Dissertation

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

an der MIN-Fakultät
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

Der Virulenzfaktor P46 und seine Bedeutung für Wirtsspezifität und Infektiosität des Parasiten *Leishmania major* [Bray *et al.*, 1973]

vorgelegt von

Eugenia Bifeld

aus Alexeewka

Hamburg, 2014

Diese Arbeit wurde zwischen Januar 2011 und Februar 2014 in der Arbeitsgruppe und unter der Anleitung von PD Dr. Joachim Clos am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter:	PD Dr. Joachim Clos Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Abteilung für Molekulare Parasitologie Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
2. Gutachter:	Prof. Dr. Wilhelm Schäfer Biozentrum Klein Flottbek Abteilung für Molekulare Phytopathologie und Genetik Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

Disputation am 04.07.2014

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater **Joachim Clos** danken, nicht nur für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, sondern auch für eine erfüllte Zeit, in der ich viel gelernt und mich selbst weiter entwickelt habe. Du hast nie an meinen Fähigkeiten gezweifelt, das hat mich sehr gestärkt. Danke, dass Du immer ein Ansprechpartner und ein guter Motivator warst.

Professor **Wilhelm Schäfer** möchte ich herzlich für die Übernahme der Promotionsbetreuung, sein Interesse an meiner Arbeit sowie die Begutachtung der Dissertation danken.

Der **AG Osterloh** danke ich sehr für die Einführung in das lentivirale Expressionssystem, die Möglichkeit, es in Ihrem Labor zu testen, sowie die Zellproben und die große Hilfsbereitschaft.

Ein ganz großes Dankeschön geht an **Dorothea Zander** für das Ausknobeln und Ausführen perfekter qRT-PCRs und für die bereitwillige Übernahme einiger Arbeiten am Projekt. Das hat mir sehr geholfen. Du bist unsere Laborfee!

An dieser Stelle richte ich meinen Dank auch an die anderen Personen, die am P46-Projekt mitgearbeitet haben: **Anja Brühl**, **Sina Rampcke** und **Laura J. Lee**.

„Anne“ McDonald danke ich für die Bilder aus dem Bunkerraum und die unermüdliche Motivation, so viel wie möglich aus den Proben herauszuholen. Dank Dir konnte ich ein schönes Foto von den „unsichtbaren“ Exosomen präsentieren.

Ich danke **Hendrik Herrmann** für die Unterstützung und Beratung von Anne in ihrem Schaffen sowie für die tollen Exosomen-Aufnahmen.

Dr. Antje Hombach und **Dr. Carola Schäfer** möchte ich für eine wunderbare Zeit im Labor danken. Ohne euch hätte ich das Projekt P46 nicht überlebt. Ich bin sehr froh über die entstandene Freundschaft.

Paloma Tejera and **Laura Lee**, thank you for being how you are. I enjoyed very much working with you. It was a perfect balance between work and fun.

Liebe **Frau Heuer**, auch Ihnen danke ich, nicht nur für die Korrekturen, sondern auch für Ihren unerschütterlichen Glauben in mich und meine Fähigkeiten. Das gibt Kraft und beseitigt Selbstzweifel. Ich bin froh, dass aus der Lehrer-Schüler-Beziehung eine Freundschaft geworden ist. Danke!

Ki, Dir danke ich für deine Bereitschaft alles stehen und liegen zu lassen und zu mir zu eilen, wenn ich nicht mehr weiter wusste. Mit Deinem Vertrauen in mich und meine Intelligenz hast Du mich unterstützt. Du weißt, wie viel Du mir bedeutest.

Meiner **Familie** bin ich für immer dankbar. Sie gibt mir jederzeit Geborgenheit und Sicherheit. Ich kann mich auf jeden von Euch verlassen, das ist eine wunderbare Basis. Vor allem meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen. Ohne Euer immerwährendes Vertrauen in mich, wäre ich nie so weit gekommen. **Mama und Papa**, ich danke Euch dafür, dass Ihr stolz auf mich seid und mir das Gefühl gebt, nie etwas falsch zu machen. Ich danke Euch für Eure Unterstützung und Euren Rückhalt. Ihr seid für mich die Wichtigsten und liebsten Menschen auf der Welt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis xii

Zusammenfassung 1

Abstract 3

1. Einleitung 5

1.1 Die Leishmaniasen 5

1.2 Die Morphologie der Leishmania spp. und ihr Lebenszyklus 7

1.3 Epidemiologie 10

1.4 Wirt-Parasitenwechselwirkungen 12

1.5 Molekulares Arsenal der Leishmania spp. 15

1.5.1 Glykokonjugate 16

1.5.2 Leishmanolysin (GP63) 18

1.5.3 Peptidasen 21

Zielsetzung der Arbeit 24

2. Material und Methoden 26

2.1 Material 26

2.1.1 Organismen und Stämme 26

2.1.1.1 Leishmania major 26
2.1.1.2 Versuchstiere 26
2.1.1.3 Zelllinien 26
2.1.1.4 Bakterienstämme 27

2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide 27

2.1.2.1 Benutzte Oligonukleotide 27
2.1.2.2 Plasmide 31

2.1.3 Antikörper 33

2.1.4 Kits 34

2.1.5 Enzyme und Größenstandards 34

2.1.6 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Zusätze 35

2.1.6.1 Zellkulturmedien 35
2.1.6.2 Nährmedien und Puffer für zellbiologische Methoden 35
2.1.6.3 Antibiotika 36
2.1.6.4 Sonstige Puffer und Lösungen 37
2.1.6.5 Puffer und Lösungen für DNA-Präparation 37
2.1.6.6 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese 37
2.1.6.7 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden 38

2.1.7 Geräte und sonstige Materialien 39

2.1.8 Computerprogramme und Datenbanken 40

2.2 Methoden 41

2.2.1 Arbeiten mit Leishmanien 41

2.2.1.1 Kultivierung von Promastigoten 41
2.2.1.2 Die Proliferationskinetik der Leishmanien in vitro 41
2.2.1.3 Kryokonservierung von Leishmanien 41
2.2.1.4 Transfektion von Leishmanien 42
2.2.1.5 Klonale Vereinzelung von Leishmanien 43
2.2.1.6 Plasmidpräparation aus rekombinanten Leishmanien 43
2.2.1.7 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien 43
2.2.1.8 Isolierung von Exosomen aus Leishmanien 44
2.2.1.9 Denaturierender Leishmania-Aufschluss 45
2.2.1.10 Fixieren von Leishmanien auf Objektträgern 46

2.2.1.11 Färbung der Zellen nach Giemsa 46
2.2.1.12 In vivo Infektion von Versuchstieren 46

2.2.2 Arbeiten mit Knochenmarksmakrophagen, HEK293T- und L929-Zellen 47

2.2.2.1 Herstellung von Knochenmarksmakrophagen 47
2.2.2.2 Ex vivo Infektionsstudien 48
2.2.2.3 Lipofektion von Knochenmarksmakrophagen 49
2.2.2.4 Nukleofektion von Knochenmarksmakrophagen 50
2.2.2.5 Kultivierung der L929-Zellen zur M-CSF Gewinnung 50
2.2.2.6 Kultivierung von HEK293T-Zellen 51
2.2.2.7 Kryokonservierung von L929- und HEK293T-Zellen 51
2.2.2.8 Calcium-Phosphat Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung der Lenti-Vektoren 52
2.2.2.9 Transduktion von BMMs, HEK293T- und L929-Zellen mit Lenti-Viren 53

2.2.3 Molekularbiologische Methoden 53

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion 53
2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese 55
2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 55
2.2.3.4 Extraktion von DNA aus Gelen 56
2.2.3.5 Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen 56
2.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten 56
2.2.3.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA 57
2.2.3.8 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA 57
2.2.3.9 Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse 58
2.2.3.10 Isolierung reiner Plasmid-DNA 58
2.2.3.11 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren 60
2.2.3.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung 60
2.2.3.13 DNA-Sequenzierung 61
2.2.3.14 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe 61
2.2.3.15 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen 62
2.2.3.16 Semi-quantitative real time PCR (qRT-PCR) 63

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden 64

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 64
2.2.4.2 Färbung des SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie® Brilliant Blau 65
2.2.4.3 Western Blot (semi dry)/ Immunblot 65
2.2.4.4 Nachweis von Proteinen aus Saccharose-gereinigten Exosomen 67
2.2.4.5 P46-Antigen-Aufreinigung aus Bakterien 68
2.2.4.6 IgY-Extraktion aus einem Eidotter 69

2.2.5 Mikroskopische Methoden 70

2.2.5.1 Lichtmikroskopie 70
2.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie 70
2.2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM) 71

2.2.6 Datenverarbeitung 72

2.2.6.1 Bildbearbeitung 72

3. Ergebnisse 73

3.1 P46-Nullmutante, Herstellung und Charakterisierung 73

3.1.1 Herstellung der P46-Nullmutanten 73

3.1.2 Verifizierung der P46-Nullmutanten auf gDNA- und mRNA-Ebene 76

3.1.3 Analyse der Zellmorphologie und der Wachstumskinetik der P46-Nullmutanten 77

3.1.4 Charakterisierung der P46-Nullmutanten in vivo 79

3.2 Die Komplementierung der P46-Deletion 81

3.2.1 Charakterisierung von L.mj P46-/-/+ in vivo und ex vivo 82

3.3 P46 und Exosomen 86

3.4 Lokalisation von P46 in der Wirtszelle 92

3.5 P46-Funktionsanalysen 95

3.6 Transfektion von Knochenmarksmakrophagen 98

3.6.1 Lipofektion 98

3.6.2 Nukleofektion 100

3.6.3 Transduktion durch Lenti-Vektoren 102

3.7 Phylogenie der P46-Sequenzen **104**

4. Diskussion 114

4.1 Epidemiologie 114

4.2 Die Primärstruktur von P46 117

4.3 Auf den Spuren der Virulenz 118

4.4 Export von P46 121

Fazit 122

Ausblick 123

Literaturverzeichnis 124

Abkürzungsverzeichnis

A2	**A**mastigoten-spezifische Genfamilie in *Leishmania donovani*
Abb.	**Abb**ildung
Abk.	**Abk**ürzung
AmpR	**Amp**icillin-**R**esistenzgen
APS	**A**mmonium**p**eroxid**s**ulfat
AS	**A**mino**s**äure
BNI TM	**B**ernhard **N**ocht **I**nstitut für **T**ropische **M**edizin (Hamburg)
Bp, kb	**B**asen**p**aare, kilo Basenpaare (x10^3)
bpV(phen)	Kalium Bisperoxo(1,10-Phenanthrolin)oxovanadat(V_i), ein PTP-Inhibitor
bzw.	**bez**iehungs**w**eise
c	**c**enti (10^2)
©	engl. *copyright* (urheberrechtlich geschütztes Material)
°C	Temperatur in Grad (°) **C**elsius
ca.	lat. ***c**irc**a*** (ungefähr)
Ca	**Ca**lcium (chemisches Element)
cDNA	***c**opy* -**DNA**
CMV	**C**yto**m**egalie**v**irus
Cs	**C**ä**s**ium (chemisches Element)
C-Terminus	**C**arboxyl**terminus** einer Polypeptidkette
d.h.	**d**as **h**eißt
DNA (z. dt. DNS)	**D**esoxyribo**n**uklein**s**äure
DTT	**Dit**hio**t**hreitol
Da	**Da**lton, atomare Masseneinheit
E. coli	***E**scherchia **coli*** (grammnegatives, begeißeltes Bakterium)
ECL	engl. ***e**nhanced **c**hemi**l**uminescence* (verstärkte Chemilumineszenz)

EDTA	**E**thylen**d**iamin**t**etra**a**cetat
e. g.	lat. ***e**xempli **g**ratia* (beispielsweise oder zum Beispiel)
EGFP	engl. ***e**nhanced **g**reen **f**luorescent **p**rotein*
engl.	**Engl**isch, benutzt im Sinne von: vom Englischen oder auf Englisch
et al.	lat. ***et all**i* (und andere)
FCS	engl. ***f**etal **c**alf **s**erum* (fötales Kälberserum)
FITC	**F**luoresceini**s**o**t**hio**c**yanat (Fluoreszenzfarbstoff, Absorption im blauen Licht: 496 nm, Emission in grünem Licht: 520-530 nm)
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
gDNA	genomische DNA
xg	Vielfaches der Gravitation (engl. *g-force*) [g = 9,81 m s^{-2}], entspricht rcf (engl. ***r**elative **c**entrifugal **f**orce*)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
His-tag	ein Proteinanhang bestehend aus 6 Histidinen
H_2O, ddH_2O	Wasser, **d**oppelt **d**estilliertes Wasser
HRP	engl. ***H**orse **r**adish **p**eroxidase*
Hsp	**H**itze**s**chock**p**rotein
IFN-γ	Gamma-**I**nte**f**ero**n**
IL-2/-4/-10/-12	**I**nter**l**eukin 2, 4, 10, 12
iNOS	Makrophagen-spezifische **i**nduzierbare **Stickstoff**mon**o**xid-**S**ynthase
IgG, IgY	**I**mmunglobulin **G** (Säugetier Antikörper), **I**mmunglobulin **Y** (Vogel Antikörper)
IPTG	**I**so**p**ropyl-ß-D-1-thio**g**alaktorpyronosid
k	**k**ilo (10^3)
K	**K**alium (chemisches Element)
kb	**k**ilo **B**asenpaare (10^3 Basenpaare)
kD	**k**ilo **D**alton (1000 Dalton)
L	**L**iter (1000 mL, 10^6 µL)
LACK	engl. ***L**eishmania homologue of receptors for **a**ctivated **C** **k**inase (Leishmania major* spezifisches Antigen)
lat.	**Lat**ein, benutzt im Sinne von: auf Lateinisch

LB	**L**auria-**B**ertani-Medium
LPG	**L**ipo**p**hospho**g**lykan
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
m, cm, mm, μm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer
M, mM, μM	molar [mol L^{-1}], millimolar [mmol L^{-1}], mikromolar [μmol L^{-1}]
mA	**m**illi **A**mper
Min.	**Min**ute
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MWCO	engl. ***m**olecular **w**eight **c**ut **o**ff* Ein Begriff aus der Ultrafiltration. Es definiert die Molekülmasse globulärer Moleküle, welche durch die Membran zu 90% zurückgehalten werden.
n	**n**ano (10^{-9})
Neo	Neomycin (Antibiotikum)
nt	**N**ukleo**t**id(e)
dNTP	**D**esoxy**n**ukleosid**t**ri**p**hosphat
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
Nurseo.	Nurseothricin (Antibiotikum)
OD	**o**ptische **D**ichte, Extinktion bei der im Index in nm angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm.
PAGE	**P**oly**a**crylamid-**G**el**e**lektrophorese
PBS	engl. ***P**hosphat **b**uffered **s**aline* (Phosphatpuffersalzlösung)
PCR	engl. ***p**olymerase **c**hain **r**eaction*
pk	polyklonal (polyklonaler Antikörper)
PMSF	**P**henyl**m**ethyl**s**ulfonyl**f**luorid
PTP	**P**rotein-**T**yrosin-**P**hosphatase
PVDF	**P**oly**v**inylin**dif**lourid (Membran)
qRT-PCR	semi **q**uantitative ***r**eal **t**ime* **PCR**
®	engl. *All rights reserved* (Rechtinhaber behält sämtliche durch das Urheberrecht gewährten Rechte)

rK39	**r**ekombinantes **39** Amnosäuren langes Peptid, kodiert von **K**inesin-ähnlichen Genen in Amastigoten viszeralisierender, aber nicht in kutaner *Leishmania* spp.
RNA	engl. ***Ribonucleic acid*** (Ribonukleinsäure)
RT	**R**aum**t**emperatur
Sek.	**Sek**unde
SDS	engl. ***sodium dodecyl sulfate*** (Natriumdodezylsulfat)
SFFV	***spleen focus-forming virus***
spp.	engl. ***species pluralis*** (mehrere nicht im Einzelnen genannte Spezies einer Gattung)
SV40	**S**imian-**V**irus **40**
Tab.	**Tab**elle
TBS	engl. ***Tris-buffered saline*** (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	N,N,N´,N´-**Te**tra**m**ethyl**e**thylen**d**iamin
TGF-β	engl. ***Transforming growth factor beta***
Th	T-Helfer Zelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxylmethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monoluarat
U	**U**nit ist die Einheit der Enzymaktivität Def.: 1U = 1 μmol min^{-1}
UKE	**U**niversitäts**k**rankenhaus **E**ppendorf, Hamburg
ÜS	**Ü**ber**s**tand
UV	**U**ltra**v**iolett
V	**V**olt
VSV	**V**esikulo**s**tomatit**v**irus
VSV-G	Glykoprotein G des VSV
WT	**W**ild**t**yp
w/v	engl. ***weight/ volume,*** (g Gewicht pro mL Volumen)
z.B.	**z**um **B**eispiel

Die Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz werden durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet.

