aus Studien zur Evolution von Eukaryoten zufolge im Zeitraum von 500 bis 200 Millionen Jahren vor unserer Zeit vermutet wird [127, 130]. Das ausschließliche Vorkommen der *Lb*-210 orthologen Gene in *Leishmania* weist darauf hin, dass diese Gene eine spezifische Funktion innerhalb dieser Gattung ausüben, während die *Lb*-200 orthologen Gene eine Funktion innerhalb der Familie der Trypanosomatidae ausüben. Ebenfalls kann daraus geschlossen werden, dass die heutigen *Lb*-210 orthologen Gene aus einem Vorläufer der *Lb*-200 orthologen Gene hervorgegangen sind.

Phylogenetische Untersuchungen dieser identifizierten Proteinsequenzen (Abb. 3.39) weisen eine Unterteilung in vier Kladen (Nr. 1 - 4) auf, wobei Klade Nr. 1 ausschließlich alle zu *Lb*-210 orthologen Gene gruppiert. Es ist auffällig, dass alle Sequenzen der *Lb*-210-Orthologa über die bereits in *Lb*-210 beschriebene Einschubsequenz zwischen DUF1935-Domäne D3 und D4

verfügen. Diese charakteristische Einschubsequenz der *Lb*-210-orthologen Gene könnte dazu beitragen, den Proteinen ein anderes Wirkungsspektrum zu verleihen, das im Zusammenhang mit Antimon-Resistenz steht. Diese Einschubsequenz wird weiter unten eingehender untersucht.
Ein weiteres Ergebnis dieser phylogenetischen Untersuchung ist, dass Klade Nr. 2 (*Lb*-200-Orthologa der *Leishmania*) in relativ enger Beziehung zu der Klade Nr. 1 (*Lb*-210-Orthologa) steht, während Kladen Nr. 3 und 4 (*Lb*-200-Orthologa der *Trypanosoma*) genetisch etwas weiter von Kladen Nr. 1 und 2 entfernt scheinen. Das bestätigt die Theorie, dass in einem *Leishmania*-Vorfahr die *Lb*-210-orthologen Gene aus einem Vorläufer-Gen der *Lb*-200-Orthologa hervorgegangen sind, sich aber durch divergente Evolutionen von den *Lb*-200 orthologen Genen unterscheiden.

Phylogenetische Untersuchungen der einzelnen DUF1935-Dömanen (D1, D2, D3 und D4) aller zu *Lb*-200 und *Lb*-210 orthologen Gene untereinander (Abb. 3.40) lassen weitere, interessante Schlüsse zu. Zunächst fällt dabei auf, dass sich vier Kladen bilden (D1 bis D4), in denen sich jeweils Domänen mit der gleichen Domänen-Nummer gruppieren. Damit wird klar, dass die jeweiligen Domänen D1, D2, D3 und D4 einer Proteinsequenz mit der entsprechenden Domäne der orthologen Gene und auch des entsprechenden paralogen Gens näher verwandt sind als die einzelnen Domänen innerhalb eines Proteins untereinander. Das spricht für die These, das es sich bei den *Lb*-210-paralogen Genen um eine Gen-Duplikation handelt und nicht um unabhängig voneinander entstandene Gene, z.B. durch Verdoppelungen der Domänen innerhalb eines Proteins verursacht durch ähnliche Umwelteinflüsse. Da sich die einzelnen Domänen im Laufe der Entwicklungsgeschichte der unterschiedlichen Spezies nicht weit voneinander entfernen, kann angenommen werden, dass jede dieser Domäne eine distinkte Aufgaben im Protein erfüllt und sie innerhalb der Proteine nicht austauschbar sind.

Bei einer näheren Betrachtung der einzelnen DUF1935-Domänen-Gruppen der Kladen D1 bis D3 fällt auf, dass sich die darin gebildeten Untergruppen dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der gesamt-Proteinsequenz ähneln. Insbesondere fällt auf, dass die *Lb*-210- und *Lb*-200-Orthologa DUF1935-Domänen-Gruppen in relativ enger Beziehung zueinander stehen, der mit dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Gesamt-Proteinsequenz übereinstimmt. Damit wird klar, dass sich zwar die jeweiligen Domäne der paralogen Gene divergent entwickelt haben, aber der Verwandtschaftsgrad innerhalb der jeweiligen orthologen Gene erhalten bleibt. Das spricht dafür, dass die paralogen Gene einer Spezies jeweils unterschiedliche Aufgaben erfüllen, jedoch die entsprechenden orthologen Gene zwischen den Spezies die gleichen Funktionen ausüben. Eine Besonderheit stellt der Verwandtschaftsgrad der DUF1935-Domänen D4 (Klade D4) untereinander dar. Die in den Kladen D1 bis D3 auffallend enge Beziehung zwischen den *Lb*-210-orthologen mit den *Lb*-200-orthologen Domänen spiegelt sich hier nicht wieder (rot unterlegte genetische Distanzen in Abb. 3.40). Die DUF1935-Domäne D4 der *Lb*-210 orthologen Gene stehen hier den *Lb*-200-orthologen Genen der *Trypanosoma* näher als den der *Leishmania*. Das kann bedeutet, dass sich alle D4-Domänen der *Lb*-210 orthologen Gene gleichermaßen am stärksten divergent zu den D4-Domänen der *Lb*-200-Orthologa entwickelt haben. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die D4-Domänen der *Lb*-210-orthologen Gene andere Funktionen ausüben als die entsprechenden Domänen ihrer paralogen Gene (*Leishmania Lb*-200-Orthologa).

Möglicherweise fanden in den D4-Domänen der *Lb*-210-orthologen Gene die entscheiden Veränderungen statt, die diese Proteine befähigen, eine andere Wirkung auszuüben, die eventuell an der Vermittlung der Antimon-Resistenz beteiligt ist.

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den D4-Domänen der *Lb*-210- und *Lb*-200-orthologen Sequenzen ist eine Transaktivierungsdomäne (9aa TAD), die nur in den *Lb*-210-Orthologa vorhergesagt wird (Abb. 3.41). Diese Domäne wurde in einer Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert, die durch Protein-Protein-Interaktionen bei der Zusammenstellung der Transktiptionsmaschinerie in höheren Eukaryoten regulierend auf die Genexpression wirken [97]. Während in den meisten Organismen die Kontrolle der Genexpression hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation liegt, erfolgt sie in Trypanosomatidae ausschließlich post-transkriptionell [20]. Aufgrund der nicht vorhandenen genspezifischen Transkriptionsregulation kann über die Funktion der Domäne in den *Lb*-210-orthologen Genen nur spekuliert werden. Die vorhergesagten 9aa TAD der *Lb*-210-Orthologa könnten z.B. über Protein-Protein Interaktionen mit unbekannten Proteinen Komplexe bilden, die an der Vermittlung der Antimon-Resistenz beteiligt sind. Ebenso könnte über diese Domäne Interaktionen zu Transmembranpumpen stattfinden, die den Im- und Export von Molekülen regulieren was sich wiederum positiv auf die Wirkstoff-Konzentration in der Zelle auswirkten kann.

Die Proteindomäne DUF1935 ist anhand der aktuell verfügbaren Sequenzdaten nur innerhalb der Familie der Trypanosomatida anzutreffen. Die für *Lb*-200 und *Lb*-210 bereits erwähnte charakteristische Anordnung vier repetitiver DUF1935-Domänen (Abb. 3.37) ist neben den entsprechenden orthologen Genen in keiner anderen Sequenz anzutreffen. Im Gegensatz dazu verfügen alle weiteren identifizierten Sequenzen über jeweils nur eine DUF1935-Domäne, die auch in Kombination mit weiteren Domänen auftritt. In Abb. 4.1 sind alle auftretenden Domänen-Architekturen (DA) anhand ausgewählter Sequenzen dargestellt (Gruppe DA-1 bis -6), wobei die Anzahl der jeweils vorhandenen Sequenzen im *L. braziliensis*-Genom in Klammern angegeben ist.

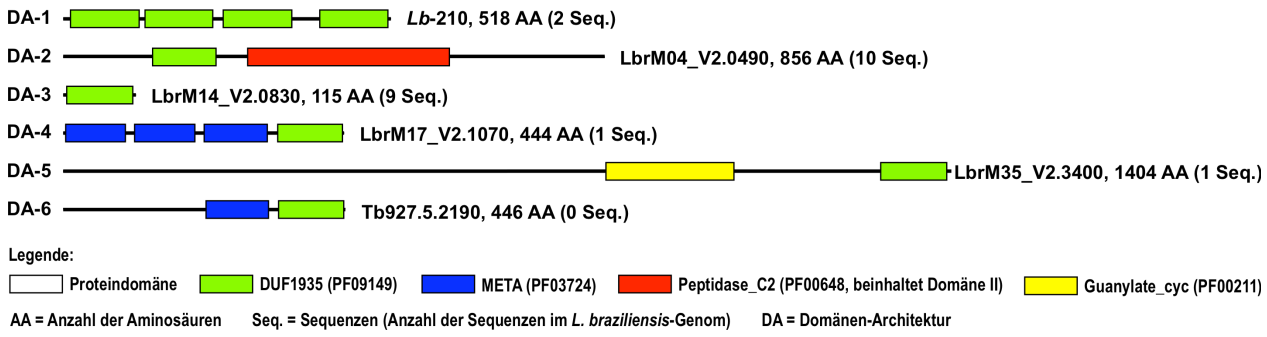

Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Domänen-Anordnungen von Sequenzen, in denen die DUF1935-Domäne vertreten ist. Die Proteindomänen-Architekturen, in denen die DUF1935-Domäne auftritt, wurden anhand der PFAM-Datenbank (http://pfam.sanger.ac.uk/family/DUF1935) ermittelt. Ein Abgleich der Domänen-Anordnung der ermittelten Sequenzen dem Programm Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) führte zu sechs Architekturen (DA-1 bis 6). Exemplarisch wurde die Domänen-Anordnungen von jeweils einem Protein aus jeder Gruppe dargestellt. Der Name und die Aminosäuren-Anzahl sind am Ende der jeweiligen Sequenzen angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Sequenzen angegeben, die der jeweiligen Gruppe im *L. braziliensis*-Genom angehören.

Wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich ist, vereinen Gruppe DA-2 und -3 die meisten Sequenzen, deren Produkte in den Datenbanken größtenteils der Calpain-Superfamilie zugeordnet werden.
In einer Studie über die Calpain-Superfamilie in Kinetoplastida [131] wurden eine Reihe von Calpain-ähnliche Proteine (CALPs) aufgrund einer sog. Domäne II, die der katalytischen Domäne der konventionellen Calpainen ähnlich ist, identifiziert (vergleichbar mit Gruppe DA-2, Abb. 4.1). Dabei viel auf, dass viele dieser Sequenzen N-terminal eine Domäne I^K (entspricht der DUF1935-Domäne) unbekannter Funktion aufwiesen. Daher wurden die Sequenzen, die zwar nicht über Domäne II, aber über die Calpain-assoziierte Domäne I^K verfügen, den *small kinetoplastid calpain-related* Proteinen (SKCRPs) zugeordnet (vergleichbar mit Gruppe DA-1, -3 und -4, Abb. 4.1). Phylogenetische Untersuchungen basierend auf Domäne II ergaben, dass die Ausprägung der Domäne I^K nach einer initialen Verdoppelung der Domäne II-tragenden Gene stattfand. Phylogenetische Untersuchungen auf der Basis von Domäne I^K brachten keinen Erkenntnisgewinn. Aufgrund der Vielfalt an Sequenz-Modul-Architekturen wird spekuliert, dass die individuellen Proteine verschiedene zelluläre Funktionen ausüben.
In einer weiteren Studie konnte an dem *Leishmania* Protein SMP-1 (SKCALP, Gruppe DA-3, Abb. 4.1) gezeigt werden, das *in vivo* zwei langkettige Fettsäuren angehängt werden, die für die Lokalisation des Proteins am Flagellum benötigt werden. Das Protein konnte nur in der promastigoten Form nachgewiesen werden [132].
Ebenso wie SMP-1 konnte das Protein *Tb*CAP5.5 (CALP, Gruppe DA-2, Abb. 4.1) in *T. brucei* nur in der prozyklischen Form (Insektenstadiums) nachgewiesen werden [133], wohingegen das nahe verwandte Protein *Tb*CALP2 (CALP, Gruppe DA-2, Abb. 4.1) in allen Stadien des Lebenszyklus exprimiert wird [134].
Im Gegensatz zu *Tb*CALP2 verfügt *Tb*CAP5.5 über das gleiche Acylierungs-Motif wie SMP-1, das aus Glycin und Cystein an Position 2 und 3 besteht. Experimentell konnte gezeigt werden, dass zwei langkettige Fettsäuren an das Motif angehängt werden und Lokalisationsstudien brachten CAP5.5 mit dem Zytoskelett, bzw. mit den subpelliculären Mikrotubuli in Verbindung [134]. Weder *Lb*-210 und *Lb*-200 noch deren orthologe Sequenzen weisen das charakteristische Acylierungs-Motif auf. Daher sind die Produkte eher nicht Zytoskelett- oder Membran-assoziiert.
Ein phylogenetischer Vergleich der DUF1935-Domänen D1 bis D4 der Sequenzen *Lb*-210 und *Lb*-200 mit allen im Genom von *L. braziliensis* vorkommenden DUF1935-Domänen ist in Abb. 4.2 dargestellt. Die orthologen Sequenzen der Proteine *Lm*SMP-1 und *Tb*CALP2 im *L. braziliensis* Genom sind entsprechend gekennzeichnet, während die orthologe Sequenz von *Tb*CAP5.5 nicht mit einbezogen wurde, da sie im *L. braziliensis* Genom über keine DUF1935-Domäne verfügt.