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin

Drei- und Einbuchstabenkod der kanonischen Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutamat	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Zusammenfassung

Leishmanien sind einzellige Parasiten der Familie Trypanosomatidae und Verursacher eines Spektrums von Erkrankungen, die zusammenfassend als Leishmaniasen bezeichnet werden. In ihrem biphasischen Lebenszyklus zirkulieren sie zwischen Sandmücken, in denen sie als begeißelte, extrazelluläre Promastigoten existieren, und den Vertebraten (vorwiegend Säuger), in denen sie als nicht-motile Amastigoten in phagozytierenden Zellen leben.

Um sich an diese gegensätzlichen Lebensräume anzupassen und die eigene Transmission zu sichern, werden stadienspezifisch Moleküle synthetisiert, mit denen die physiologischen Funktionen und die Abwehrsysteme des jeweiligen Wirtes zugunsten der eigenen Persistenz moduliert werden. Diese Moleküle werden als Virulenzfaktoren bezeichnet. Einer dieser Faktoren ist P46 (Reiling et al., 2010).

Die funktionellen Domänen und die Eigenschaften dieses Virulenzfaktors sollten in dieser Arbeit charakterisiert werden. Dafür wurden vier Ansätze verfolgt: (i) Mutagenese, (ii) Transfektion von Makrophagen, (iii) Sequenz-und Selektionsanalysen, (iv) Erzeugung von P46-Genaustauschmutanten.

Durch Mutagenese konnten sowohl P46-Deletionsmutanten als auch P46-Fusionsproteine synthetisierende Parasiten hergestellt werden. Die funktionelle Region des Proteins konnte durch die Expression veränderter P46-Gene im N-Terminus lokalisiert werden. Auch die Lokalisation des Proteins konnte in infizierten, lebenden *ex vivo* Makrophagen durch die Expression Fluorochrom-markierter P46-Varianten bestimmt werden. Die Transfektion von Makrophagen mit P46-Expressionskonstrukten war nicht erfolgreich.

Sequenzanalysen von P46 aus unterschiedlichen *L. major*-Isolaten ergaben eine P46-Phylogenie, die mit der geographischen Verteilung der Parasiten korrelierte. Eine solche Korrelation konnte weder bei der Phylogenie von L.mj Hsp23 noch von L.mj HIP festgestellt werden, was gegen eine zufällige Gendrift als Ursache für die Sequenzunterschiede spricht. Diese These wurde durch einen vom Wirt abhängigen Selektionsdruck auf eine bestimmte P46-Sequenz *in vivo* untermauert.

Schließlich konnten P46-Genaustauschmutanten erzeugt und für Infektionsstudien eingesetzt werden. Sie zeigten eine im Vergleich mit Wildtyp-Zellen verringerte Virulenz *in vitro* und *in vivo*. Komplementation des P46-Genverlusts durch episomale P46-Genkopien führte zu Wildtyp-ähnlicher Virulenz *in vitro*, jedoch nicht *in vivo*, was auf einen möglicherweise adversen Effekt von P46 Überexpression hindeutet.

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse, dass P46 nicht bestimmend, jedoch notwendig für eine vollständige Ausprägung der Infektiosität des Parasiten ist.

Abstract

Leishmania spp. are sandfly-transmitted parasitic protozoa that are etiologic for a spectrum of diseases, summarily termed Leishmaniases. In the insect gut these parasites exist as elongated promastigotes, which are flagellated and motile. These promastigotes are transmitted to the mammalian host during a sandfly blood meal. Once inoculated, the parasites are rapidly taken up by professional phagocytes such as neutrophils and most notably macrophages. Within acidified vacuoles, *Leishmania* spp. replicate as spherical, non-motile amastigotes for the duration of the host cell‘s life span.

To adapt to the two dramatically different hosts and to maintain their life cycle through transmission, *Leishmania* spp. produce a variety of molecules. These molecules include virulence factors which are produced both stage- and species-specifically. P46 was found to be one such virulence factor (Reiling et al., 2010).

In this thesis, P46 was subjected to characterisation to gain insight into its mode of function. To this end, four approaches were chosen: (i) deletion mutagenesis and fusion protein expression, (ii) expression in murine macrophages, (iii) molecular epidemiology and (iv) reverse genetics of P46.

P46::mCherry chimeras revealed the localisation of the protein in the cytosol of infected *ex vivo* macrophages via live imaging microscopy. The protein region responsible for infectivity enhancement was traced to the N-terminus both by the expression of truncated P46 genes and by mCherry tagged P46 gene expression in *L. major* followed by *ex vivo* infection studies. It was not possible to transfect murine macrophages with P46 expression plasmids.

Molecular epidemiology of P46 showed a geographical distribution of P46 sequence variants. Similar correlations between the geographical origin and protein sequences could not be observed for other *L. major* genes such as L.mj Hsp23 or L.mj HIP. Therefore, the P46 sequence variations between geographic distinct *L. major* isolates are not based on an overall genetic drift but rather seem to correlate with the predominant reservoir animals in endemic regions. Passaging parasites that expressed three distinct P46 sequence vari-

ants *in vivo* revealed a host dependent selection for a particular P46 variant, supporting the notion that P46 is involved in host adaptation.

Finally P46 could be confirmed as a virulence factor based on an attenuated phenotype *in vitro* and *in vivo* after replacement of the P46 gene in *L. major*. Wild type virulence in *ex vivo* infections could be restored by adding a P46 gene copy to the P46-/- mutants (L.mj *P46-/-/+*). However, this did not restore virulence *in vivo*, indicating an adverse effect of the ~40-fold P46 overexpression during mouse passage. In summary P46 seems to be expendable for basal infectivity of the parasite but necessary for a fully developed virulence.

1. Einleitung

Leishmaniose ist eine von Protozoa verursachte Erkrankung, von der Schätzungen zufolge um 350 Millionen Menschen weltweit bedroht sind. Die Krankheit ist in insgesamt 98 Ländern auf fünf Kontinenten endemisch und fordert 20 000 - 40 000 Menschenleben jährlich (Alvar et al., 2012). Die Leishmaniose ist schon in historischen Aufzeichnungen, die bis in die ersten schriftlichen Zeugnisse zurückreichen, unter verschiedenen Namen beschrieben worden. Die Entdeckung und Beschreibung des Krankheitsverursachers sowie seines Infektionszykluses erfolgte erst im frühen 20.Jahrhundert im Zuge von militärischen Einsätzen in den Epidemiegebieten. In Schmierproben von Patienten oder Nagern wurde die neue Gattung *Leishmania* (L.) nachgewiesen (Abb. 1.1, ein Beispiel) und der Infektionszyklus aufgedeckt (Abb. 1.3). Durch anthropogene Aktivitäten (Erschließung neuer Territorien, Waldrodung, Agrarkolonisation, Reisen, Domestizierung, Kriege etc.) breitet sich die Leishmaniose immer noch aus. Die Parasiten passen sich z.T. an neue Reservoirs und Mückenarten an und nutzen diese für ihre Verbreitung.

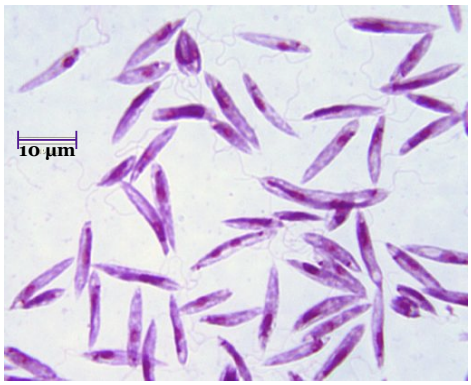


Abb.1.1: Promastigote *Leishmania major*.

L. major Promastigote, gefärbt nach Giemsa, Hellfeld-Mikroskopie 100x. Größenbalken = 10 µm.

1.1 Die Leishmaniasen

Heute kennt man ca. 30 Leishmania-Spezies, die sich morphologisch kaum unterscheiden, aber aufgrund ihres Genotyps, ihres Tropismus und ihrer Präferenz für den jeweiligen Insektenvektor und Säugetierwirt differenzieren lassen. Die humanpathogenen Leishmanien sind entweder aktiv zoonotisch (d.h. der Reservoirwirt ist ein Tier und der Mensch ein Fehlwirt) oder sind adaptiert und werden jetzt aufgrund der Mensch-zu-Mensch Übertragung als Anthroponosen eingestuft (Ashford, 2000).

Der Tropismus der Parasiten ist für unterschiedliche klinische Manifestationen der Leishmaniose verantwortlich. Es wird zwischen drei Leishmaniose-Formen unterschieden:

(i) Die **kutane Leishmaniose** (CL) oder Orientbeule ist die am weitesten verbreitete Form mit bis zu 1,2 Millionen Neuinfektionen jährlich (Alvar et al., 2012). Bei der CL bilden sich auf der Haut an der Einstichstelle Papeln, die sich binnen Wochen oder Monaten zu schmerzfreien Beulen oder Geschwüren vergrößern. Im Zuge der Immunantwort durch Leukozyten kommt es zu einem nekrotischen Zerfall des Geschwürs von zentral nach peripher. Abhängig von der Leishmanien-Art und dem Immunstatus des Patienten kann die Infektion symptomfrei bleiben oder durch die Nekroseprozesse offene, nässende Entzündungen verursachen. Der Durchmesser der Wunde kann ebenfalls sehr stark variieren, von wenigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern (Ashford, 2000; Reithinger et al., 2007). Eine Infektion mit *Leishmania major* (*L. major*) führt lokal zu einer oder mehreren Läsionen (Ashford, 2000).

Bei dieser CL ist eine spontane Heilung ohne pharmakologische Behandlung die Regel, wobei die Dauer der Ausheilung sehr variabel und unter anderem von der Läsionsgröße abhängig ist. Die Läsionen hinterlassen zum Teil entstellende Narben auf der Haut. Geheilte Patienten entwickeln eine langanhaltende Immunität gegen homologe Infektionen. Bei Anergie oder nicht ausreichender Immunantwort kann sich aus einer CL eine chronische, diffus-kutane Leishmaniose (DCL) entwickeln, mit über den ganzen Körper verstreuten Läsionen (Ashford, 2000; Reithinger et al., 2007).

In der alten Welt wird die CL von den zoonotischen *L. major* und *L. aethiopica* oder überwiegend als Anthroponose von *L. tropica* verursacht. In der neuen Welt wird die Krankheit von den zoonotischen Erregern des *L. braziliensis*- und *L. mexicana*-Komplexes verursacht.

(ii) Die **mukokutane Leishmaniose** (MCL, spanisch *Espundia*) ist vorwiegend mit einer *L. braziliensis*-Infektion assoziiert und in Südamerika anzutreffen. Meist ist es eine Folgeerkrankung der CL, bei der sich die Parasiten über die Lymphe oder hämatogen in die Mukosa ausbreiten. MCL fängt mit Entzündungen im Gesicht und in der Nasenschleimhaut an, gefolgt von chronischer Rhinitis, Zerstörung der Schleimhäute sowie Sekundärinfektionen. MCL ist destruktiv, nicht selbstheilend und potenziell tödlich (David and Craft, 2009; Murray et al., 2005).

(iii) Die **viszerale Leishmaniose** (VL) oder Kala-Azar (Hindi für Schwarzes Fieber) ist die schwerste Form der Leishmaniose, bei der innere Organe wie Knochenmark, Lymphkno-

ten, Leber und Milz betroffen sind. Es kommt zunächst zu grippeähnlichen Symptomen gefolgt von Fieberschüben, Anorexie, Gewichtsverlust, Hepato- und Splenomegalie sowie in einigen Fällen zur Schwarzfärbung der Haut (Etymologie). Auf dem indischen Subkontinent, in Nord-Asien sowie in Afrika wird die VL durch *L. donovani* (anthroponotisch) hervorgerufen. *L. infantum* (zoonotisch) verursacht die VL im Mediterranen Raum, in Südwest- und Zentralasien sowie in Südamerika, wo der Erreger oft noch als *L. chagasi* bezeichnet wird. Die Manifestation der Krankheit kann Wochen nach der Infektion oder erst nach Jahren auftreten. Die Entwicklung einer schweren VL oder die Reaktivierung einer erfolgreich behandelten VL wird von immunsupprimierenden Faktoren begünstigt. Ein schwerwiegendes Problem stellt die Koinfektion mit dem HI-Virus dar. Eine voll entwickelte oder unbehandelte VL verläuft zu >95% tödlich (Ashford, 2000; Murray et al., 2005). Jährlich gibt es bis zu 0,4 Millionen neue VL-Fälle, 90% davon sind auf nur sechs Länder verteilt: Indien, Bangladesch, Sudan, Südsudan, Äthiopien, Brasilien (Alvar et al., 2012).

Die klinische Ausprägung der Leishmaniasen ist komplex und von Wirt, Parasit, Vektor und Umwelteinflüssen abhängig. Einschlägige Therapeutika sind daher schwer zu entwickeln. Bis heute sind Therapeutika wie Amphotericin B, Miltefosin, Pentamidin oder Paromomycin mit hoher Toxizität und/ oder hohen Kosten verbunden. Trotz hoher Toxizität gehören auf fünfwertigem Antimon basierende Mittel aufgrund der geringen Kosten zu den Standardtherapien in endemischen Ländern. Diese sind jedoch durch zunehmende Erregerresistenz in Nordindien kontraindiziert (Ashford, 2000; Murray et al., 2005; Reithinger et al., 2007).

Es gibt keine wirksamen Vakzine gegen Leishmaniose.