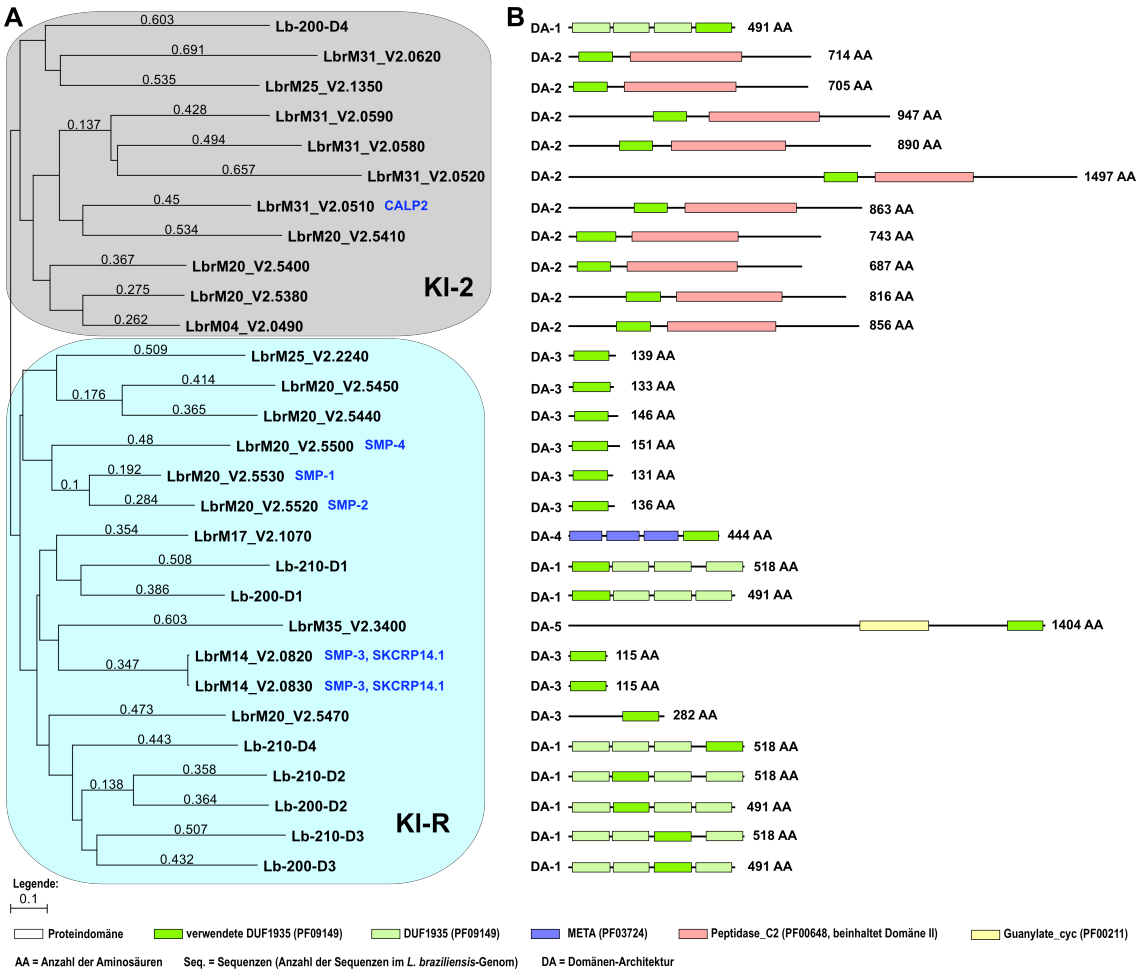

Abb. 4.2 Phylogenetische Beziehung aller im *L. braziliensis*-Genom identifizierten DUF1935-Domänen. Die phylogenetische Beziehung zwischen den jeweiligen Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteindomänen DUF1935 wurde mit dem Programm MacVector erstellt (Methode: *Neighbor Joining, Best tree*, *tie breaking* = *Systemic*, *Gaps distributed proportionally*). Einbezogen wurden orthologe Gene zu Gen *Lb*-200 bzw. orthologe Gene zu Gen *Lb*-210, die mit dem Programm TriTrypDB, Version 2.1 identifiziert wurden. Die Aufteilung in zwei Kladen wurden farblich markiert und mit D1 und D4 benannt. Die Namen der Proteine sind in blauer Schrift angegeben. (B) Die Proteindomänen-Architektur der zu (A) korrespondierenden Genen ist schematisch abgebildet. Die verwendete DUF1935-Domäne ist mit einem kräftigen Grün hervorgehoben.

Bei der phylogenetischen Analyse der *L. braziliensis*-DUF1935-Domänen in Abb. 4.2 fällt auf, das sich zwei Kladen (KI-2 und KI-R) bilden, die mit den Domänen-Architekturen korrelieren. Dabei vereint Klade KI-2 alle Sequenzen mit der Architektur DA-2 während sich die restlichen (DA-1, -3, -4 und -5) in Klade KI-R einordnen. Eine Ausnahme stellt dabei Domäne *Lb*-200-D4 dar, die sich ebenfalls in Klade KI-2 einordnet. Die Aufteilungen der DUF1935-Domänen in zwei Kladen könnte bedeuten, dass die Domänen einer Klade ähnliche Funktionen im Protein ausführen. Demzufolge würden die DUF1935-Domänen *Lb*-200-D4 und *Lb*-210-D4 unterschiedliche Aufgaben ausüben, die die unterschiedlichen Funktionen der Proteine erklären könnten.

Die zur DUF1935-Domäne *Lb*-210-D4 am nächsten verwandten Sequenzen, abgesehen von den Domänen des selben Gens und *Lb*-200, sind LbrM20_V2.5470 und LbrM14_V2.0820/30 (*SKCRP14.1*). Interessant ist, dass das Produkt *Ld*SKCRP14.1 in einem Sb-resistenten *L. donovani* Feldisolat gegenüber einem sensitiven Stamm deutlich schwächer exprimiert wird. Entsprechend wurde auch gezeigt, dass eine Überexpression von *Ld*SKCRP14.1 in dem

resistenten Stamm eine Re-Sensibilisierung gegenüber Antimon bewirkte. Interessanterweise konnte durch die Überexpression eine Resistenz gegenüber Miltefosin erzeugt werden [83].
Die gegensätzlichen Einflüsse auf Antimon-Sensitivität beider DUF1935-tragenden Sequenzen (SKCRP14.1 und *Lb*-210) in Sb-resistenten Zellen könnten z.B. durch eine antagonistische Funktion beider Proteine an gleichen Zielstrukturen erklärt werden. Einer Konkurrenz um die selben Bindungsstellen einer Zielstruktur würde bei einer Bindung mit *Lb*-210 zur Ausprägung einer Resistenz führen, während eine Bindung mit *Ld*SKCRP14.1 eine Sb-Intoleranz verursachen würde. In diesem Kontext stellt sich die Frage, wie sich eine Überexpression von *Lb*-210 auf eine Miltefosin-Toleranz der Zellen auswirken würde, da eine Überexpression von *Ld*SKCRP14.1 eine Miltefosin-Resistenz hervorruft [83].

Charakteristisch für die Gruppe der *Lb*-210-orthologen Sequenzen ist der bereits erwähnte Sequenzeinschub zwischen den DUF1935-Domänen D3 und D4 (Abb. 3.37). Auffällig ist dabei, dass die Einschubsequenzen aller *Lb*-210-Orthologa über genau 31 Aminosäuren verfügen (Abb. 4.31). Diese Spezies-übergreifende konstante Länge spricht dafür, dass der gleiche Selektionsdruck ausgeübt wird, der für Erhalt der Länge der Einschubsequenzen einsteht. Aufgrund der Domänen-Anordnungen könnte die Intersequenz für die korrekte Positionierung der Domäne DUF1935-D4 in der Tertiärstruktur verantwortlich sein. Bei der Suche nach dem Ursprung dieser Sequenz führten Datenbankrecherchen zu zwei *L. infantum*-Genen, LinJ06_V3.0800 und LinJ17_V3.0850 (ausgenommen den orthologen und artfremden Sequenzen). Von keinem dieser Gene ist die Funktion bekannt. Nur zwei RNA-Bindedomänen deuten eine mögliche Funktion der Sequenz LinJ06_V3.0800 an. Ein Abschnitt der Sequenz von LinJ17_V3.0850 weist Übereinstimmungen im N-terminalen Bereich der Einschubsequenz auf, wohingegen ein Abschnitt der Sequenzen von LinJ06_V3.0800 Übereinstimmungen im C-terminalen Bereich aufweisen. Die Entstehung der Einschubsequenz könnte daher durch zwei unabhängige Rekombinations-ereignisse aus den entsprechenden Vorläufer-Gene entstanden sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, das die *Lb*-210-orthologen Gene *Leishmania*-spezifische Aufgaben erfüllen. Es ist zu vermuten, dass der molekulare Antimon-Resistenzmechanismus über die C-terminalen DUF1935-Domäne-D4 vermittelt wird, vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten zur Identifizierung des Gens *Lb*-210, das durch Überexpression Sb(III)-Resistenz in *L. infantum* vermittelt. Eine Überexpression dieses dominanten Resistenzmarkers konnte zum Teil auch in Sb-resistenten *L. braziliensis* Feldisolaten nachgewiesen werden, was auf einen natürlichen und Spezies-übergreifenden Resistenz-mechanismus schließen lässt. Viele Indizien sprechen dafür, dass der molekulare Resistenz-mechanismus dieses Gens über die C-terminale DUF1935-Domäne vermittelt wird.

Weiteren Untersuchungen sollten klären, inwieweit das identifizierte Gen bzw. seine Orthologa den Parasiten Schutz vor pentavalenten Antimonverbindungen (Sb(V)) vermittelt, die in der Anti-

Leishmania-Therapie zum Einsatz kommen. Da Sb(V) nicht oder nur geringfügig toxisch auf Promastigote wirkt [59, 60], würden sich zur Bestätigung meiner Ergebnisse Versuche mit intrazellulären Amastigoten anbieten. Die aussagekräftigsten Ergebnisse würden durch standardisierte Makrophagen-Infektionssysteme erzielt werden, mit denen sich die Resultate laborübergreifend vergleichen lassen [113, 114].

Anschließende Untersuchungen sollten idealerweise zur Aufklärung des Resistenzmechanismus beitragen. Dazu würden sich systematische Sequenzveränderungen des C-terminalen Bereichs anbieten, woraufhin Sb-Resistenz-Tests Rückschlüsse auf den verantwortlichen Gen-Abschnitt zulassen. Diese Sequenzveränderungen könnten z.B. durch Deletionen oder Mutationen erfolgen. Elegant wäre zudem ein Austausch der DUF1935-D4 Sequenzen der paralogen Gene (*Lb*-200 und *Lb*-210) oder die Insertion einer Einschubsequenz zwischen den DUF1935-D3 und -D4 Domänen in *Lb*-200. Gezielte Mutationen in der identifizierten 9aa TAD in Anlehnung an schon beschriebene *loss-of-funktion* Mutanten [97] können über das Vorhandensein dieser Domäne Auskunft geben.

Nicht zuletzt bringen Untersuchungen auf Kreuzresistenzen z.B. zu anderen Anti-*Leishmania*-Therapeutika Erkenntnissen, die im Zusammenhang mit dem Resistenzmechanismus stehen. Aufgrund der spekulierten antagonistischen Wirkung zu dem DUF1935-tragenden Gen *SKCRP14.1* in Bezug auf die Sb-Resistenz und die in der Literatur beschriebene Resistenzvermittlung von SKCRP14.1 gegen Miltefosin [83] ist es interessant zu untersuchen, wie sich eine Überexpression von *Lb*-210 in *Leishmania* auf die Miltefosin-Toleranz auswirkt.