1.2 Die Morphologie der *Leishmania* spp. und ihr Lebenszyklus

Die einzelligen Parasiten der Gattung *Leishmania* spp. existieren in zwei Formen – Amastigote und Promastigote – (Abb. 1.2), die auf ihren biphasischen Lebenszyklus zurückzuführen sind (Abb. 1.4).

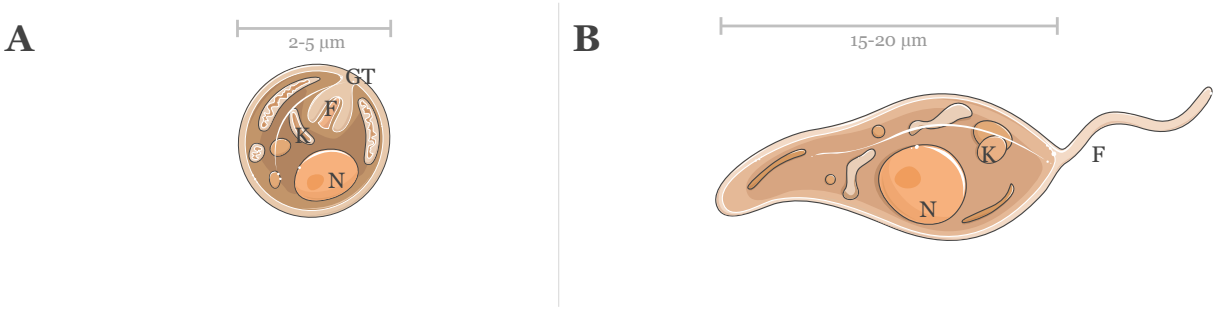


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der *Leishmania* spp. Entwicklungsstadien.

Amastigoten (**A**) sind ovoid bei 2-5 µm Durchmesser. Das Flagellum ist stark verkürzt und liegt in der Geißeltasche (**GT**). Promastigoten (**B**) haben einen länglichen Körper von etwa 15-20 µm und ein Flagellum (**F**) für Motilität oder Adhärenz im Sandmückendarm. Der Nukleus (**N**) und der Kinetoplast (**K**) sind in beiden Formen gekennzeichnet. (Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier- *all rights reserved*).

Die im Phagolysosom der Makrophagen persistierende Form, die Amastigote, ist rundlich, etwa 2-5 *µ*m im Durchmesser mit einer rudimentären Geißel in der Geißeltasche (Abb. 1.2 A). Mit einer Blutmahlzeit aufgenommene Amastigoten konvertieren im Mückendarm zu etwa 15 *µ*m großen, länglichen Promastigoten (Abb. 1.2 B). Die Geißel wird sowohl zum Antrieb als auch zum Anhaften benutzt. Neben dem Zellkern besitzen die Parasiten einen Kinetoplasten, der namensgebend für die Ordnung Kinetoplastida ist. Zudem verfügen sie über ein endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi-Apparat sowie Lysosomen. In beiden Stadien vermehren sich die Parasiten durch longitudinale Zellteilung.

Die Überträger der *Leishmania* spp. sind unscheinbare 2-3 mm große Sandmücken der Unterfamilie *Phlebotominae* (Abb.1.4). Mit einem einzigen Stich werden 100-1000 Parasiten während der Blutmahlzeit auf diverse Säugetiere, den Menschen eingeschlossen, übertragen (Rogers et al., 2004; Rohousová and Volf, 2006; Sacks, 2001).

Die Promastigoten werden zunächst von neutrophilen Granulozyten phagozytiert und gelangen anschließend in den Makrophagen (Peters et al., 2008). Die phagozytierten, promastigoten Parasiten wandeln sich in der parasitophoren Vakuole (PV) innerhalb des Makrophagen in Amastigoten um. Form und Größe der PV variieren in Abhängigkeit von der *Leishmania*-Art. Bei *L. major* und *L. donovani* nimmt jede Zelle eine eigene PV ein, während die Parasiten *L .mexicana* und *L. amazonensis* in einer großen PV akkumulieren (Kima, 2007). Die Vermehrung der Amastigoten führt zur Zerstörung der Wirtszelle, wodurch die Amastigoten freigesetzt werden. Weitere Makrophagen können infiziert werden und anschließend aus dem Blut (Awasthi et al., 2004) mit einer Blutmahlzeit in den Darm

eines geeigneten Vektors gelangen. Durch die immunsupprimierenden Speichelkomponenten der Mücke bleiben die Amastigoten im Makrophagen unversehrt. Die im Darm freigesetzten Amastigoten konvertieren innerhalb von 2-3 Tagen zu prozyklischen Promastigoten. Diese haften sich mit Hilfe ihres Oberflächenmoleküls Lipophosphoglykan (LPG) an die Mikrovilli des Darmepithels an, um die Defäkation zu überdauern (Dostalova and Volf, 2012; Sacks, 2001). Es folgt die Vermehrung der Parasiten und die Transformation in die hochinfektiöse metazyklische Form, die sich durch ein langes Flagellum und einen kürzeren Zellkörper auszeichnet. Aufgrund ihrer veränderten LPG-Struktur haften die metazyklischen Promastigoten nicht länger am Darmepithel, sondern wandern, angetrieben von ihrer Geißel, in den Vorderdarm der Sandmücke, von wo aus sie bei der nächsten Blutmahlzeit in einen Säugetierwirt gelangen (Dostalova and Volf, 2012; Sacks, 2001).

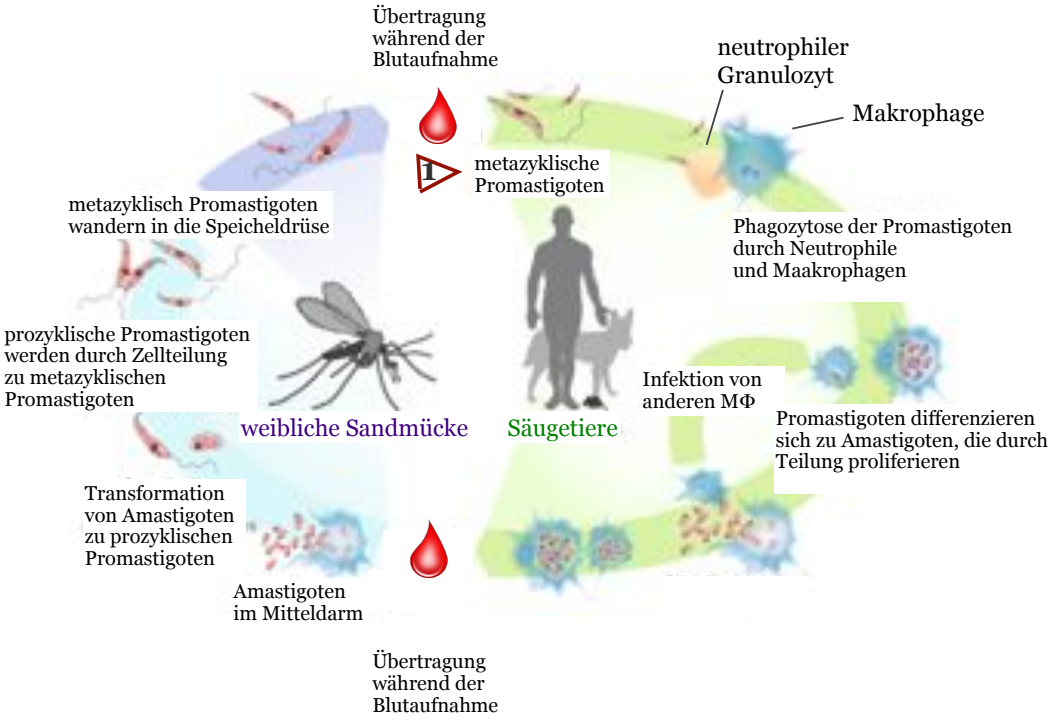


Abb. 1.3: Biphasischer Lebenszyklus von *Leishmania* spp.

Metazyklische Promastigoten gelangen während einer Blutmahlzeit in die Haut des Wirtes und werden dort von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen phagozytiert. Im Phagosom der Makrophagen (MΦ) wandeln sich die Promastigoten in Amastigoten um, die sich durch Teilung bis zur Lyse der Wirtszelle vermehren. Die freigesetzten Amastigoten werden von neuen Makrophagen aufgenommen. Bei einer erneuten Blutmahlzeit gelangen die Amastigoten in den Darm der Sandmücke und wandeln sich dort erneut in Promastigoten um, die am Darmepithel haften und sich durch Längsteilung vermehren. Die prozyklischen Promastigoten lösen sich während ihrer Metazyklogenese vom Darmepithel und wandern gen Speicheldrüse. Von dort beginnt der Zyklus von vorn. (modifiziert nach: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)

1.3 Epidemiologie

Trotz der Abhängigkeit des Parasiten von einem Vektor und einem Reservoirwirt ist seine Anpassungsfähigkeit und daher Verbreitung sehr hoch.

Die meisten Leishmaniasen sind Zoonosen wilder und domestizierter Tiere (Ashford, 2000; Desjeux, 1992). Während die *L. infantum*-VL vor allem Kanine betrifft, kann kutane Leishmaniose bei vielen Arten auftreten: Nagetiere, Beuteltiere, Dachse, Faultiere, Primaten und andere Säugetiere (Desjeux, 1992). Bei Anthroponosen können die Mücken Leishmanien direkt von Mensch zu Mensch übertragen (Desjeux, 1992; Murray et al., 2005). Die Verbreitung aller *Leishmania* spp. ist an die geographische Verteilung des jeweiligen Vektors sowie Reservoirwirtes geknüpft (Ashford, 2000). Als Vektor dienen Sandmücken der Gattungen *Lutzomyia* und *Phlebotomus* (Abb. 1.4). Die diversen Arten, von denen nur etwa 20 Leishmaniose übertragen, sind in den Tropen und Subtropen Asiens, Amerikas und Afrikas und in Europa im Mittelmeerraum heimisch. *Phlebotomus* spp. bevölkern die alte Welt (Europa, Asien, Afrika), während *Lutzomyia* spp. in der neuen Welt (Amerika) zu finden sind (Ashford, 2000; Desjeux, 1992; Murray et al., 2005; Sacks, 2001). Nur die weibliche Sandmücke saugt Blut für die Eiablage. Im Gegensatz zu vielen anderen Moskitos werden für die Eiablage keine Gewässer aufgesucht, sondern schattige und feuchte Orte genutzt. Die Sandmücken können weder weit noch hoch fliegen und bleiben dadurch nah am Wirt, d.h. in den Höhlen von Nagetieren, in Wäldern, in Ställen oder Häusern. In armen Ländern sind viele Menschen, die in Notbehausungen leben oder sich mit ihren Tieren Behausungen teilen den Sandmücken ausgesetzt. Daher ist Leishmaniose in vielen Fällen eine mit Armut assoziierte Krankheit, und sichtbare Krankheitssymptome sind oft von sozialer Ausgrenzung begleitet.

Durch die Interaktionen zwischen Vektor und Parasit besteht eine Vektor-Spezifität, die je nach *Leishmania* Art 1-6 Sandmücken-Arten umfassen kann (Sacks, 2001).

Sowohl die Verbreitung der *Leishmania* spp. als auch das Auftreten von Anthroponosen wird durch menschliches Verhalten stark beeinflusst. Militärpersonal, Reisende oder Flüchtlinge in Endemiegebieten können die Infektion in neue Länder transportieren, wenn dort ein passender Vektor vorhanden ist (Ashford, 2000; Murray et al., 2005; Pavli and Maltezou, 2010; Shaw, 2007). Eine Verbreitung der Leishmanien ist ebenfalls durch infizierte domestizierte Tiere wie z.B. den Hund möglich. *L. infantum* wurde vermutlich durch

Abb. 1.4: Weibliche *Phlebotomus papatasi*.

Eine weibliche *P. papatasi* bei einer Blutaufnahme auf einem menschlichen Arm. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phlebotomus_pappatasi_bloodmeal_begin.jpg

Hunde aus Südeuropa nach Amerika (hier *L. chagasi* genannt) und Asien verschleppt und fand in *Lutzomyia* spp. geeignete Überträger (Ashford, 2000; Shaw, 2007). Es besteht die Gefahr einer *L. infantum*-Verschleppung durch Hunde nach Mitteleuropa, da sich durch den Klimawandel auch die Sandmücke nordwärts ausbreitet (Antinori et al., 2012).

Es gibt weiterhin Hinweise, dass *L. donovani*, das heute als rein anthroponotischer Erreger betrachtet wird, ursprünglich aus dem Sudan stammt und vermutlich durch den Sklavenhandel auf den indischen Subkontinent verschleppt wurde, wo er sich im geeigneten Vektor *P. argentipes* als anthroponotischer Erreger durchsetzte (Ashford, 2000). Die Übertragung von VL ist direkt durch Blut möglich. Die Verbreitung des HI-Virus förderte seit den 1980ern den Anstieg von VL-Fällen durch HIV/ VL-Koinfektionen – meist bei Drogensüchtigen – in Südeuropa. Beide Krankheiten wirken synergetisch. Die Koinfektion erfolgte z. T. durch die Benutzung kontaminierter Nadeln (Antinori et al., 2012; Ashford, 2000; Murray et al., 2005). In Südeuropa sind die Koinfektionen durch den besseren Lebensstandard sowie antiretrovirale Therapien weitestgehend eingedämmt. Weltweit aber sind Koinfektionen von HIV und Leishmaniose ein großes Problem (Antinori et al., 2012; Murray et al., 2005).

Rodung und Besiedlung von Land in ehemaligen Waldregionen verändern die Populationsdynamik in diesen Gebieten, sodass sich Sandmücken neue Blutquellen erschließen müssen. Ein Beispiel ist die Domestizierung von *L. peruviana* in den peruanischen Anden. Ehemals ein Erreger mit sylvatisch-zoonotischer Verbreitung, vermehrt sich *L. peruviana* nun ausschließlich im peri-domestischen Bereich, da der natürliche Wirt in Folge der Desertifikation verschwunden ist (Ashford, 2000). In der neuen Welt sind die *Leishmania* spp. meist in Waldgebieten anzutreffen. *L. braziliensis* scheint sich allerdings auf urbane Gebiete auszubreiten, wo Hunde, Pferde und Esel als Reservoirwirte dienen (Ashford, 2000; Cupolillo et al., 2003; Murray et al., 2005). Faiman *et al.* (2013) zeigten, dass sich auch das meist auf wüstenähnliche Landschaften beschränkte Verbreitungsgebiet von *L. major*

nun auf urbane Gebiete ausweitet. Da der *L. major* Vektor *P. papatasi* anthrophil und endophil ist, gibt es häufig humane CL-Fälle (Faiman et al., 2013).

Obwohl *Leishmania* spp. morphologisch kaum zu unterscheiden sind, ist ihr Taxon sehr komplex. Die Entdeckung eines Genaustauschs zwischen transgenen Leishmanien durch Akopyants *et al*. (2009) liefert eine Erklärung für diesen polymorphen Genus (Akopyants et al., 2009). Rekombination zwischen zwei Organismen gepaart mit einer kurzen Generationszeit ermöglicht eine schnelle Adaption an neue ökologische Nischen.

1.4 Wirt-Parasitenwechselwirkungen

Wie fast alle höheren Lebewesen bedienen sich Säugetiere zur Abwehr körperfremder Moleküle, Molekülverbände und Organismen, aber auch zur Beseitigung körpereigener apoptotischer, nekrotischer oder infizierter Zellen eines umfangreichen Arsenals, das sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem einteilen lässt.

Zum Repertoire des angeborenen Immunsystem gehören kleine antimikrobielle Peptide (AMP). Sie sind vor allem innerhalb epithelialer Barrieren lokalisiert, werden aber auch von Makrophagen, Neutrophilen und Epithelzellen sezerniert. Temporine sind die kürzesten Peptide mit höchster antileishmanialer Wirkung. Sie induzieren den Zusammenbruch des Membranpotenzials, reduzieren den intrazellulären ATP-Gehalt und schädigen die Parasitenmembran (Mangoni et al., 2005). Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sind die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie exprimieren zahlreiche Rezeptoren, die sich evolutionsgeschichtlich früh etabliert haben und bis heute in ihrer Funktion und Spezifität beibehalten wurden. Dazu gehören Rezeptoren für das Komplementsystem. Das Komplement ist ein wichtiges System bestehend aus Plasmaproteinen und -zymogenen, die durch Haftung an Mikroorganismen proteolytisch aktiviert werden. Die Faktoren des Komplements opsonieren Mikroorganismen und führen sie so der Phagozytose durch die Immunzellen zu. Sie wirken chemotaktisch für andere Immunzellen, lösen Entzündungsreaktionen aus und können Bakterien durch das Einfügen von Poren in ihre Zellmembran direkt zerstören.

Eine andere Molekül-Klasse umfasst die *pattern-recognition* Rezeptoren (PRRs), zu denen die *toll-like* Rezeptoren (TLR) gehören. Sie sind gegen charakteristische Moleküle von Pa-

thogenen gerichtet, die unter dem Begriff *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst sind.

Antikörper werden an ihrem kristallisierbaren Fragment (Fc) durch den Fc-Rezeptor der Makrophagen erkannt und gebunden. Die einzelnen Fc-Rezeptoren sind spezifisch für eine Immunglobulin-Isoform. Die Zellen des Immunsystems werden durch ihre Rezeptoren und Zytokine aktiviert und reguliert.

Neutrophile sind die am häufigsten vorkommenden, zirkulierenden weißen Blutkörperchen. Bei einer Infektion verlassen sie chemotaxisabhängig die Blutbahn und infiltrieren das betroffene Gewebe, wo sie Mikroorganismen phagozytieren und im Phagolysosom hydrolytisch verdauen. Neutrophile sind die ersten Immunzellen, die bei einer Leishmanien-Infektion aus dem Blut rekrutiert werden und Leishmanien phagozytieren (Peters et al., 2008). Die *ex vivo* Infektion von Neutrophilen mit *L. donovani* zeigte, dass die Parasiten LPG-abhängig die Fusion von Phagosom mit Lysosom verhindern und so intrazellulär überleben (Gueirard et al., 2008). In Neutrophilen findet weder eine Vermehrung der promastigoten Parasiten noch ihre Umwandlung in Amastigoten statt. Die 6-10 Stunden lange Lebensspanne der Neutrophilen wird auf bis zu 42 Stunden verlängert (Aga et al., 2002); zusätzlich wird die Produktion des Makrophagen-Chemokins MIP-1β ausgelöst (van Zandbergen et al., 2004). Nach 1-2 Tagen gelangen Monozyten an den Infektionsort und phagozytieren sowohl freie Parasiten als auch apoptotische Neutrophile. Die infizierten, apoptotischen Neutrophilen werden als „Trojanische Pferde“ für den stillen Eintritt der Parasiten in den Makrophagen genutzt (Laskay et al., 2003), begleitet von der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF-β (engl. *transforming growth factor*) (van Zandbergen et al., 2004). TGF-β wirkt anti-inflammatorisch auf Th1-Zellen und steht vor allem im Zusammenhang mit der Wundheilung. Durch physiologische Funktionen im Körper werden täglich apoptotische Zellen durch Makrophagen beseitigt. Die Aufnahme von apoptotischen Zellen erfolgt daher ohne Aktivierung des Immunsystems. Dies machen sich die Parasiten zunutze, indem die infektiösen, metazyklischen Parasiten-Populationen etwa zur Hälfte aus apoptotischen Zellen bestehen und ebenfalls Inflammationsprozesse unterdrücken (van Zandbergen et al., 2006).

Makrophagen entstehen aus Monozyten, die bis zu drei Tagen im peripheren Blut zirkulieren, bei einer Infektion ins Gewebe eindringen, dort proliferieren und sich zu Makrophagen

differenzieren. Es gibt gewebespezifische Makrophagen wie z.B. die Kupffer'schen Zellen in der Leber oder alveolare Makrophagen in der Lunge. Ferner sind Makrophagen in lymphoiden Organen und im Bindegewebe lokalisiert. Über ihre Rezeptoren binden sie Mikroorganismen oder apoptotische Zellen und phagozytieren diese. Die aufgenommenen Organismen werden im Phagolysosom des Makrophagen einer Reihe toxischer Faktoren ausgesetzt: lysosomalen Enzymen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), antimikrobiellen Peptiden (AMP) und Stickstoffmonoxid (NO). Die aus dem Abbau des Organismus erhaltenen Peptide werden auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) geladen und den Lymphozyten als Antigene präsentiert. Das Zytokin IFN-γ hat eine stark aktivierende Wirkung auf die antimikrobiellen Abwehrmechanismen der Makrophagen. Als Antwort werden intrazelluläre Signalkaskaden moduliert und Zytokine (z.B. TNF-α, IL-1, IL-12) und Chemokine für die Rekrutierung weiterer Immunzellen sezerniert.

Makrophagen sind die Zielzellen von Leishmanien. Promastigoten wandeln sich nach rezeptorvermittelter Phagozytose intrazellulär in die azidophilen Amastigoten um, die sich in modifizierten Phagolysosomen, den parasitophoren Vakuolen (PV) bei einem pH-Wert von 4,7-5,2 replizieren (Antoine et al., 1990). Die Amastigoten haben eine lange Generationszeit von ungefähr 24 Stunden. Trotz der stetigen Proliferation der Amastigoten wird die funktionelle und strukturelle Integrität des Makrophagen gewahrt und seine Lebensdauer verlängert (Chang et al., 2003; Moore and Matlashewski, 1994). Im infizierten Gewebe oder in Läsionen von infizierten Wirten sind stark von Parasiten belastete Makrophagen zu finden, aber kaum extrazelluläre Amastigoten (Chang et al., 2003). Die intrazellulären Parasiten bewirken eine Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF-β und eine Anergie gegen inflammatorische Zytokine wie IFN-γ, TNF-α und IL-12, wodurch die Produktion des gegen Leishmanien wirksamen NOs ausbleibt.

Das adaptive Immunsystem basiert auf der Aktivität von T- und B-Lymphozyten. Die Immunantwort wird durch körperfremde Moleküle oder Molekülaggregate, die als Antigene bezeichnet werden, initiiert. Antigene werden auf MHC-Molekülen der Klasse I oder Klasse II präsentiert. MHC-I-Proteine finden sich auf allen kernhaltigen Zellen. Auf ihnen wird das Peptid-Repertoire aller intrazellulär synthetisierten Proteine präsentiert. So werden z.B. von Viren befallene oder transformierte Zellen erkannt und entfernt. MHC-II-Proteine werden auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) exprimiert, den anti-

genpräsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen presenting cells*). Diese Zellen endozytieren an entsprechende Rezeptoren gebundene Antigene, die anschließend im Lysosom zu Peptiden fragmentiert werden. Die Peptide werden an MHC-II-Proteine gebunden und als Komplexe vesikulär in die Plasmamembran transloziert. T-Zellen exprimieren hoch variable und damit spezifische T-Zellrezeptoren, mit denen sie an Antigene binden, die ihnen auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Eine adäquate Bindung kann nur in Zusammenspiel mit Co-Rezeptoren erfolgen, anhand derer sich T-Zell-Subtypen unterscheiden lassen. Der Co-Rezeptor CD8 (CD, engl. *cluster of differentiation*) wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert, die an MHC-I-Proteine binden. Im Falle einer Aktivierung durch ein Fremd-Antigen werden Perforine und Peptidasen produziert, durch die betroffene Zellen zerstört werden. T-Helferzellen tragen den Co-Rezeptor CD4 und treten mit APCs in Kontakt. Nach ihrer Aktivierung kommt es zur Zellproliferation und abhängig vom Zytokinprofil der APCs entstehen durch IL-12 und IFN-γ pro-inflammatorische Th1-Zellen oder durch IL-4 B-Zell-aktivierende Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren IL-2, IFN-γ und TNF-α, die antimikrobielle Mechanismen der Makrophagen aktivieren. Th2-Zellen sezernieren ihrerseits IL-4 sowie IL-5,-10 und -13, die für die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen notwendig sind.

Eine gegen Leishmanien gerichtete, adaptive Immunantwort basiert auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit einem Zytokinprofil von Th1-Zellen (Bogdan et al., 1993). In den späten 90ern fand man heraus, dass die Th1/Th2-Balance für die Resistenz oder die Suszeptibilität der Labormaus-Stämme C57BL/6 und BALB/c gegen eine Infektion mit *L. major* verantwortlich ist (Heinzel et al., 1989; Lohoff et al., 1998; Scott et al., 1988). Während in der C57BL/6-Maus bei einer *L. major*-Infektion die IFN-γ und TNF-α abhängige, schützende Th1-Antwort aktiviert wird, reagiert die BALB/c-Maus mit der IL-4, -10 und TGF-β abgeleiteten Th2-Antwort, wodurch die Infektion nicht überwunden werden kann. Der genetische Hintergrund des Wirtes ist demnach genauso entscheidend für einen Infektionsverlauf wie der des Parasiten (Bogdan and Rollinghoff, 1998; Sacks and Noben-Trauth, 2002).

1.5 Molekulares Arsenal der *Leishmania* spp.

Endoparasiten leben innerhalb und auf Kosten eines größeren Organismus. Im Verlauf der Evolution passen sie sich für eine erfolgreiche Reproduktion an den Wirt bzw. die Wirte an,

welche wiederum ihr Immunsystem fortentwickeln. Diese Koevolution basiert bei Endoparasiten vor allem auf Interaktionen zwischen Wirt und Parasit auf molekularer Ebene. Der Parasit produziert Virulenzfaktoren, die ihn vor den Abwehrmechanismen des Wirtes schützen, sein Überleben im Wirt und Vektor und seine Transmission sichern, ihn also virulent für die am Lebenszyklus beteiligten Wirte machen.

Leishmanien müssen sich, bedingt durch ihren biphasischen Lebenszyklus, an zwei völlig unterschiedliche Wirte anpassen – Sandmücken und Säugetiere. Die extrazellulär im Mückendarm persistierenden Promastigoten leben bei einer Umgebungstemperatur von ca. 25°C und einem alkalischen pH-Wert und müssen Proteasewirkung und Defäkation überstehen. Im Säugetierwirt steigt die Umgebungstemperatur auf bis zu 40°C, und die intrazellulär persistierenden Amastigoten müssen Proteasen widerstehen und einen sauren pH-Wert tolerieren. Um sich in beiden Wirten durchzusetzen, brauchen Leishmanien induzierbare Faktoren, welche zum Teil stadienspezifisch exprimiert werden: die Virulenzfaktoren. Eine Anzahl solcher Faktoren wurde bereits beschrieben.

1.5.1 Glykokonjugate

Die Sandmücke nimmt bei einer Blutmahlzeit auf einem infizierten Wirt die amastigoten Leishmanien auf. Diese transformieren sich zu prozyklischen Promastigoten (ovaler Zellkörper, kurzes Flagellum), proliferieren und synthetisieren Glykokonjugate wie Phosphoglykane (PG), Proteophosphoglykane (PPG), Lipophosphoglykane (LPG). Mit diesen über den GPI-Anker an der Zelloberfläche haftenden oder sezernierten Molekülen schützt sich der Parasit vor den Proteasen, die beim Verdauen der Blutmahlzeit in der peritrophen Matrix (PM) der Mücke aktiviert werden (Dostalova and Volf, 2012; Sacks, 2001). *L. major* sezerniert zusätzlich Protease-Inhibitoren (Dostalova and Volf, 2012). Mit dem LPG, dessen Struktur Spezies-spezifisch ist, haften die Parasiten sich an die Mikrovilli des Darmepithels an, um der Defäkation zu entgehen. LPG1-defiziente (*lpg1*$^{-}$) *L. major* Promastigoten waren zwar nicht von der Proteolyse in der PM der Mücke betroffen, konnten der Defäkation jedoch nicht entkommen (Sacks et al., 2000).

LPG1 kodiert für eine putative Galactofurnosyltransferase, die für die Synthese des LPG-Glykankerns benötigt wird. Die Deletion des LPG1 beeinflusst ausschließlich LPG-Moleküle und keine anderen Glykokonjugate der Leishmanien (Turco et al., 2001). *LPG2* kodiert

für den GDP-Mannose-Transporter im Golgi-Apparat des Parasiten (Beverley and Turco, 1998). Durch Deletion dieses Gens können keine Phosphoglykane mehr synthetisiert werden (Ilg et al., 2001).

Während der Metazyklogenese der Parasiten verändert sich die LPG-Struktur, was zur Ablösung der metazyklischen Promastigoten vom Darmepithel führt (Dostalova and Volf, 2012; Sacks, 2001). Diese nun hoch motilen Leishmanien sammeln sich an der Stomodäum Valve, die den Rückfluss des Magensaftes in den Vorderdarm verhindert. Dieses Hindernis wird durch den Einsatz von parasiteneigenen Chitinasen überwunden, sodass sich die infektiösen, metazyklischen Promastigoten im Vorderdarm und der Speicheldrüse der Mücke sammeln (Dostalova and Volf, 2012), wo sie sich mit filamentösen Proteophosphoglykanen (fPPGs) umgeben (Rogers et al., 2004; Rohousová and Volf, 2006). Rogers *et al*. (2004) zeigten, dass fPPGs nicht nur den Hauptbestandteil des Promastigoten-Sekretionsgels (PSG) ausmachen, sondern auch für die Infektionsverstärkende Wirkung des Mücken-Inokulums verantwortlich sind. *L. mexicana* Mutanten, die keinerlei Phosphoglykane synthetisieren konnten (*lpg2*$^{-}$), waren nicht in der Lage das PSG zu synthetisieren oder im Darm der Sandmücke zu überleben (Rogers et al., 2004). Subkutan hat PSG eine chemotaktische und modulierende Wirkung auf Makrophagen (Rogers et al., 2009).

LPGs vermitteln auch die Adhärenz der Leishmanien an Immunzellen (Kelleher et al., 1992), wodurch eine rezeptorvermittelte Phagozytose der Parasiten erfolgt (Puentes et al., 1988). In der Zelle greift LPG in die Signaltransduktionskaskaden des Wirtes ein, um das Einnisten des Parasiten zu ermöglichen. So wird die NO-Produktion im Makrophagen durch modulierte Expression der iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxyd-Synthase) gehemmt (Proudfoot et al., 1996). Der Haupteffekt von LPG liegt vermutlich auf der Hemmung der Proteinkinase C (PKC) in der Wirtszelle durch Calcium-Chelatierung. Die Calcium-abhängige PKC ist in die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose involviert und indirekt an der Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (Olivier et al., 1992a; Olivier et al., 1992b) und der Phagolysosom-Biogenese (Holm et al., 2003) beteiligt.