5. Zusammenfassung

Einzellige Protozoen der Spezies *Leishmania braziliensis* sind die Erreger einer Form der kutanen Leishmaniasis (CL), die sich in vielen Fällen zur entstellenden und lebensbedrohlichen mukokutanen Leishmaniasis (MCL) entwickeln kann.
Zur Behandlung von *Leishmania*-Infektionen werden seit über 60 Jahren pentavalente Antimon(Sb)-Verbindungen eingesetzt, die bis heute die Therapeutika der Wahl sind. Im Laufe dieser Zeit verzeichneten bestimmte Endemiegebiete einen erheblichen Anstieg von Sb-Therapie-Resistenzen. Fortschreitende Entwicklungen von Sb-Resistenzen in *Leishmania*, einschließlich *L. braziliensis*, erfordern eine Entwicklung verlässlicher Resistenzmarker, sowohl um eine adäquate Behandlungen der *Leishmania*-Infektionen zu gewährleisten als auch zur Entwicklung verbesserter Medikamente und zur epidemiologischen Erfassung bzw. Beobachtung zur Sb-Resistenz beizutragen.

Nach dem Prinzip der Funktionellen Komplementation wurde eine Cosmidbank-DNA aus einem Sb-resistenten *L. braziliensis* Feldisolat auf Sb-Resistenzmarker hin untersucht. Dabei kamen zwei unterschiedliche *Leishmania*-Systeme zur Anwendung. Zum einen wurde die Cosmidbank-DNA in ein Sb(III)-sensitives *L. braziliensis* Feldisolat transfiziert, woraufhin drei unabhängige Sb(III)-Selektionen zu dem selben dominanten Cosmid, pcosC1.6 führten, dessen *insert*-DNA einen genomischen Bereich auf Chromosom 20 repräsentiert. Zum anderen wurde die gleiche Cosmidbank-DNA in den nahe verwandten Organismus *L. peruviana* transfiziert, woraufhin die Sb(III)-Selektion zu dem dominanten Cosmid pcosC4-1.28 führte, dessen *insert*-DNA in genau acht intakten offenen Leserahmen mit pcosC1.6 überlappt.
Um zwischen qualitativen und quantitativen Effekten zu unterscheiden, wurde ein dritter *in vitro*-Sb(III)-*screen* durchgeführt, bei dem eine Cosmidbank-DNA aus einem Sb(III)-sensitiven *L. braziliensis* Feldisolat in den Klon des gleichen, sensitiven Isolats eingebracht wurde. Nach zwei aufeinanderfolgenden *in vitro*-Sb(III)-Selektionen dominierte das Cosmid pcosA3, das ähnlich wie pcosC4-1.28, in den gleichen acht intakten, offenen Leserahmen mit pcosC1.6 überlappt (Diplomarbeit L. Trübe, Universität Rostock, 2009). Daher handelt es sich bei der beobachteten Resistenz mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen dominanten Gendosis-Effekt.
Um den Resistenz-vermittelnden Bereich einzugrenzen wurden systematische Deletionen im Cosmid pcosC1.6 vorgenommen. Funktionstests der Deletionskonstrukte im *L. braziliensis*-System führten jedoch zu inkonsistenten Daten. Dahingegen konnte im *L. infantum*-System reproduzierbar auf das *in vitro*-Sb(III)-Resistenz-vermittelnde Gen LbrM20_V2.0210 (*Lb*-210) selektiert werden. Das Produkt des Gens ist ein konserviertes, hypothetisches Protein, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. *In silico* Analysen ermitteln vier repetitive Proteindomänen unbekannter Funktion, DUF1935, die bisher nur innerhalb der Familie der Trypanosomatida gefunden wurden. Ebenso wie *Lb*-210 verfügt das benachbarte Gen LbrM20_V2.0200 (*Lb*-200) über vier DUF1935-Domänen, vermittelte jedoch in meinen Untersuchungen keine Sb(III)-Resistenz. Somit können Unterschiede dieser Gene auf mögliche Resistenzmechanismen hinweisen.
Ausgedehnte phylogenetische Untersuchungen und Datenbank-Recherchen beider Sequenzen (*Lb*-200 und *Lb*-210) weisen darauf hin, dass der molekulare Resistenzmechanismus vom C-

Terminus von *Lb*-210 ausgeht, wobei insbesondere eine spezifische Sequenz vor der C-terminalen DUF1935-Domäne sowie die C-Terminale DUF1935 selbst impliziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass Komplementations-Experimente auch im *L. braziliensis*-System reproduzierbare Ergebnisse liefern. Dies gilt allerdings nur für lange *inserts* genomischer DNA (gDNA); einer Verkürzung des gDNA-Anteils führt zu inkonsistenten Ergebnissen. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtungen kann eine intakte RNAi-Maschinerie in *L. braziliensis* sein. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass Untersuchungen der *L. braziliensis*-Deletionskonstrukte in dem RNAi-freien Organismus *L. infantum* reproduzierbare und eindeutige Ergebnisse lieferten.

Somit kann die leistungsstarke Methode der Genetischen Komplementation, wenn auch mit Einschränkungen, ebenfalls im potentiell RNAi-fähigen Subgenus *Viannia* zum Einsatz kommen. Dabei ist darauf zu achten, die endgültige Identifizierung der implizierten Gene in einem möglichst nahe verwandten Organismus durchzuführen, der episomale Expression unterstützt.

Die Analyse von Patienten-Isolaten aus therapieresistenten *L. braziliensis*-Infektionen zeigte weiterhin, dass es auch in natürlichen Parasiten-Populationen zur teilweise deutlich erhöhten *Lb*-210-Expression kommt. Somit haben die erzielten Ergebnisse potenziell eine Relevanz für die Resistenz-Ausprägung im Feld.

5.1 Abstract

Unicellular protozoa parasites of the species *Leishmania braziliensis* are the causative agents of cutaneuos and mucocutaneous leishmaniasis.
For more than 60 years pentavalent antimonials have been the first line drugs against *Leishmania* infections, and have experienced an increase in resistance in important endemic regions. Increasing resistance in the leishmaniae, including *L. braziliensis*, underscores the urgent need for the development of reliable molecular markers of resistance. This not only to ensure an optimized treatment of the disease but also to support new drug development and epidemiological studies into the spread of antimony resistance.

To this end, a functional cloning strategy was employed. First, a cosmid DNA library dereived from an Sb(III) resistant donor strain was transfected into a Sb(III)-sensitive acceptor clone. Repeated selections of the recombinant population under Sb(III) pressure yielded the same cosmid, pcosC1.6. Its genomic DNA insert corresponds to a region on chromosome 20. Also, the same cosmid library was used to transfect the closely related species *L. peruviana*. The subsequent Sb(III) selections produced a single dominant cosmid, pcosC4-1.28, which overlaps pcosC1.6 in eight open reading frames, implicating the same region on chromosome 20.
To distinguish between qualitative (i.e. sequence variation) and quantitative (i.e. gene dosis) effects, a third Sb(III) screen was performed in which a cosmid library taken from the Sb(III)-sensitive donor was transfected into the same sensitive *L. braziliensis* clone. Two consecutive screens revealed a single dominant cosmid, pcosA3, which again overlaps with the previously identified region on chromosome 20. We conclude that the observed resistance is a dominant gene dosis effect.
To identify the resistance mediating region, systematic deletions were performed on pcosC1.6. Screens using these deletion constructs in the *L. braziliensis* system yielded inconsistent data, while identical screens using *L. infantum* as acceptor species identified one gene, LbrM20_V2.0210 (*Lb*-210), which reproducibly confers in vitro Sb(III) resistance. The product of this gene is described as a conserved, hypothetical protein of unknown function. *In silico* analyses revealed four protein domains of unknown function, DUF1935, unique to the family of Trypanosomatida. Similar to *Lb*-210 the neighboring gene LbrM20_V2.0200 (*Lb*-200) also shows four DUF1935 domains but did not confer Sb-resistance in my screens. Hence differences between these genes may point at the structures for resistance and possibly at the mechanisms.
The results of extensive phylogenetitic analyses and database searches of both sequences (*Lb*-200 and *Lb*-210) implies that resistance is determined in the C-terminal sequence of *Lb*-210, in particular in the fourth DUF1935 domain and the divergent sequence between the third and fourth DUF1935.