Die LPG-vermittelte Hemmung der Phagosom-Lysosom Fusion (Desjardins and Descoteaux, 1997) ist wichtig in den ersten Etappen der phagozytierten Promastigoten bis zur Umwandlung in Amastigoten, da der Verlust des LPG1-Gens bei *L. major* Promastigoten, nicht aber bei Amastigoten, zu einer Beseitigung der Parasiten in *ex vivo* Makrophagen

führt (Spath et al., 2000). Amastigoten exprimieren sowohl weniger LPGs und PPGs als auch in einer anderen Zusammensetzung als Promastigoten (Beverley and Turco, 1998; Wang et al., 2012). Die Phagozytose der *lpg1*$^{-}$ Mutanten ist nicht beeinträchtigt. Daher wurde im Mausmodell eine Läsionsbildung ausgelöst, die im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Parasiten verzögert auftrat. Alle Dysfunktionen konnten durch die Expression von LPG1-Genkopien revidiert und die LPG1-Deletion als Ursache bestätigt werden (Spath et al., 2000).

Im Gegensatz zum *L. major*-Modell zeigen *L. mexicana lpg1*$^{-}$ Mutanten keine Virulenz-Einbußen. Auch der Verlust des LPG2-Gens, der zum kompletten Verlust der PG-Synthese führt, hatte keine Auswirkungen auf die Virulenz von *L. mexicana* in *ex vivo* Makrophagen bzw. im Mausmodell (Ilg et al., 2001). Im Gegensatz zu *L. major lpg2*$^{-}$, die weder im Sandmückendarm noch in *ex vivo* oder *in vivo* Infektionsstudien überlebten (G.F. Späth *et al.*, nicht veröffentlicht), sind *L. mexicana lpg2*$^{-}$ nur im Mückendarm nicht überlebensfähig, da sie kein PSG synthetisieren können und vermutlich verstärkt der Proteolyse in der PM ausgesetzt sind (Rogers et al., 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer *L. mexicana* Infektion LPG im Wirt nicht als Virulenzfaktor involviert ist, aber, wie für die anderen *Leishmania* spp., entscheidend zum Überleben in der Sandmücke ist.

LPGs zeigen somit eine hohe Diversität nicht nur in ihrer Zusammensetzung, sondern auch in ihrer Wirkung in den unterschiedlichen Infektionsstadien von *Leishmania* spp..

1.5.2 Leishmanolysin (GP63)

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist GP63. Dieses Protein wurde schon 1986 als das Hauptprotein auf der Oberfläche von *Leishmnia* spp. entdeckt (Russell and Wilhelm, 1986). Das glykosylierte Protein wurde als Zink-Metalloprotease spezifiziert und als Leishmanolysin benannt (Isnard et al., 2012). Das Enzym hat eine breite Substrat- und pH-Spezifität und damit ein weites Funktionsspektrum. *GP63* ist ein *multi-copy* Gen und liegt Spezies-spezifisch in unterschiedlicher Anzahl an Genkopien vor, die sich anhand ihrer Stadien-spezifischen Expression und Sequenz unterscheiden lassen (Yao C, 2003). Durch die zahlreichen Genkopien stehen der Zelle viele GP63-Proteine zur Verfügung, die durch ihre Sequenzvarianz und variable Glykosylierung unterschiedliche biologische Funktionen ausüben können. Es gibt drei Gruppen an GP63-Proteinen: die GPI-verankerten

Hauptoberflächenproteine, die sezernierten Proteine und die zytosolischen Proteine (Yao et al., 2007).

Joshi *et al*. (2002) zeigten anhand GP63-defizienter *L. major* Parasiten, dass GP63 im Insektenstadium nicht benötigt wird, da sowohl metazyklische Wildtyp-Parasiten als auch metazyklische *GP63-/-* Mutanten zu gleichen Teilen aus dem Mückendarm präpariert werden konnten. Jecna *et al*. (2013) zeigten jedoch das Gegenteil für die Interaktion zwischen *L. mexicana* und seinem Vektor *Lutzomyia longipalpis,* was wieder die unterschiedliche Interaktions-Spezifität zwischen Parasit und Vektor bestätigt.

Im subkutanen Gewebe des Wirtes ist GP63 für die Invasion des Parasiten in die Wirtszellen wichtig. Zum einen kann GP63 Fibronektin und Kollagen IV spalten, wodurch die Migration des Parasiten in der extrazellulären Matrix des Wirtes erleichtert werden könnte (McGwire et al., 2003), zum anderen spaltet es antimikrobielle Peptide (AMPs) wie Defensin und verhindert die AMP-vermittelte Apoptose des Parasiten (Kulkarni et al., 2006).

Die antimikrobielle Wirkung des Komplementsystem wird durch die Spaltung der aktiven C3b-Komponente zur inaktiven iC3b-Komponente verhindert. Dies wurde durch den Einsatz von GP63-Nullmutanten untersucht, die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen 10-fach sensitiver für die Lyse durch das Komplementsystem waren (Joshi et al., 2002). Die Expression von inaktiven GP63-Formen führte ebenfalls zur vermehrten Lyse der Parasiten, vermittelt durch das Komplementsystem (Brittingham et al., 1995).

Die inaktiven iC3b-Komponenten sind an GP63 gebunden und opsonieren so den Parasiten. Die opsonierten Parasiten binden anschließend an die Komplement-Rezeptoren CR1 und CR3 (auch Mac-1 oder CD11b/CD18) der Makrophagen, was Phagozytose auslöst (Brittingham et al., 1995). GP63 kann auch direkt mit Makrophagen-Rezeptoren interagieren, was Russell und Wilhelm (1986) durch den Einsatz von anti-GP63 F(ab) Fragmenten zeigen konnten. Die GP63-Abschirmung durch den Antikörper verminderte die Bindung der *L. mexicana* Parasiten an Makrophagen um 30%-35%. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die Phagozytose von Leishmanien nicht ausschließlich GP63-abhängig ist.

Für eine effiziente Infektion modulieren Leishmanien das angeborene Immunsystem des Wirtes. Intrazelluläre Signalkaskaden, die zu antimikrobiellen Funktionen wie der Produktion von IL-12, TNF-α und NO, der Antigenpräsentation durch MHC II sowie der Fusion von Phagosom und Lysosom führen, werden gehemmt oder moduliert. In eukaryotischen Or-

ganismen werden Signalkaskaden meist über Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung kontrolliert. In diesem Zusammenhang wurde GP63 als Aktivator für Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) identifiziert (Gomez and Olivier, 2010; Isnard et al., 2012; Kaye and Scott, 2011). Die Aktivierung der PTPs beeinflusst die MAP-Kinase-Kaskaden sowie den JAK/STAT Signalweg, was zu einer Hemmung von Abwehrmechanismen des Makrophagen führt (Isnard et al., 2012). Die Bedeutung von PTPs für die Leishmanien-Infektion konnten Olivier *et al*. (1998) durch ihre Experimente verdeutlichen. Die Behandlung von Leishmanien-infizierten murinen Makrophagenzellinien (J774) mit einem PTP-Inhibitor führte zur NO-basierenden Beseitigung von intrazellulären Parasiten. Auch die Behandlung von BALB/c und C57BL/6 Mäusen vor und während einer Infektion mit *L. major* oder *L. donovani* mit dem PTP-Inhibitor führte zu einer dramatischen Milderung sowohl der kutanen als auch viszeralen Leishmaniose (Olivier et al., 1998).

Wie LPG hemmt auch GP63 die Signaltransduktion der PKC, allerdings durch die Spaltung der Kinase-Substrate MARCKS (engl. *meristoylated alanin-rich C kinase substrate*) und MRP (engl. MARCKS *related protein*) (Corradin et al., 1999).

In *L. major*-infizierten Fibroblasten nimmt GP63 Einfluss auf die Aktin-Organisation durch die Spaltung der PTP-PEST (Halle et al., 2009). Die selbe Gruppe zeigte eine GP63-abhängige Spaltung der Caspase-3 (in Apoptose involviert) sowie des Adapter Proteins TAB1 (engl. *transforming growth factor-β kinase 1*) der MAP-Kinase p38, wodurch diese inaktiviert wurde. Passend dazu zeigten Mathur *et al*. (2004), dass *L. major* die reziprok wirkenden Signalwege des CD40 Rezeptors in Makrophagen von einer p38-abhängigen IL-12 Produktion zugunsten einer ERK1/2-abhängigen IL-10 Produktion verschieben kann (Mathur et al., 2004). Auch die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie NFκB, AP-1, STAT1 in der Wirtszelle wird durch die GP63-Aktivität massiv beeinträchtigt, wodurch sowohl die Zytokinproduktion als auch die Aktivität der iNOS beeinflusst werden (Isnard et al., 2012; Kaye and Scott, 2011).

Wie genau GP63 vor dem Parasit in die Wirtszelle gelangt, ist nicht geklärt. Zwei Möglichkeiten werden zurzeit diskutiert: die Aufnahme über die Interaktion des GP63 GPI-Ankers mit den *lipid rafts* der Wirtszelle oder eine Fusion von GP63-beladenen Exosomen mit der Wirtszelle, wodurch das Enzym ins Zytosol entlassen wird (Isnard et al., 2012; Kaye and Scott, 2011).

GP63 schützt die Amastigote vor proteolytischem Abbau im Phagolysosom des Makrophagen, was durch die Hemmung des Enzyms gezeigt wurde (Chaudhuri et al., 1989; Seay et al., 1996). Zudem blockiert GP63 die Phagolysosom-Biogenese und hemmt die Antigen-Präsentation des Makrophagen durch die Spaltung von SNARE-Proteinen wie VAMP8 (engl. *vesicle-associated membrane protein* 8) (Matheoud et al., 2013).

Trotz der überwältigenden Funktionsvielfalt der GP63 blieb die Virulenz von *L. major* nach dem Verlust nahezu aller GP63-Gene *ex vivo* und *in vivo* erhalten (Joshi et al., 1998). Erst die Deletion aller GP63-Gene führte *in vivo* zu einer verzögerten Pathogenität verglichen mit der Pathogenität von L.mj WT (Joshi et al., 2002). Bei *L. amazonensis* wurde durch einen *GP63-knock-down* sowohl die Bindung an Makrophagen vermindert als auch das intrazelluläre Überleben der Parasiten beeinträchtigt (Chen et al., 2000).

1.5.3 Peptidasen

Außer der intensiv studierten Metallopeptidase GP63 gibt es im *Leishmania* Taxon weitere Peptidasen, die anhand ihres katalytischen Zentrums in Serin-, Threonin-, Aspartyl-, Metallo- und Cystein-Peptidasen (CP) klassifiziert werden können (Silva-Ameida et al., 2012). Da in *Leishmania mexicana* bisher die höchste Aktivität von Cystein-Peptidasen im Vergleich zu den anderen *Leishmania* spp. nachgewiesen wurde, wurden die Enzyme von *L. mexicana* intensiv studiert. Ein besonderes Augenmerk lag auf den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen CPA, CPB und CPC. Im Gegensatz zu CPA und CPC liegt CPB als *multi-copy* Gen vor. Die Gene werden verstärkt in Amastigoten exprimiert, wo die Genprodukte als wichtige Virulenzfaktoren identifiziert wurden. Die *CPB*-Nullmutanten waren zwar fähig *in vitro* zu wachsen und sich zu differenzieren, jedoch war die Infektiösität in *ex vivo* Makrophagen eingeschränkt und die Läsionsbildung in BALB/c Mäusen stark verlangsamt (Denise et al., 2003; Mottram et al., 1996). Die Virulenzeinbuße konnte auf die Induktion einer antileishmanialen Th1-Antwort nach Infektion von BALB/c Mäusen mit Lmex*Δcpb* zurückgeführt werden (Alexander et al., 1998; Denise et al., 2003). Eine CPB-abhängige Th2-Immunantwort konnten dagegen Pollock *et al.* (2003) zeigen. Sie injizierten eine funktionsfähige, rekombinante CP aus *L. mexicana*, CPB2.8, in BALB/c Mäuse, wodurch die Th2-Immunantwort mit erhöhter IL-4 und IL-5 Produktion aktiviert wurde (Pollock et al., 2003). Im Gegensatz zu *L. mexicana CPB*-Nullmutanten verursachten *L. mexicana CPA*-

Nullmutante einen zum L.mex-WT vergleichbaren Krankheitsverlauf *in vivo*. Die Doppelmutanten L.mex*Δcpa/Δcpb* waren dagegen komplett avirulent und die Vakzinierung von BALB/c- und C57BL/6- Mäusen mit diesen Mutanten vor der Infektion mit L.mex-WT schützte die Mäuse partiell gegen nachfolgende Infektionen (Alexander et al., 1998). Daher werden Cystein-Peptidasen als mögliche Zielmoleküle für Medikamente angesehen.

In *Leishmania infantum* (*L. donovani*-Komplex) sind die Cathepsin L- und B-ähnliche Cystein-Peptidase für die Infektion von Makrophagen und das intrazelluläre Überleben wichtig (Gantt et al., 2003; Mundodi et al., 2005). In *L. major* konnten Cystein-Peptidasen durch Inhibitions-Experimente als wichtige Enzyme für den Parasiten *in vitro* identifiziert werden (Selzer et al., 1997).

Die bisher beschriebenen Virulenzfaktoren tragen zum Überleben in der Sandmücke bei, sichern die Transmission in den Wirt und die Evasion des Immunsystems. Sie sind *per se* jedoch nicht für die Symptome der klinischen Leishmaniose verantwortlich. Die dafür verantwortlichen Moleküle haben Chang und Kollegen in der Gruppe „pathoantigene Faktoren“ zusammengefasst. Diese Virulenzfaktoren verursachen einen hohen Antikörpertiter und damit die eigentliche Immunpathologie, welche sich in klinischen Symptomen ausdrückt (Chang and McGwire, 2002; Chang et al., 2003). Die zu dieser Gruppe gehörenden Faktoren wurden aus den Forschungsergebnissen von Kala-azar Patienten zusammengetragen. Dazu gehören: Tubuline, Ribosomale Proteine (P2a,b, eIF), nukleosomale Proteine (H2A/B, H4), *Leishmania* spp. spezifische Antigene (rK39, A2, LACK) und Chaperone (Hsp70, Hsp60, Hsp90 und Sti1). Diese zum Teil hochkonservierten, zytoplasmatischen Proteine werden nicht nur von VL-Patientseren antikörperspezifisch als Antigene erkannt, ihre homologen Proteine sind auch bei anderen Pathogeninfektionen oder Autoimmunerkrankungen als Antigene bekannt (Chang and McGwire, 2002; Requena et al., 2000).

Das Hitzeschockprotein 100 (Hsp100) wurde als Virulenzfaktor mit einer für Hsps untypischen Funktion identifiziert. Die proliferationsfähigen Hsp100-Nullmutanten (*ΔclpB*) von *L. major* und *L. donovani* waren nur bedingt zur Infektion muriner Makrophagen fähig, und L.mj *hsp100-/-* war schwach virulent für suszeptible BALB/c Mäuse. Eine Temperatur-Sensitivität der Parasiten konnte als Grund für die beeinträchtigte Virulenz ausgeschlossen werden. Promastigote L.mj *hsp100-/-* wiesen im Vergleich zu L.mj WT bei 35°C nur eine leicht reduzierte Temperaturtoleranz auf, während *L. donovani* HSP100-Nullmutanten kei-

nerlei Beeinträchtigung ihrer Thermotoleranz zeigten (Hübel et al., 1997; Krobitsch and Clos, 1999). Somit ist Hsp100 nicht für die Temperaturtoleranz der Parasiten nötig, sondern für das intrazelluläre Überleben. Tatsächlich zeigten Silverman *et al.* (2010), dass Hsp100 in die Beladung von Exosomen involviert ist und selbst zur Exosomen-Nutzlast gehört.

Die 30-100 nm großen Exosomen werden in den Endosomen einer Vielzahl myeloider Zellen und pathogener Organismen gebildet (Torrecilhas et al., 2012); so auch in Leishmanien. Die Abschnürung der Exosomen konnte an der Geißeltasche von *L. donovani* (Silverman et al., 2008) und *L. mexicana* (Hassani et al., 2011) beobachtet werden. Exosomen interagieren mit der Wirtszelle und ebnen als Träger von Virulenzfaktoren mit immunmodulatorischer Wirkung den Weg für die *Leishmania*-Infektion (Silverman et al., 2010a; Silverman et al., 2010b). Die Exosomen der Hsp100-Nullmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp weder *in vivo* noch *in vitro* einen proparasitischen Effekt. Sie förderten sogar eine antileishmaniale Immunantwort des Th1-Typs (Sacks and Noben-Trauth, 2002; Silverman et al., 2010b).

Der avirulente Phänotyp der Hsp100-Nullmutanten erwies sich *in vivo* als instabil. Durch sukzessive Mauspassagen kam es spontan zur Wiederherstellung der Pathogenität von L.mj *hsp100-/-* (Reiling et al., 2006). Der Grund hierfür war unbekannt. Um das (die) für die spontane Revertierung verantwortliche(n) Gen(e) zu finden, wurden L.mj *hsp100-/-* für ein Komplementations-*Screening* eingesetzt. Im ersten Schritt wurde aus diesen Parasiten eine Cosmid-Genbank hergestellt, die im zweiten Schritt für die Transfektion von L.mj *hsp100-/-* eingesetzt wurde. Die Selektion der Cosmide wurde durch die Passage der transfizierten Parasiten in der BALB/c-Maus erzielt. Aus dieser Selektion gingen mehrere Cosmide hervor, von denen sich in den Folgeexperimenten das mit dem stärksten virulenzsteigernden Effekt herauskristallisierte. Das Cosmid trug vier vollständige, offene Leseraster (ORF). Nur das vierte ORF begünstigte das Überleben der L.mj *hsp100-/-* in einer Mauspassage. Dieses Gen kodiert ein 46 kD-Protein (P46) mit unbekannter Funktion. Die Genbankrecherchen ergaben eine Spezifität von *P46* für *Leishmania major*. Nur in *L. infantum* wurde ein orthologes, jedoch verkürztes Gen gefunden (Reiling et al., 2010). In anderen Spezies finden sich an gleicher Stelle nur Pseudogene.

Das P46-Gen konnte die beeinträchtigte Virulenz der L.mj *hsp100-/-* kompensieren. Zudem wurde L.mj WT dank der Überexpression dieses Gens virulent für die normalerweise resistenten C57BL/6-Mäuse. Diese Virulenzsteigerung schlug sich auch in höherer Parasitenlast in *ex vivo* Makrophagen jedoch nicht in einer Hemmung der Th1-Immunantwort nieder. Im Gegenteil konnte nach Infektion der C57BL/6-Mäuse mit L.mj $P46^{+}$ eine adäquate IFN-γ Produktion festgestellt werden. Die Lokalisation des Proteins im Zytoplasma des Makrophagen deutet auf eine Interaktion mit der Wirtszelle und dadurch auf eine immunmodulatorische Wirkung des Proteins hin (Reiling et al., 2010).

Zielsetzung der Arbeit

Die kutane Leishmaniose ist die weltweit am weitesten verbreitete Infektionskrankheit durch Leishmanien. Je nach physiologischem Status des Wirtes kann die Krankheit entweder spontan überwunden werden oder zu Komplikationen führen, meistens ist sie jedoch mit entstellenden Läsionen verbunden, die zur sozialen Ausgrenzung führen können. Die Variabilität des *Leishmania* Taxon macht die Forschung mit dem Ziel der Aufklärung seiner Infektiosität zu einer Herausforderung. Es gibt zur Zeit kein Medikament, das allen Anforderungen genügt. Die Medikamente sind für die betreffenden Personen entweder zu teuer oder zu toxisch. Die Suche nach neuen Angriffspunkten für die Entwicklung von wirksamen Medikamenten geht also unaufhörlich weiter. Virulenzfaktoren sind vielversprechende Kandidaten für diese Studien. Kann man selektiv einen Virulenzfaktor blocken, kann man eventuell die Immunevasion des Parasiten unterbinden und ihn so suszeptibel machen. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, entweder man blockt den Parasiten medikamentös *in vivo* oder man nutzt avirulente Mutanten zur Vakzinierung.

Reiling *et al.* (2010) entdeckten einen *Leishmania major* spezifischen Virulenzfaktor (P46), der die beeinträchtigte Virulenz der Hsp100-Nullmutante kompensierte und durch Überexpression sogar das Wirtspektrum des Parasiten auf die sonst resistente C57BL/6 Maus ausweitete. Die Lokalisation des Faktors im Zytoplasma der Wirtszelle lässt eine Interaktion zwischen beiden und eine mögliche Immunmodulation vermuten. In dieser Arbeit sollte der Virulenzfaktor charakterisiert werden, und zwar basierend auf den Fragen: (i) Wie wirkt

P46 und ist seine Expression Stadien-spezifisch, (ii) Wie gelangt es in die Wirtszelle, (iii) Ist die virulenzsteigernde Wirkung auf *L. major* beschränkt, (iv) Gibt es genetische Differenzen zwischen unterschiedlichen *L. major*-Isolaten?

Die Expression sich überlappender Segmente des *L. major* P46-Gens sollte die aktive Region des Proteins offenbaren. Mit P46-Genaustauschmutanten sollte die Wirkung des Proteins auf beide Stadien sowie auf die *in vitro* und *in vivo* Infektiosität der Parasiten untersucht werden. Aus rekombinanten *L. major* isolierte Exosomen sollten Aufschluss über den Exportweg des Proteins und seinen Beitrag in den Exosomen geben. Schließlich sollte die genetische Diversität des Gens und deren Folgen durch Sequenzstudien und *in vivo* Selektionsstudien analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen und Stämme

2.1.1.1 *Leishmania major*

Der Großteil aller Experimente in dieser Arbeit wurde mit dem Parasitenstamm *Leishmania major* Isolat 5ASKH (MHOM/72/SU/5ASKH) durchgeführt, welcher von David Evans aus der Londoner Stammsammlung zur Verfügung gestellt wurde.

Weitere benutzte *Leishmania major* Isolate waren FE/BNI (MHOM/IL/81/FE/BNI), und das Referenzisolat Friedlin (MHOM/IL/1980/Friedlin).

2.1.1.2 Versuchstiere

Für die Infektionsstudien mit Leishmanien oder die Isolierung primärer pluripotenter Stammzellen wurden 6-8 Wochen alte BALB/c oder C57BL/6 Mäuse aus der institutsinternen (BNI) Zucht eingesetzt.

Die Herstellung von *Leishmania*-Antigen spezifischen Antikörpern erfolgt in weiblichen Hühnern (Geflügelzucht Zahrte, 29614 Soltau), die mit dem Antigen immunisiert wurden.

2.1.1.3 Zelllinien

Für die Transfektionsstudien mit P46 wurden die Zelllinien HEK-293T und L929 eingesetzt.

HEK 293T (engl. **H**uman **E**mbryonic **K**idney) sind humane embryonale Nierenzellen. Diese adhärenten Epithelzellen exprimieren konstitutiv einige Adenovirus-Gene und sowie das „SV40 large T-Antigen“. Dadurch können episomale Plasmide mit dem „SV40 o*rigin of replication*“ (zu dt. Replikationsursprung) repliziert werden.

L929 ist eine adhärent wachsende Mausfibroblasten-Zelllinie, die ursprünglich aus Haut- und Fettgewebe einer männlichen C3H/An Maus isoliert wurde. Diese Zelllinie wurde durch W. R. Earle, 1940 etabliert.

2.1.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Auflistung aller verwendeten Bakterienstämme

Aufgelistet sind: die Bezeichnungen, die Eigenschaften sowie die Verwendung und Herkunft aller in der vorliegenden Arbeit genutzten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Verwendung	Herkunft
E. coli DH5α	*sup*E44, D*lac*U169 (F80*lac*ZDM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, t*hi*-1, *rel*A1 Verwendeter Stamm: DH5a: abgeleitet von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm DH1 (Hanahan,1983) (Genotyp: *supE44 lacU169(80lacZm15) hsdR17 recA1 endA1, gyrA96 thi-1 relA* (nähere Erläuterung s. Sambrook et al. 1989), chem. Kompetent	Klonierung und Vermehrung von Plasmiden	New England Biolabs (Beverly, U.S.A.)
BL21	F-*amp*T *hsd*S_B (r_{B^-} m_{B^-}) *gal dcm rne*131 (DE3), chem. Kompetenz	Proteinexpression	Sarstedt (Agilent Technologies), Waldbronn
XL-1 Blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac,* Blau/weiß Selektion, Tetracyclin resistent, elektr. Kompetenz	Klonierung und Vermehrung von Plasmiden	Sarstedt (Agilent Technologies), Waldbronn

2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide

2.1.2.1 Benutzte Oligonukleotide

Tabelle 2.2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Angegeben sind die Bezeichnungen, die Sequenzen und der Verwendungszweck für die benutzten Oligonukleotide. Die einzuführende Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen, Start-und Stopcodons sind jeweils hervorgehoben. Alle Primer werden von der Firma Sigma-Aldrich geliefert.

Bezeichnung	5´->3´ Sequenz	Verwendungszweck
P46-Amplifikation		
Linp46-001-fwd	GGGGGTACC**ATG**GAACTCATCTTCGCCGAG	Amplifikation des verkürzten L.in P46-ORFs
Linp46-462-rev	GGGGGATCC**TCA**CCGTGAGCCTCCATCACG	Amplifikation des verkürzten L.in P46-ORFs
Lmjp46-001-fwd	GGGGGTACC**ATG**GGCAGCAGAGACTTGGTC	Amplifikation des L.mj P46-Gens bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente

Bezeichnung	5´->3´ Sequenz	Verwendungszweck
Lmjp46-399-rev	GGGGGATCC**TCA**TCGTCGTCAAGGACGAC	Amplifikation des L.mj P46 ORFs bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente
Lmjp46-349-fwd	GGGGGTACC**ATG**GAAGCCATCTACACCGAGACG	Amplifikation des L.mj P46 ORFs bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente
Lmjp46-849-rev	GGGGGATCCGGCAACGCACAGATCATGCAC	Amplifikation des L.mj P46 ORFs bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente
Lmjp46-754-fwd	GGGGGTACC**ATG**CGCCTGCGCTTCGCCGGTGAC	Amplifikation des L.mj P46 ORFs bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente
Lmjp46-1257-rev	GGGGGATCC**TCA**AAGTTTACTAGCAGACTG	Amplifikation des L.mj P46 ORFs bzw. Amplifikation der *P46*-Fragmente
Lmjp46-5´*Bam*HI	GGGGGATCC**ATG**GGCAGCAGAGACTTGGTC	Amplifikation des P46-ORFs mit Einführung der *Bam*HI-Schnittstelle
Lmjp46-3´*Eco*RI	GGGGAATTC**TCA**AAGTTTACTAGCAGACTG	Amplifikation des P46-ORFs mit Einführung der *Eco*RI-Schnittstelle
P46-3´*Xba*I	GGGGTCTAGATCTTAGTGGTGGCGGGGTGCTC	Amplifikation von *P46* +UTRs 3'Ende aus Cosmid bzw. L.mj
P46-5´*Xba*I	GGGGTCTAGAAAACGTATGCGCAACACTC	Amplifikation von *P46* +UTRs 5'Ende aus Cosmid bzw. L.mj
*Nde*I-P46	GGGCAT**ATG**GGCAGCAGAGACTTGG	*P46*-Expression in BL21 Zellen (im pJC45)
P46-*Eco*RI	GGGGAATTCAA**AGT**TTACTAGCAGACTGC	*P46*-Expression in BL21 Zellen (im pJC45)
Fusion von mCherry mit P46 N-´oder C´-terminal		
P46-RFP-*Kpn*1-fwd-RFP	GGGGGTACC**ATG**GGCAGCAGAGACTTGG	Ligation von P46 in den pCL3S-mCHC´
P46-RFP-*Hin*d3-rev	GGGAAGCTTAAGTTTACTAGCAGACTGC	Ligation von P46 in den pCL3S-mCHC´
P46-5´*Nde*I	GGGCATATGGGCAGCAGAGACTTGG	Ligation von P46 in den pCL3S-mCHN´
RFP-P46-*Hin*d3-rev	GGGAAGCTT**TCA**AAGTTTACTAGCAGAC	Ligation von P46 in den pCL3S-mCHN´
Herstellung des Plasmids für die Transfektion von BMMs (Lipo- und Nukleofektion)		

Bezeichnung	5´->3´ Sequenz	Verwendungszweck
pcDNA3.1-*Sph*I fwd	GCTGGCATGCGTTTAAACTTAAG	Deletion der *Nhe*I-Schnittstelle in der MCS des pcDNA3.1(+) Vektors
pcDNA3.1-*Sph*I rev	TTGGGTCTCCCTATAGTGAG	Deletion der *Nhe*I-Schnittstelle in der MCS des pcDNA3.1(+) Vektors
pcDNA-*Sac*II-fwd	GGGCCGCGGCTCTGGGGTTCGAAATGACC	Austausch des NeoR-Gens gegen eine *Sac*II-und *Nhe*I-Schnittstelle, um eGFP als Reportergen zu nutzen
pcDNA-*Nhe*-rev	GGGGCTAGCCGATCCTCATCCTGTCTCTTG	Austausch des NeoR-Gens gegen eine *Sac*II-und *Nhe*I-Schnittstelle, um eGFP als Reportergen zu nutzen
5‘*Nhe*I-GFP	GGGGCTAGCACC**ATG**GTGAGCAAGGGCGAGG	*EGFP*-Amplifikation mit 5‘*Nhe*I
GFP-3‘*Sac*II	GGGCCGCGG**TTA**CTTGTACAGCTCGTCC	*EGFP*-Amplifikation mit 3‘*Sac*II
Herstellung des Vektors pEB3S		
pEB1-fwd	GGTCTAGAACACCGAAGGTGGTGTTCTC	Deletion im pCL2N-Rückgrads zur Verkleinerung von diesem und Einführung einer *Xba*I-Restriktionsschnittstelle
pEB1-rev	GGGTCTAGACGAAAGGGCCTCGTGATACG	Deletion im pCL2N-Rückgrads zur Verkleinerung von diesem und Einführung einer *Xba*I-Restriktionsschnittstelle
pEB2-fwd	CCTGAAGGCGATGTTTGCC	Deletion der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle aus der P46-3´UTR
pEB2-rev	GATGCTGTAAAAGTGACGTCC	Deletion der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle aus der P46-3´UTR
pEB3-fwd	GGGAAGCTTGGATCCCACAGCCTCGCATCAGAC	Deletion von *P46* zwischen den P46`UTRs unter Einführung der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle
pEB3-rev	GGGAAGCTTGGTACCGCTCGCAAGGACCGATGATGC	Deletion von *P46* zwischen den P46`UTRs unter Einführung der *Kpn*I-Restriktionsschnittstelle
Primer für die Phylogenie-Studien		
P46-diff-fwd	ACGCCTCTCGCCCTTCCGAG	Unterscheidung zwischen *P46*-Varianten unterschiedlicher Herkunft, Senegal, Turkmenistan, Israel