The results of this work show that complementation genetics can be applied to the *L. braziliensis*-System and yield reproducible results, when long inserts of genomic DNA (gDNA) are used; short gDNA inserts result in inconsistent data. One plausible explanation for this be the newly discovered RNAi-machinery of *L. braziliensis*. This explanation is corroborated by the clear-cut data obtained in the RNAi-free acceptor species *L. infantum*. Consequently the powerful methodology of

functional cloning can be used in the RNAi-competent *Viannia* subgenus with some restrictions. Care should be taken to perform the final identification of the selected genes using a related acceptor organism, which supports episomal expression.

An analysis of *L. braziliensis*-isolates from *L. braziliensis* infections revealed that natural parasite populations, too, can show a significant *Lb*-210 overexpression. In three cases, treatment failure coincided with increasing expression levels. We conclude that variations of *Lb*-210 expression occur within natural populations and may be associated with a resistance phenotype.

6. Anhang

Wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben sind hier Sequenzvergleiche der mit dem DNA-Oligonukleotid *pr*-M13-R ermittelten partiellen Sequenzen der Cosmide pcosC1.2, -C1.10, -C2.3 und -C3.18 in Abbildung 6.1 dargestellt, die eine lange Kernsequenz von etwa 767 bp Länge mit annähernd 100 % Identität aufweisen.

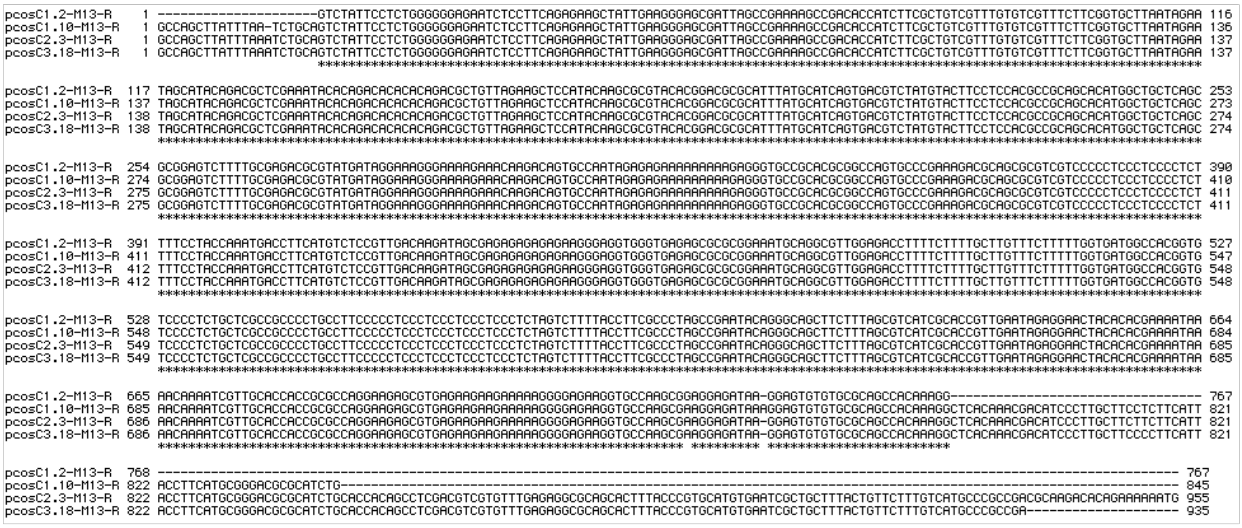

Abb. 6.1 Sequenzvergleich der mit *primer pr*-M13-R ermittelten partiellen Sequenzen der Cosmide pcosC1.2, -C1.10, -C2.3, -C3.18. Dargestellt ist ein *ClastalW Alignment* der mit *primer pr*-M13-R partiell ermittelten Sequenzen der Cosmide pcosC1.2, -C1.10, -C2.3, -C3.18. Das Alignment wurde mit dem Programm MacVector, Version 10.5.1, durchgeführt.

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Sb(III)-Selektionen ermittelten Cosmidtypen wurden z.T. ansequenziert (2.2.17), um so die *insert*-DNA zu ermitteln. Die anhand des *L. braziliensis*-Genomprojekts (TriTrypDB, Version 2) ermittelten Ergebnisse dieser *insert*-DNA, insbesondere die darauf lokalisierten offenen Leserahmen aller ansequenzierten Cosmidtypen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Offene Leserahmen der im Zuge dieser Arbeit ansequenzierten Cosmide

pcosC1.2; pcosC1.10; pcosC2.3; pcosC3.18					
Systematischer Name (GeneDB)	theoretisches Molekulargewicht [kDa]	Aminosäuren	Isoelektrischer Punkt [pH]	Produkt	Bemerkung
genomische *Insert*-DNA nicht bekannt (3.2.6.2), Bereich auf Chromosom 8, Region bis etwa 357 054					

pcosC1.3					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM13_V2.0410	37,15	344	8,95	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0420	35,79	328	9,48	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0430	30,93	277	8,89	Acetyl-Transferase-ähnliches Protein	
LbrM13_V2.0440	45,28	426	9,07	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0450	29,4	277	5,12	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0460	144,71	1328	5,03	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0470	66,64	611	5,06	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0480	76,52	704	5,8	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0490	50,33	445	5,02	Lectin, putativ	
LbrM13_V2.0500	57,34	534	8,38	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0510	109,95	1059	8,44	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM13_V2.0520	114,95	1072	9,29	Kinesin, putativ	Inkomplett

pcosC1.6					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM20_V2.0040	36,7	343	6,01	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0030	33,31	317	8,98	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0020	35,96	331	8,35	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0010	34,07	325	5,91	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0170	19,92	179	10,12	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0180	66,26	621	8,43	hypothetisches Protein	
LbrM20_V2.0190	90,73	826	7,55	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0200	56,07	491	4,9	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0210	58,04	518	4,74	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0220	22,77	207	4,36	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0230	39,07	352	9,34	hypothetisches Protein	
LbrM20_V2.0240	81,99	719	5,36	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

pcosC1.11					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM09_V2.0740	34,91	325	9,35	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM09_V2.0750	25,97	230	6,6	*prefoldin subunit 2*, putativ	
LbrM09_V2.0760	40,32	370	6,72	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM09_V2.0770	34,92	315	8,67	hypothetisches Protein, konserviert	
Lbr.chr9_tRNA1	obsolet			tRNA	
Lbr.chr9_tRNA2	obsolet			tRNA	
LbrM09_V2.0780	49,94	453	9,96	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM09_V2.0790	57,45	534	9,47	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM09_V2.0800	37,45	354	8,97	*cleavage and polyadenylation specificity factor 30 kDa subunit*, putativ	
LbrM09_V2.0810	71,09	661	6,52	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM09_V2.0820	246,43	2257	6,01	Ubiquitin-Ligase, putativ	

pcosC1.12					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM22_V2.0050	54,52	470	5,78	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM22_V2.0060	84,76	772	8,5	Transkriptionsfaktor-ähnliches Protein	
LbrM22_V2.0070	31,49	289	6,12	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM22_V2.0080	27,82	248	5,34	Hitzeschock-Protein DNAJ, putativ	
LbrM22_V2.0090	116,12	1041	5,98	Methyltransferase, putativ	
LbrM22_V2.0100	26,91	244	7,57	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM22_V2.0105	54,34	489	9,83	hypothetisches Protein / ncRNA	
LbrM22_V2.0110	71,41	656	5,98	Glutamin-Amidotransferase, putativ / GMP-Synthase, putativ	
LbrM22_V2.0120	28,12	244	6,94	hypothetisches Protein, konserviert	

pcosC4-1.17					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
nicht ansequenziert					

pcosC4-1.26					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM27_V2.2110	162,79	1511	4,59	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett
LbrM27_V2.2120	46,15	438	7,55	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2130	11,88	110	10,01	*small nuclear ribonucleoprotein*, putativ	
LbrM27_V2.2140	623,43	5544	5,2	Cysteinprotease, putativ	
LbrM27_V2.2150	15,14	135	4,28	hypothetisches Protein	
LbrM27_V2.2160	105,45	927	7,15	FtsJ *cell division protein*, putativ	
LbrM27_V2.2170	111,8	1059	8,03	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2180	22,12	197	5,12	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2190	60,2	557	7,74	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2200	53,87	493	8,76	Lactat-Dehydrogenase-ähnliches Protein	
LbrM27_V2.2210	44,16	401	8,48	*branched-chain* Aminotransferase, putativ	
LbrM27_V2.2220	25,5	228	9,26	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2230	43,92	388	4,89	Ribonucleotid-Reduktase, putativ	
LbrM27_V2.2240	39,39	385	8,66	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2250	67,6	616	8,9	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM27_V2.2260	8,32	70	9,86	hypothetisches Protein	
LbrM27_V2.2270	17,37	148	10,01	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