Bezeichnung	5´->3´ Sequenz	Verwendungszweck
P46-diff-rev	TCACCACAAAAGCGCATTCG	Unterscheidung zwischen *P46*-Varianten unterschiedlicher Herkunft, Senegal, Turkmenistan, Israel
LmjHIP-*Kpn*I-fwd	GGGGGTACCTGCGCACTTCGTATTCACTG	L.mj *HIP*-Amplifikation für die HIP-Phylogenie
HIP-3'*Bgl*II	CCTCTAGATCTT**AGT**CGAGATCGTCTCTCC	L.mj *HIP*-Amplifikation für die HIP-Phylogenie
Hsp20-*Kpn*I	GGGGGTACC**ATG**TCCACCAGCGGCCCATTG	L.mj *Hsp20*-Amplifikation für die Hsp20 Phylogenie
Hsp20-*Bam*HI	GGGGGATCC**TCA**CGTGTCCTCCTCGAGC	L.mj *Hsp20*-Amplifikation für die Hsp20 Phylogenie
Integration der Antibiotika-Resistenzmarkergene zwischen P46 5´-3´UTRs		
GADPH fwd	GGGGGTACCACAAGACACAAACAAATTC	Amplifikation von Antibio.Res.+*T.cruzi*-UTRs aus den pCL-Vektoren, Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I
GADPH rev	GGGGGATCCGTAAAAAATTACCACAAGCTG	Amplifikation von Antibio.Res.+*T.cruzi*-UTRs aus den pCL-Vektoren, Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I
Primer für die qRT-PCR		
P46		Nachweis von P46-cDNA/-DNA
P46		Nachweis von P46-cDNA/-DNA
LeishAktin		Nachweis von Leishmania Aktin-cDNA/-DNA
LeishAktin		Nachweis von Leishmania Aktin-cDNA/-DNA
mAktin		Nachweis von Maus Aktin-cDNA/-DNA
mAktin		Nachweis von Maus Aktin-cDNA/-DNA
Sequenzierprimer		
pEB3-SEQ-fwd	CGAAGCGTCCTCGGCTAGTG	für die Sequenzierung der pEB-Vektoren
pEB3-SEQ-fwd	CGAAGCGTCCTCGGCTAGTG	für die Sequenzierung der pEB-Vektoren
M13-24R	CGGATAACAATTTCACACAGG	pUC19-Sequenzierung

Bezeichnung	5´->3´ Sequenz	Verwendungszweck
M13-24F	CCAGGGTTTTCCCAGTCACG	pUC19-Sequenzierung
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	pUC19-Sequenzierung
T7-fwd	TTAATACGACTCACTATAGG	pcDNA3.1-Sequenzierung
pIR-p-fwd2	GGCTCTGCGTTTCACTTGC	pIR-Sequenzierung
pIR-p-rev	GCGAACTGGTCGTAGAAATC	pIR-Sequenzierung
LeGO-iC2-fwd	TTCCCGAGCTCTATAAAAGAGC	Sequenzierung des LeGO-iC2-P46 Plasmids
IRES rev	AAGCGGCTTCGGCCAGTAACG	Sequenzierung des LeGO-iC2-P46 Plasmids

2.1.2.2 Plasmide

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten Vektoren

Angegeben sind der Name, die Eigenschaften der Vektoren, Informationen zu bereits integrietrten DNA/ Fragmenten sowie zur Herkunft der Vektoren.
AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, Genprodukt ist die β-Lactamase
NeoR: Neomycin-/Geniticin G418- Resistenzgen, Genprodukt ist die Aminoglycoside 3´-Phosphotransferase
sat1: *Streptomyces* Acetyltransferase für die Resistenz gegen Nurseothricin

Name	Eigenschaft	Integrierte DNA	Herkunft
Zur Verfügung gestellte Plasmide			
pUC19	Plasmid-Klonierungs-Vektor (2686 bp), AmpR für die Selektion in *E.coli*, pMB1 ori (*high-copy mutant*) für hohe Replikationsraten in *E.coli*	---	
pTL.v6	*Leishmania*-Expressionsvektor (8126 bp), AmpR, NeoR flankiert von *T.cruzi*-GA3PDH-UTRs für eine stabile Expression, LPG1-Gen von *L.donovani* für eine hohe Expressionsrate	---	A. Hombach, BNI, Hamburg
pCL3S-mCHN´	*Leishmania*-Expressionsvektor (8092 bp), *sat1* für eine Nurseothricin-Resistenz, ermöglicht die Fusion des GOIs mit mCherry am N-Terminus	---	D. Zander, BNI, Hamburg
pCL3S-mCHC´	*Leishmania*-Expressionsvektor (8062 bp), *sat1*, für eine Nurseothricin-Resistenz, ermöglicht die Fusion des GOIs mit mCherry am C-Terminus	---	D. Zander, BNI, Hamburg

Name	Eigenschaft	Integrierte DNA	Herkunft
LeGo-iC2	Lentiviraler Expressionsvektor für Säugerzellen (7820 bp), AmpR, hohe Replikationsrate, SFFV Promotor, IRES-mCherry für gekoppelte GOI- und mCherry-Expression ohne Fusion beider Genprodukte (Weber et al., 2008)	---	Mit freundlicher Genehmigung von Kristoffer Riecken (ehemals Weber), UKE, Hamburg
pCMV-VSV-G (Envelope Plasmid)	Expressionsvektor für Säugerzellen (6363 bp), AmpR, hohe Replikationsrate, CMV Promotor, lac-Promotor, T7-Promotor f1 ori für episomole Replikation (Addgene Plasmid #8454) (Stewart et al., 2003)	vsv-G (1535 bp)	Kristoffer Riecken, UKE, Hamburg (*Principal Investigator*: Bob Weinberg)
pRSV-Rev (Rev-Plasmid)	Expressionsvektor für Säugerzellen, Lentiviral; Verpackung (4174 bp) AmpR, hohe Replikationsrate, RSV U3 Promotor, lac-Promotor, f1 ori für episomale Replikation 3. Generation LV Verpackungs-Plasmid (Addgene Plasmid #12253) (Dull et al., 1998)	rev (HIVgp6)	Kristoffer Riecken, UKE, Hamburg (*Principal Investigator*: Didier Trono)
pMDLg/ pRRE (Gag/Pol-Plasmid)	Expressionsvektor für Säugerzellen, Lentiviral; Verpackung (8895 bp), AmpR, hohe Replikationsrate, CMV Promotor, RRE E-lement 3. Generation LV Verpackungs-Plasmid (Addgene Plasmid #12251) (Dull et al., 1998)	HIV-1 GAG (1508 bp)/POL (k.A.)	Kristoffer Riecken, UKE, Hamburg (*Principal Investigator*: Didier Trono)
pcDNA3.1	Expressionsvektor für Säugerzellen (5428 bp), CMV-/ T7-Promotor für hohe Expressionsrate, f1 ori für episomale Replikation, SV40-Promotor und NeoR für Selektion in Säugerzellen, AmpR und pUC ori für Selektion und Replikation in *E.coli*	---	J. Clos, BNI TM, Hamburg
pcos-p46	(12807 bp) AmpR, NeoR, 5‘-3‘-P46UTRs	*P46* (1260 bp)	M. Chrobak, BNI, Hamburg
pUC-5‘-3‘-P46UTRs	AmpR, 5‘-3‘-P46UTRs um die MCS	5‘- und 3‘-UTRs von *P46*	M. Chrobak, BNI, Hamburg
pJC45-P46	Bakterieller Expressionsvektor (3651 bp), AmpR und pUC ori für Selektion und Replikation in *E.coli*, T7-/ lac-Promotor für hohe und induzierbare Expression, Fusion des Inserts an 10 Histidine am N-Terminus für die Aufreinigung des Genprodukts	*P46*, His-gekoppelt (1323 bp)	J. Clos; M. Chrobak, BNI, Hamburg

Name	Eigenschaft	Integrierte DNA	Herkunft
Selbst hergestellte Plasmide			
pTL.v6-P46	siehe pTL.v6	*P46* (1260 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-1.P46	siehe pTL.v6	1. *P46* (399 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-2.P46	siehe pTL.v6	2. *P46* (505 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-3.P46	siehe pTL.v6	3. *P46* (512 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-4.P46	siehe pTL.v6	4. *P46* (848 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-5.P46	siehe pTL.v6	5. *P46* (917 bp)	diese Arbeit
pTL.v6-P46-Hom. (L.in)	siehe pTL.v6	*P46*-Hom. (465 bp)	diese Arbeit
pCL3S-mCHN‘-P46	siehe pCL3S-mCHN‘	*mCH*::*P46* (1972 bp)	diese Arbeit
pCL3S-mCHC‘-P46	siehe pCL3S-mCHC‘	*P46*::*mCH* (1972 bp)	diese Arbeit
pEB3S-P46	*Leishmania*-Expressionsvektor (9234 bp) *sat1* für eine Nurseothricin-Resistenz, entstanden aus dem verkleinerten pTL.v6 und der P46-Expressionskassette aus pcos-p46	*P46* (1260 bp)	diese Arbeit
pcDNA-P46-eGFP	siehe pcDNA3.1, NeoR wurde gegen das eGFP-Gen ausgetauscht und *P46* in die MCS ligiert (6620 bp)	*P46* (1260 bp) eGFP (720 bp)	diese Arbeit
LeGo-iC2-P46	siehe LeGo-iC2 (9061 bp) *P46* wurde in die MCS ligiert	*P46* (1260 bp)	diese Arbeit

2.1.3 Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung in Blockierungslösung	Hersteller
anti-P46-IgY (pk, aus Huhn)	1:200	diese Arbeit
anti-Hsp90 -IgY (pk, aus Huhn)	1:500	D. Zander, BNI, Hamburg
anti-Hsp100 -IgY (pk, aus Huhn)	1:500	D. Zander, BNI, Hamburg
anit-Huhn-IgG (aus Ziege) AP-konjugiert	1:2 000	Dianova, Hamburg

Bezeichnung	Verdünnung in Blockierungslösung	Hersteller
anti-Huhn-IgG (aus Ziege) HRP-konjugiert	1:40 000	Dianova, Hamburg
anti-Huhn-Biotin	1:10 000	Dianova, Hamburg
Streptavidin, AP-konjugiert	1:5 000	Dianova, Hamburg
Streptavidin, HRP-konjugiert	1:10 000	Dianova, Hamburg

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DyNAmo cDNA Synthesis Kit	Finnzymes
DyNAmo Color Flash SYBR Green qPCR Kit	Finnzymes
Gentra Puregene Tissue Kit	Qiagen, Hilden
iProof PCR-Kit	Bio-Rad, München
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit	Stratec, Birkenfeld, Enzkreis

2.1.5 Enzyme und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, Litauen
ProSieve QuadColor Protein Marker	Lonza, Schweiz
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas, Litauen
Restriktionsenzyme, diverse	New England Biolabs, U.S.A.
RNaseA	Sigma-Aldrich, Deutschland
T4-Ligase	New England Biolabs, U.S.A.
Trypsin	Promega, Madison, U.S.A.

2.1.6 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Zusätze

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) bezogen. Alle benötigten Lösungen werden, falls nicht anders angegeben, in ddH_2O angesetzt.

2.1.6.1 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Dulebecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	SIGMA-Aldrich, Deutschland
Isocove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium ohne Glutamin (IMDM)	SIGMA-Aldrich, Deutschland
RPMI-1640 (entwickelt am **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitut)	SIGMA-Aldrich, Deutschland
Medium 199 mit Earle´s Salzen	SIGMA-Aldrich, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM), serumfreies Medium	SIGMA-Aldrich, Deutschland

2.1.6.2 Nährmedien und Puffer für zellbiologische Methoden

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

In der Tabelle sind alle verwendeten Zellarten mit dem zugehörigen Nährmedium und dessen Zusammensetzung angegeben.

Zellart	Eigenschaften der Zellen	Medium-/ Pufferbezeichnug	Zusammensetzung
Leishmania major	Suspensionszellen	M199$^+$	1x M199 20 % inaktiviertes (30 Min. bei 56°C) FCS 2 % Natriumhydrogencarbonat 20 µg/ mL Gentamycin 2 mM L-Glutamin 40 mM HEPES (pH 7,4) 10 µg/mL Haemin 100 µm Adenin 1,2 µg/mL 6-Biopterin
		Einfriermedium	30 % M199$^+$ 50 % inaktiviertes FCS 20 % DMSO

Zellart	Eigenschaften der Zellen	Medium-/ Pufferbe-zeichnug	Zusammensetzung
BMM	adhärnte, primäre Zellen	IMDM+	55 % IMDM (ohne Glutamin) 10 % inaktiviertes FCS 5 % Pferdeserum (optional) 30 % ÜS von L929 Zellen 20 µg/ mL Gentamycin
L929-Zellen	adhärente Zelllinie	RPMI+	500 mL RPMI 10 % inaktiviertes FCS 5% L-Glutamin-Pen/Strep
HEK293T-Zellen	semi-adhärente Zell-linie	DMEM+	DMEM mit Glutamin und Glukose (4,5 g/ L) 10 % inaktiviertes FCS 1 mM Natrium Pyruvat 20 mM HEPES (pH 7,4) 1 % Pen/Strep
		Einfriermedium	60 % Kulturmedium 30 % inaktiviertes FCS 10 % DMSO
Bakterien		LB-Medium	2 % LB-Broth
		LB-Agarplatten	2 % LB-Broth 1,5 % LB-Agar
Alle		PBS	0,137 M Natriumchlorid 10,14 mM di-Natriumhydrogenphosphat 2,68 mM Kaliumchlorid 1,76 mM Kalium(di-)Hydrogenphosphat pH 7,4

2.1.6.3 Antibiotika

Tabelle 2.5 : Auflistung der verwendeten Antibiotika.

Angegeben sind die Bezeichnungen, die Zusammensetzung und Konzentration der Stocklösungen sowie deren Endkonzentrationen im Medium für alle verwendeten Antibiotika.