pcosC4-1.28					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM20_V2.0020	35,96	331	8,35	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0010	34,07	325	5,91	Malatdehydrogenase, putativ	
LbrM20_V2.0170	19,92	179	10,12	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0180	66,26	621	8,43	hypothetisches Protein	
LbrM20_V2.0190	90,73	826	7,55	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0200	56,07	491	4,9	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0210	58,04	518	4,74	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0220	22,77	207	4,36	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0230	39,07	352	9,34	hypothetisches Protein	
LbrM20_V2.0240	81,99	719	5,36	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM20_V2.0250	146,79	1322	5,51	hypothetisches Protein, konserviert	

pcosC4-1.29					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM31_V2.2590	40,2	362	10,01	Helikase-ähnliches Protein	Inkomplett
LbrM31_V2.2600	38,44	343	9,04	mitochondriale *precursor* 2,3-*trans*-Enoyl-CoA Isomerase, putativ	
LbrM31_V2.2610	12,99	118	9,56	Metallopeptidase / Aminopeptidase, putativ	
LbrM31_V2.2620	39,14	364	5,34	p-Nitrophenylphosphatase, putativ	
LbrM31_V2.2630	26,77	245	8,16	p-Nitrophenylphosphatase, putativ	
LbrM31_V2.2640	164,6	1503	6,0	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.2650	68,57	638	6,57	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.2660	52,07	482	9,56	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.2670	88,47	830	9,01	hypothetisches Protein	Inkomplett

pcosC4-1.31					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
nicht ansequenziert					

pcosC4-1.32					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
L. braziliensis Genom: *pr*-CH-2: Region auf CHR 20; Abschnitt ? - 219 185 (E-Wert = 2,2e-93, *score* = 2215) *pr*-M13-R: Region auf CHR 13; Abschnitt ? - 495 464 (E-Wert = 2,7e-150, *score* = 3475) *L. major* Genom: *pr*-CH-2: Findet keine Übereinstimmungen *pr*-M13-R: Region auf CHR 34; Abschnitt 214 739 - ? (E-Wert = 3,7e-80, *score* = 1922) *L. infantum* Genom: *pr*-CH-2: Findet keine Übereinstimmungen *pr*-M13-R: Region auf CHR 34; Abschnitt 209 158 - ? (E-Wert = 3,3e-79, *score* = 1901)					

pcosC4-2.2					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM30_V2.0320	148,82	1363	5,21	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett
LbrM30_V2.0330	62,39	575	8,96	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0340	57,33	541	6,05	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0350	61,3	563	8,45	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0360	149,74	1380	8,99	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0370	91,32	853	5,48	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0380	85,45	792	4,81	Ku80-Protein, putativ	
LbrM30_V2.0390	67,15	607	7,96	Kinesin, putativ	
LbrM30_V2.0400	72,06	642	9,44	endosomales Membranprotein, putativ	
LbrM30_V2.0410	46,27	410	5,25	Protein-Kinase, putativ	
LbrM30_V2.0420	41,77	384	4,92	Phosphatase 2C, putativ	
LbrM30_V2.0430	26,34	244	4,97	hypothetisches Protein	
LbrM30_V2.0440	53,31	508	7,99	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM30_V2.0450	14,53	131	11,17	Histon H4	
LbrM30_V2.0460	151,71	1343	9,64	TATE DNA Transposon	
LbrM30_V2.0470	42,45	383	6,14	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

pcosC4-2.3					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM31_V2.1840	52,36	487	9,14	*thiolase protein-like* Protein	Inkomplett
LbrM31_V2.1850	36,02	328	7,31	hypothetisches Protein	
LbrM31_V2.1860	186,02	1639	9,8	TATE DNA Transposon	
LbrM31_V2.1870	27,62	246	5,92	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1880	53,43	475	6,26	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1890	20,95	186	7,61	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1900	31,37	282	8,91	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1910	30,67	275	8,47	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1920	161,3	1510	5,3	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1930	74,7	673	9,82	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1940	75,83	706	9,23	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1950	131,31	1198	8,25	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1960	42,96	384	5,61	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM31_V2.1970	43,81	410	8,15	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

pcosC4-2.7					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM08_V2.0380	398,38	3728	8,47	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett
LbrM08_V2.0390	299,76	2813	6,23	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0400	102,72	968	8,67	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0410	122,11	1164	8,7	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0420	60,71	580	6,27	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0430	26,14	220	7,4	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0440	208,84	1949	9,42	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0450	203,37	1879	6,73	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM08_V2.0460	135,70	1293	5,93	hypothetisches Protein, konserviert	Inkomplett

pcosC4-2.24					
Systematischer Name (GeneDB)	theor. MG [kDa]	AA	IEP [pH]	Produkt	Bemerkung
LbrM32_V2.0470	65,9	604	9,16	ATP-abhängige RNA-Helikase, putativ	
LbrM32_V2.0480	84,26	766	6,98	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM32_V2.0490	80,53	718	6,14	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM32_V2.0500	19,01	166	10,98	60S *ribosomal protein* L17, putativ	
LbrM32_V2.0510	31,75	290	9,33	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM32_V2.0520	28,87	267	10	40S *ribosomal protein* S2	
LbrM32_V2.0530	31,88	280	6,67	*prostaglandin f synthase*, putativ	
LbrM32_V2.0540	95,22	874	4,74	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM32_V2.0550	54,86	510	8,46	hypothetisches Protein, konserviert	
LbrM32_V2.0560	16,81	145	11,54	hypothetisches Protein, konserviert	

7. Literaturverzeichnis

1. Desjeux, P. and J. Alvar, *Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe.* Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97 Suppl 1**: p. 3-15.
2. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis.* Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
3. Desjeux, P., *The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(3): p. 239-43.
4. Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern, *Leishmaniasis and poverty.* Trends Parasitol, 2006. **22**(12): p. 552-7.
5. Bhattacharya, S.K., et al., *Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India.* Clin Infect Dis, 2004. **38**(2): p. 217-21.
6. Kafetzis, D.A., *An overview of paediatric leishmaniasis.* J Postgrad Med, 2003. **49**(1): p. 31-8.
7. Malafaia, G., *Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review.* Parasite Immunol, 2009. **31**(10): p. 587-96.
8. Schaefer, K.U., et al., *Epidemiology and clinical manifestations of visceral and cutaneous leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley, Kenya. A literature review.* Trop Geogr Med, 1994. **46**(3): p. 129-33.
9. Kedzierski, L., Y. Zhu, and E. Handman, *Leishmania vaccines: progress and problems.* Parasitology, 2006. **133 Suppl**: p. S87-112.
10. Harms-Zwingenberger G. and B. U., *Nach Deutschland importierte Leishmaniosen.* Dtsch Arztebl, 2007. **104**(45): p. 3108–13.
11. Gonzalez, C., et al., *Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(1): p. e585.
12. Bogdan, C., et al., *Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature.* Clin Infect Dis, 2001. **32**(2): p. 302-6.
13. Koehler, K., et al., *Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by Leishmania infantum.* Vet Parasitol, 2002. **109**(1-2): p. 9-17.
14. Naucke, T.J., S. Lorentz, and H.W. Grunewald, *Laboratory testing of the insect repellents IR3535 and DEET against Phlebotomus mascittii and P. duboscqi (Diptera: Psychodidae).* Int J Med Microbiol, 2006. **296 Suppl 40**: p. 230-2.
15. Naucke TJ and S. C, *Is leishmaniasis becoming endemic in Germany?* Int J Med Microbiol., 2004. **293**(Suppl 37): p. 179-81.
16. Sinha, P.K., K. Pandey, and S.K. Bhattacharya, *Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection.* Indian J Med Res, 2005. **121**(4): p. 407-14.
17. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug resistance in leishmaniasis.* Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 111-26.
18. Sundar, S., et al., *Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic.* Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1104-7.
19. Yardley, V., et al., *American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility?* J Infect Dis, 2006. **194**(8): p. 1168-75.
20. Clayton, C.E., *Life without transcriptional control? From fly to man and back again.* EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1881-8.
21. Matthews, K.R., C. Tschudi, and E. Ullu, *A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes.* Genes Dev, 1994. **8**(4): p. 491-501.

22. Ullu, E., K.R. Matthews, and C. Tschudi, *Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 720-5.
23. Stiles, J.K., et al., *Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania.* Ann Trop Med Parasitol, 1999. **93**(8): p. 781-807.
24. Sacks, D.L., *Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence.* Cell Microbiol, 2001. **3**(4): p. 189-96.
25. Akopyants, N.S., et al., *Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector.* Science, 2009. **324**(5924): p. 265-8.
26. Brittingham, A., et al., *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis.* J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3102-11.
27. Ritter, U., F. Frischknecht, and G. van Zandbergen, *Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?* Trends Parasitol, 2009. **25**(11): p. 505-10.
28. Antoine, J.C., et al., *The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages.* Trends Microbiol, 1998. **6**(10): p. 392-401.
29. Rittig, M.G. and C. Bogdan, *Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views.* Parasitol Today, 2000. **16**(7): p. 292-7.
30. Cupolillo, E., et al., *A revised classification for Leishmania and Endotrypanum.* Parasitol Today, 2000. **16**(4): p. 142-4.
31. von Stebut, E., *Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy.* Exp Dermatol, 2007. **16**(4): p. 340-6.
32. Dedet, J.P., et al., *Cutaneous leishmaniasis. The parasite.* Clin Dermatol, 1999. **17**(3): p. 261-8.
33. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 305-18.
34. Boecken, G. and A.L.d. DTG/PEG, *Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland.* 2007.
35. WHO-Expert-Committee, *Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee.* World Health Organ Tech Rep Ser, 1990. **793**: p. 1-158.
36. Ameen, M., *Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions.* Expert Opin Pharmacother, 2007. **8**(16): p. 2689-99.
37. Sanati, H., et al., *Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models.* Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(6): p. 1345-8.
38. Davidson, R.N., et al., *Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial.* Q J Med, 1994. **87**(2): p. 75-81.
39. Davidson, R.N., et al., *Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome).* Clin Infect Dis, 1996. **22**(6): p. 938-43.
40. Sundar, S., et al., *Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94**(2): p. 200-4.
41. Di Giorgio, C., et al., *Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in Leishmania infantum isolates from patients with visceral leishmaniasis.* J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(1): p. 71-6.
42. Maarouf, M., et al., *Ribosomes of Leishmania are a target for the aminoglycosides.* Parasitol Res, 1995. **81**(5): p. 421-5.
43. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and W. Solbach, *Evasion strategies of Leishmania parasites.* Parasitol Today, 1990. **6**(6): p. 183-7.

44. Hermoso, T., et al., *Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system.* EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4061-7.
45. Puentes, S.M., et al., *Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9.* J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4311-6.
46. Sacks, D.L., et al., *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, 1995. **181**(2): p. 685-97.
47. Dermine, J.F., et al., *Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis.* Cell Microbiol, 2000. **2**(2): p. 115-26.
48. Bogdan, C. and M. Rollinghoff, *The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion.* Int J Parasitol, 1998. **28**(1): p. 121-34.
49. Desjardins, M. and A. Descoteaux, *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan.* J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2061-8.
50. Descoteaux, A., G. Matlashewski, and S.J. Turco, *Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan.* J Immunol, 1992. **149**(9): p. 3008-15.
51. McNeely, T.B., et al., *Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite Leishmania.* Biochem J, 1989. **259**(2): p. 601-4.
52. Proudfoot, L., C.A. O'Donnell, and F.Y. Liew, *Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages.* Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 745-50.
53. Muller, S., et al., *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites.* Trends Parasitol, 2003. **19**(7): p. 320-8.
54. Fairlamb, A.H., et al., *Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids.* Science, 1985. **227**(4693): p. 1485-7.
55. Dumas, C., et al., *Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages.* EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2590-8.
56. Titus, R.G., et al., *Interactions between Leishmania major and macrophages.* Immunol Ser, 1994. **60**: p. 437-59.
57. Awasthi, A., R.K. Mathur, and B. Saha, *Immune response to Leishmania infection.* Indian J Med Res, 2004. **119**(6): p. 238-58.
58. Frezard, F., C. Demicheli, and R.R. Ribeiro, *Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs.* Molecules, 2009. **14**(7): p. 2317-36.
59. Sereno, D., et al., *Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action.* Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(12): p. 3097-102.
60. Shaked-Mishan, P., et al., *Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani.* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3971-6.
61. Yan, S., et al., *Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione.* J Biol Inorg Chem, 2003. **8**(6): p. 689-97.
62. Frezard, F., et al., *Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(3): p. 913-6.

63. Denton, H., J.C. McGregor, and G.H. Coombs, *Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1.* Biochem J, 2004. **381**(Pt 2): p. 405-12.
64. Gourbal, B., et al., *Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin.* J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31010-7.
65. Wyllie, S., M.L. Cunningham, and A.H. Fairlamb, *Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani.* J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39925-32.
66. Baiocco, P., et al., *Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis.* J Med Chem, 2009. **52**(8): p. 2603-12.
67. Ouellette, M., *Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites.* Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 874-82.
68. Haimeur, A. and M. Ouellette, *Gene amplification in Leishmania tarentolae selected for resistance to sodium stibogluconate.* Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1689-94.
69. Grondin, K., et al., *Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant Leishmania tarentolae.* EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3057-65.
70. Haimeur, A., et al., *Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant Leishmania.* Mol Microbiol, 1999. **34**(4): p. 726-35.
71. Guimond, C., et al., *Modulation of gene expression in Leishmania drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(20): p. 5886-96.
72. Mukhopadhyay, R., et al., *Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in Leishmania.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10383-7.
73. Legare, D., et al., *The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase.* J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26301-7.
74. Coelho, A.C., S.M. Beverley, and P.C. Cotrim, *Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major.* Mol Biochem Parasitol, 2003. **130**(2): p. 83-90.
75. Marquis, N., et al., *Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania.* Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1690-9.
76. Brochu, C., A. Haimeur, and M. Ouellette, *The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania.* Cell Stress Chaperones, 2004. **9**(3): p. 294-303.
77. Arana, F.E., et al., *Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in Leishmania tropica.* Biochem Pharmacol, 1998. **56**(9): p. 1201-8.
78. Choudhury, K., et al., *Identification of a Leishmania infantum gene mediating resistance to miltefosine and SbIII.* Int J Parasitol, 2008. **38**(12): p. 1411-23.
79. Azeredo-Coutinho, R.B., et al., *Sensitivity of Leishmania braziliensis promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other Leishmania species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis.* J Parasitol, 2007. **93**(3): p. 688-93.
80. Soto, J., et al., *Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis.* Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(4): p. 421-2.
81. Mukherjee, A., et al., *Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of Leishmania donovani.* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(2): p. 204-11.

82. Moreira, E.S., C. Anacleto, and M.L. Petrillo-Peixoto, *Effect of glucantime on field and patient isolates of New World Leishmania: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility.* Parasitol Res, 1998. **84**(9): p. 720-6.
83. Vergnes, B., et al., *A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in Leishmania donovani clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death.* Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 88-101.
84. Decuypere, S., et al., *Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in Leishmania donovani isolates from Nepal.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4616-21.
85. Mandal, S., et al., *Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of Leishmania donovani from India.* J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(3): p. 496-507.
86. Carter, K.C., et al., *Resistance of Leishmania donovani to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 88-95.
87. Mookerjee Basu, J., et al., *Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in Leishmania Infection.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(3): p. 1080-93.
88. Singh, N., R.T. Singh, and S. Sundar, *Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates.* J Infect Dis, 2003. **188**(4): p. 600-7.
89. Singh, R., et al., *Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in Leishmania parasites.* Int J Antimicrob Agents, 2010.
90. Clos, J. and K. Choudhury, *Functional cloning as a means to identify Leishmania genes involved in drug resistance.* Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(2): p. 123-9.
91. Kelly, J.M., P. Das, and A.M. Tomas, *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, 1994. **65**(1): p. 51-62.
92. Kapler, G.M., C.M. Coburn, and S.M. Beverley, *Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(3): p. 1084-94.
93. Sambrook, J. and R. DW, *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., 2001. **Third Edition**.
94. Ferretti, L. and V. Sgaramella, *Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase.* Nucleic Acids Res, 1981. **9**(15): p. 3695-705.
95. Peacock, C.S., et al., *Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.* Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 839-47.
96. Robinson, K.A. and S.M. Beverley, *Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite Leishmania.* Mol Biochem Parasitol, 2003. **128**(2): p. 217-28.
97. Piskacek, S., et al., *Nine-amino-acid transactivation domain: establishment and prediction utilities.* Genomics, 2007. **89**(6): p. 756-68.
98. Ashutosh, S. Sundar, and N. Goyal, *Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania.* J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 2): p. 143-53.
99. Sundar, S., *Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.* Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 849-54.
100. Coderre, J.A., et al., *Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2132-6.

101. Ryan, K.A., et al., *Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of Leishmania.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8609-13.
102. Kundig, C., et al., *Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite Leishmania tarentolae.* EMBO J, 1999. **18**(9): p. 2342-51.
103. Perez-Victoria, F.J., et al., *Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49965-71.
104. Hammond, S.M., A.A. Caudy, and G.J. Hannon, *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA.* Nat Rev Genet, 2001. **2**(2): p. 110-9.
105. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
106. Song, X.M., F. Yan, and L.X. Du, *[Components and assembly of RNA-induced silencing complex].* Yi Chuan, 2006. **28**(6): p. 761-6.
107. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.* Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
108. Yang, D., H. Lu, and J.W. Erickson, *Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in Drosophila embryos.* Curr Biol, 2000. **10**(19): p. 1191-200.
109. Zhang, W.W. and G. Matlashewski, *Loss of virulence in Leishmania donovani deficient in an amastigote-specific protein, A2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8807-11.
110. Zhang, W.W. and G. Matlashewski, *Analysis of antisense and double stranded RNA downregulation of A2 protein expression in Leishmania donovani.* Mol Biochem Parasitol, 2000. **107**(2): p. 315-9.
111. Wong, A.K., M.A. Curotto de Lafaille, and D.F. Wirth, *Identification of a cis-acting gene regulatory element from the lemdr1 locus of Leishmania enriettii.* J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26497-502.
112. Deniau, M., et al., *The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients.* Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97 Suppl 1**: p. 115-33.
113. da Luz, R.I., et al., *In vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 5197-203.
114. Vermeersch, M., et al., *In vitro susceptibilities of Leishmania donovani promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3855-9.
115. Geretti, A.M., *The clinical significance of viral fitness.* J HIV Ther, 2005. **10**(1): p. 6-10.
116. Machuca, C., et al., *Leishmania amazonensis: metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker.* Exp Parasitol, 2006. **114**(1): p. 1-9.
117. Uzcategui, N.L., et al., *Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant Leishmania parasites.* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2005. **140**(3-4): p. 395-402.
118. Natera, S., et al., *Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites.* Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(6): p. 637-42.
119. Beverley, S.M., *Gene amplification in Leishmania.* Annu Rev Microbiol, 1991. **45**: p. 417-44.
120. Segovia, M., *Leishmania gene amplification: a mechanism of drug resistance.* Ann Trop Med Parasitol, 1994. **88**(2): p. 123-30.

121. Borst, P. and M. Ouellette, *New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa.* Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 427-60.
122. Anacleto, C., et al., *Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant Leishmania (Viannia) guyanensis cell line.* Parasitol Res, 2003. **90**(2): p. 110-8.
123. Ferreira-Pinto, K.C., et al., *Leishmania (V.) guyanensis: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines.* Can J Microbiol, 1996. **42**(9): p. 944-9.
124. Haimeur, A., et al., *Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant Leishmania tarentolae.* Mol Biochem Parasitol, 2000. **108**(1): p. 131-5.
125. El Fadili, K., et al., *Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(5): p. 1988-93.
126. Myler, P.J., et al., *Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2902-6.
127. El-Sayed, N.M., et al., *Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.* Science, 2005. **309**(5733): p. 404-9.
128. Hall, N., et al., *The DNA sequence of chromosome I of an African trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. 4864-73.
129. Worthey, E.A., et al., *Leishmania major chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): p. 4201-10.
130. Douzery, E.J., et al., *The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15386-91.
131. Ersfeld, K., H. Barraclough, and K. Gull, *Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites.* J Mol Evol, 2005. **61**(6): p. 742-57.
132. Tull, D., et al., *SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in Leishmania.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(11): p. 4775-86.
133. Matthews, K.R. and K. Gull, *Evidence for an interplay between cell cycle progression and the initiation of differentiation between life cycle forms of African trypanosomes.* J Cell Biol, 1994. **125**(5): p. 1147-56.
134. Hertz-Fowler, C., K. Ersfeld, and K. Gull, *CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in Trypanosoma brucei.* Mol Biochem Parasitol, 2001. **116**(1): p. 25-34.
135. Von Brand, T., E.J. Tobie, and et al., *Physiological and pathological observations on four strains of Trypanosoma cruzi.* J Infect Dis, 1949. **85**(1): p. 5-16.
136. Calvopina, M., et al., *Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: relationships with geographic distribution and clinical presentation.* BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 139.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Agarosegelelektrophorese
As(III)	dreiwertiges Arsenit
B	Belgien
BLAST	*basic local alignment search tool*
AQP1	Membranprotein (*aquaglyceroporin*)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CALP	Calpain-ähnliches Protein
CH	Schweiz
CL	Kutane Leishmaniasis
cos	Cosmid
D	Deutschland
ddH_2O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotriphosphat
DUF1935	*domain of unknown Funktion no.* 1935
E. coli	*Escherichia coli*
et al.	*et alii* (und andere)
FCS	Fötales Kälberserum
FIGE	Feldinversions-Gelelektrophorese
g	Erdbeschleunigung, Gramm
G418	Geneticindisulfat
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
HIV	*human immunodeficiency virus*
IEP	isoelektrischer Punkt
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
L.	*Leishmania*
LB	Luria Bertani
Lb	*Leishmania braziliensis*
Lb-210	LbrM20_V2.0210 (*L. braziliensis* Leserahmen TriTrypDB, Version 2)
Ld	*Leishmania donovani*
Li	*Leishmania infantum*
LT	Litauen
M	Mol pro Liter (molar)
MCL	Mukokutane Leishmaniasis
MDR	*multi drug resistance*

MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRPA	ABC-Transporter Protein
mod.	modifiziert(es)
ms	Millisekunden
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NL	Niederlande
OD	optische Dichte
p	Plasmid
Prof.	Professor
PSI-BLAST	*position specific iterative*-BLAST
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sb	Antimon
Sb(III)	dreiwertiges Antimon
$Sb(III)^{R/S}$	Antimon(III)-Resistenz/Sensitiv
Sb(V)	fünfwertiges Antimon
$Sb(V)^{R/S}$	Antimon(V)-Resistenz/Sensitiv
Seq.	Sequenz
SKCRP	*small kinetoplastid calpain-related* Protein
sog.	sogenannte/s
SSG	Natrium-Stibogluconat
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tb	*Trypanosoma brucei*
Tc	*Trypanosoma cruzi*
U	*Unit* (enzymatische Wirkungseinheit)
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland *(United Kingdom)*
unb.	unbekannt
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (*United States of America*)
VL	Viszerale Leishmaniasis
WHO	*World Health Organisation*
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Dr. Joachim Clos, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die überaus kompetente und immer freundliche Betreuung bedanken. Zudem gilt ihm ein großes Dankeschön für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung meines Forschungsaufenthalts in Lima, durch den ich viele interessante und neue Eindrücke gesammelt habe.

Herrn Prof. Dr. Günter Adam danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Dorothea Zander, die für mich nicht nur die *real-time* RT-PCR durchgeführt hat, sie war mir auch immer eine Hilfe bei den allgemeinen Laborarbeiten. Auch danke ich ihr für die lieben Pakete mit den dringend benötigten Ersatzteilen und den leckeren Beigaben nach Lima.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen für die interessante Arbeitsatmosphäre bedanken. Es hat mir immer viel Spaß gemacht, Diplomanden und Praktikanten aber auch Mitarbeiter aus anderen Laboren, die kurzfristig bei uns eingesetzt wurden, zu unterstützen. Ich danke all diesen Mitarbeitern für die vielen interessanten Eindrücke, die sie mir durch ihre Offenheit, Hilfsbereitschaft und Individualität gegeben haben.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jorge Arevalo und seinem Team für die herzliche Aufnahme im Labor und für die vielen Hilfestellungen bedanken, durch die ich mich in der anfänglich fremden Stadt Lima sehr schnell wohl gefühlt habe.

Ich möchte hier an meinen Kollegen Manfred Krömer erinnern, der durch seine hilfsbereite und ruhige Art, seinen vielen praktischen Ideen und seinen interessanten Lebenserfahrungen uns allen eine Bereicherung war. Viel zu früh und unerwartet bist du einfach gegangen. Ich habe es leider nicht geschafft, mich persönlich von dir zu verabschieden, daher sage ich dir an dieser Stelle: Tschüss und vielen lieben Dank für deine Unterstützung.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern für die enorme Unterstützung während dieser Doktorarbeit. Auch danke ich euch dafür, mir den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht zu haben.

Liebe Ulli und lieber Julian Tjelle: Vielen Dank für alles!