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg mL^{-1} in ddH_2O	50 µg mL^{-1}
Kanamycin	10 mg mL^{-1} in ddH_2O	10 µg mL^{-1}
Geniticin/ G418	100 mg mL^{-1}	50 µg mL^{-1}
Gentamycin	40 mg mL^{-1}	16 µg mL^{-1}
Nurseothricin	150 mg mL^{-1} in ddH_2O	150 µg mL^{-1}

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Puromycin	2,5 mg mL^{-1} in $M199^{+}$	25 μg mL^{-1}
L-Glutamin Pen/Strep (Penicillin/ Streptomycin)	200 mM L-Glutamin, 10 000 U Penicillin, 10 mg mL^{-1} Streptomycin	2 mM L-Glutamin; 100 U Penicillin; 0,1 mg mL^{-1} Streptomycin

2.1.6.4 Sonstige Puffer und Lösungen

T4-DNA-Ligase Puffer, 10x konzentriert	*New England* BioLabs® Inc., (Frankfurt am Main)
Restriktionspuffer „NEBuffer“ 1-4	*New England* BioLabs® Inc., (Frankfurt am Main)
ECL *Prime Western Blotting Detection Reagent*	Amersham Bioscence, Freiburg

2.1.6.5 Puffer und Lösungen für DNA-Präparation

Plasmidpräparations-Lösung 1	50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
Plasmidpräparations-Lösung 2	0,2 M Natriumhydroxid, 1% SDS, pH 14
Plasmidpräparations-Lösung 3	3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5
TE-RNase-Puffer	10 μg mL^{-1} RNase A in TE-Puffer
Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (mit HCl einstellen)

Lösungen	Hersteller
Phenol (Tris stabilisiert, pH 7,0)	Carl Roth, Karlsruhe
Trichlormethan (Chloroform)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.6.6 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese

TAE, 1x konzentriert	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA ad 1 L, autoklavieren
Tris-Borat-Ethyldiamniessigsäure-Puffer (**TBE**) 10x konzentriert	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,2 (mit HCl einstellen), autoklavieren

Ethidiumbromid	0,5 μg mL^{-1} in 1x TBE
6x DNA-Ladepuffer	50 % Glycerin, 50 % TAE, 20 mg Orange-G
7,5 M Ammoniumacetat	54 g NH_4-Acetat ad 100 mL H_2O, autoklavieren

Lösungen	Hersteller
Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) oder (37.5:1)	Bio-Rad, München

2.1.6.7 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$
Ammoniumpersulfat (**APS**)	10% in ddH_2O
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat)	100 mg BCIP, 2 mL DMF
Blocklösung	5% Milchpulver in TBS, 0,1% Tween 20
Blot-Transfer-Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,04% SDS, 20% Methanol
Coomassie brilliant blue Färbelösung	1 g L^{-1} Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 40% Ethanol (96%), 10% Essigsäure, filtern
Coomassie-Entfärbelösung	40% Ethanol (96%), 10% Essigsäure
Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer)	71,2 mM K_2HPO_4, 28,3 mM KH_2PO_4, 100 mM NaCl
KP-Puffer + 7% PEG 6000	KP-Puffer + 7% w/v PEG 6000
KP-Puffer + 24% PEG 6000	KP-Puffer + 24% w/v PEG 6001
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,5 M Tris, pH 6,8 (mit HCl einstellen)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,0	1,5 M Tris, pH 8,0 (mit HCl einstellen)
NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid)	250 mg NBT, 3,5 mL DMF, 1,5 mL ddH2O
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	200 mM in Methanol, Lagerung bei -20°C
Probenpuffer (Lämmli), 2x konzentriert (abgewandelt von U.K. Laemmli, 1970)	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 100 mM DTT (in ddH_2O) wird vor der Benutzung zugegeben
SDS-Lösung	20% SDS in ddH_2O
SDS-Laufpuffer, 10x konzentriert	250 mM Tris, 250 mM Glycin, 1% SDS
TBS (engl. ***T**ris- **b**uffered **s**aline*)	1,5 M Natriumchlorid, 100 mM Tris, pH 7,2 (mit HCl einstellen), autoklavieren

Trispuffer mit Tween® 20 (**TBST**)	TBS, 0,02 % Tween® 20

2.1.7 Geräte und sonstige Materialien

Die nachfolgende Auflistung gibt eine Übersicht über alle verwendeten Geräte und Materialien. Nicht angegebene Laborgeräte gehören zur standardisierten Laborausstattung.

Bezeichnung	Hersteller
Biomate 3 Spectraphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A
Biometra UV Band Eluator	Biometra, Göttingen
Brutschrank, Modell: 3324009903100	WTC Binder, Tuttlingen
Brutschrank, Heraeus B 6060	Heraeus, Hannover
CASY Cellcounter and Analyzer	Schärfe System, Reutlingen
Elektroporationsküvette (0,4 cm)	Bio-Rad, München
Electrophoresis Power Supply	Biometra, Göttingen
Entwickler (Curix 60)	Agfa HealthCare, Dübendorf
Epi-Fluoreszenzmikroskop	Leica, Solms
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter (⌀ 185 mm)	Schleicher & Schül, DAssel
GenePulser	Bio-Rad, München
HisBindResin	Novagen, Madison, U.S.A.
Innova™ 4400 incubator shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, U.S.A.
Inkubator (37°C, 5% CO_2) Binder CB 150	Tuttlingen, Deutschland
Inkubator (25°C) WTC Binder	Tuttlingen, Deutschland
Invertorkop ID03	Zeiss, Oberkochen
J2-21 Zentrifuge	Beckman Coulter®, Fullerton, U.S.A
J2-HS Zentrifuge	Beckman Coulter®, Fullerton, U.S.A

Bezeichnung	Hersteller
Lab-Tek-8-Well chamber slides	Nunc, Roskilde, DK
μ-Slide 8 Well glass bottom	ibidi®, Martinsried, Deutschland
Neubauer-Zählkammer 0,02 mm Tiefe	Assistent, Sondheim
PVDF-Membran Fluorotrans, 0,2 μm	Pall, Europe, Portsmouth, U.K.
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen
Quickseal tubes	Beckman Coulter®, Fullerton, U.S.A
Rollschüttler: CAT RM5	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Rotorgene 6000	Corbett, Sydney, Australien
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hannover
Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Ultrazentrifuge: L8-70M	Beckman Coulter®, Fullerton, U.S.A
Ultrazentrifuge: Optima™ TL	Beckman Coulter®, Fullerton, U.S.A
Vortexer VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

2.1.8 Computerprogramme und Datenbanken

Datenbank	Anwendung
TriTryp	BLAST (***B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool*): Homologievergleich zwischen DNA-Sequenzen
Programm	**Anwendung**
Adobe® Photoshop® CS3 Extended, Vers. 10.0.1	Bearbeitung von Bildern von Fluoreszenzpräparaten, Giemsa gefärbten Zellen, eingescannten Immunblots und Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-Gelen
ImageJ 1,47g	Überlagerungen von Fluoreszenzbildern, densitometrische Quantifizierung von Proteinbanden nach Immunoblot-Analysen
Intaglio™, Vers. 3.4.2	Gestaltung von Bildern und Graphiken
MacVector, Inc., Vers. 12.7.4	*in situ* Klonierungen, DNA-Chromatogramm Auswertungen, Sequenzvergleiche, Multiple Sequenz Alignments von DNA-oder Proteinsequenzen (Clustal W oder Muscle Algorithmus), Phylogenie-Analysen, *in situ* Transkription, *in situ* Translation

Graph Pad Prism5, Vers. 5.0a	Erstellen von Graphen zu Wachstumskinetik, Parasitenlast, relativer RNA-/DNA-Gehalt, Fußdickenzunahme. Statistische Auswertungen
EnzymX3	Informationen zu Restriktionsenzymen

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Leishmanien

2.2.1.1 Kultivierung von Promastigoten

Als Promastigote existieren Leishmanien im Darm weiblicher Sandmücken, wo sie sich vermittels ihre Geißel am Darmepithel anhaften.

Im Labor wird dieses Stadium bei 25°C im komplementierten M199 ($M199^{+)}$ (pH 7,0) Medium in 25 cm^2 Zellkulturflaschen (T25 Sarstedt) mit verminderter Luftzufuhr gehalten. Für optimale Kulturbedingungen werden die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Dafür werden die Zellen 1:1000 in einer Elektrolytlösung (CASYton) verdünnt und die Zelldichte (Zellen mL^{-1}) mit Hilfe eines CASY® *Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Wöchentlich werden die Kulturen auf $2x10^6$ Zellen mL^{-1} eingestellt. Dem Medium wird bei transfizierten Zellen zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugemischt.

2.2.1.2 Die Proliferationskinetik der Leishmanien *in vitro*

Die Wachstumskinetik von transfizierten *Leishmanien* im Vergleich zu Wildtyp-Zellen gibt Aufschlüsse über die Belastung der Zellen in der *in vitro* Kultur durch die Expression der Fremd-DNA.

Es werden $1x10^6$ Zellen in 10 mL Medium eingesät und die Proliferation der *Leishmanien* in einem Zeitraum von 4-5 Tagen durch die tägliche Bestimmung der Zelldichte am CASY® *Cellcounter & Analyzer* verfolgt und dokumentiert.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Leishmanien

Für die Langzeitlagerung von Leishmanien werden diese im flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür werden $1x10^8$ Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur entnommen und sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.). Das Zellsediment wird in 500 µL kalten, $M199^+$ (pH

7,0) resuspendiert, mit 500 µL kaltem Einfriermedium gemischt und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen (Sarstedt) gegeben. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Kristallbildung der Flüssigkeit im Zellplasma. Bei RT ist es toxisch, daher müssen alle Schritte auf Eis durchgeführt und die Zellen rasch eingefroren werden. Nach 24 Stunden bei -70°C wird das Kryoröhrchen in den Kryotank überführt.

Zur Wiederaufnahme der kryokonservierten Leishmanien in Kultur, wird das Kryoröhrchen aus dem Tank entnommen und im 37°C Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend in das M199^{+} (pH 7,0) in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt und bei 25°C inkubiert.

2.2.1.4 Transfektion von Leishmanien

Die Transfektion von Zellen beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eine eukaryotische Zelle. Dabei wird zwischen einer transienten Transfektion, bei der die zirkuläre DNA (Plasmid) episomal exprimiert wird, und der stabilen Transfektion, bei der die Fremd-DNA in das Genom der Zelle integriert wird, unterschieden. In dieser Arbeit wurden beide Transfektionen durchgeführt.

Die Transfektion von Leishmanien erfolgt durch Elektroporation. Im Zuge der Elektroporation wird die Zellmembran durch das Anlegen eines elektrischen Feldes porös, sodass Fremd-DNA in die Zelle eindringen kann.

Für die Elektroporation der Leishmanien werden 4x10^7 Zellen aus einer logarithmischen Parasitenkultur entnommen und sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.). Die Zellen werden zweimal mit je 20 mL eiskaltem PBS und einmal mit 20 mL eiskaltem Elektroporationspuffer (21 mM HEPES [pH 7,5], 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4, 6 mM Glukose) gewaschen. Das Zellsediment wird anschließend in 400 µL eiskaltem Elektroporationspuffer aufgenommen und zusammen mit 15 µg Fremd-DNA oder ohne Fremd-DNA in eine eiskalte Elektroporationsküvette (4 mm) überführt und elektroporiert (1,5 kV, 200 Ω, Kapazität 25 µFD, Zeitkonstante 0,9-0,5, dreimaliges Pulsen: Gene Pulser™, Bio-Rad). Nach 10 Min. auf Eis werden die Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen mit M199^{+} überführt und für 24 Stunden bei 25°C inkubiert. Zwecks Selektion der rekombinanten Zellen wird das Kulturmedium der Leishmanien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Wahl des Antibiotikums richtet sich hierbei nach dem Konstrukt, welches für die Transfektion der Zel-

le eingesetzt wurde. Die Kontrollgruppe wird ebenfalls mit einem Antibiotikum selektiert. Wenn die Kontrollgruppe tot ist, gilt die Selektion auf Aufnahme und Expression der Fremd-DNA als beendet.

2.2.1.5 Klonale Vereinzelung von Leishmanien

Für die Verifizierung von stabilen *Leishmania*-Transfektanten ist es notwendig mit Einzelklonen zu arbeiten, da nur so die Phänotyp-Analyse einer Mischpopulation verhindert wird. Leishmanien vermehren sich durch Teilung, was eine klonale Vereinzelung ermöglicht. Die Zelldichte der transfizierten Leishmanien-Kultur wird am CASY® dreifach bestimmt und mittels einer Verdünnungsreihe auf 0,5 Zellen/ 200 μL M199^{+} verdünnt. Insgesamt werden pro Vereinzelungsversuch zwei 96-Well Platten mit je 200 μL *Leishmania*-Suspension pro Well befüllt, mit Parafilm® versiegelt und bei 25°C bis zum sichtbaren Zellwachstum inkubiert. Mit den Leishmanien werden anschließend bis zu 10 Kulturen angelegt und die Parasiten zu Phänotyp- und Genotyp-Analysen herangezogen.

2.2.1.6 Plasmidpräparation aus rekombinanten Leishmanien

Für die Plasmidpräparation werden Leishmanien in einer 100 mL Kultur bis zu einer Dichte von $2x10^{7}$ Zellen mL^{-1} angezogen. Aus dieser Kultur werden $2x10^{9}$ Parasiten entnommen, sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.) und zweimal mit je 40 mL PBS gewaschen. Das Zellsediment wird in 2 mL Lsg 1 resuspendiert, bevor es bei Raumtemperatur (RT) mit 4 mL Lsg 2 für 3 Min. auf dem Rollschüttler gemischt wird. Nach Zugabe von 3 mL Lsg 3 wird das Reaktionsgefäß invertiert und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Präzipitat bei 4°C und 3220 xg für 30 Min. sedimentiert. Der nukleinsäurehaltige Überstand wird nachfolgend auf einen Faltenfilter gegeben und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen. Aus dem filtrierten Überstand werden die Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform extrahiert und präzipitiert. Das Präzipitat wird in 40 μL TE-RNAse A Puffer aufgenommen und zwecks RNA-Abbaus für 30 Min. im Heizblock bei 37°C geschüttelt. Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4°C.

2.2.1.7 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien

Die genomische DNA (gDNA) wird mit Hilfe des Kits für DNA-Isolation aus Zellen und Gewebe (Gentra Puregene Corekint A, Qiagen) gewonnen. Dafür werden $1x10^{9}$ Zellen aus

einer logarithmischen Kultur benötigt. Nach Bestimmung der Zellzahl wird das entsprechende Kulturvolumen in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, die Zellen sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.) und zweimal mit je 40 mL PBS gewaschen. Das Zellsediment wird anschließend in 1 mL PBS resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt; die Zellen wiederum bei den selben Konditionen sedimentiert. Der Überstand wird nachfolgend bis auf einen Rest von 20 µL abgenommen, das Zellsediment durch Vortexen resuspendiert und anschließend mit 300 µL *Cell Lysis Solution* gemischt. Der Suspension wird daraufhin 1,5 µL RNase A zugegeben. Die Lösung wurde durch Invertieren gemischt und zwecks RNA-Abbaus für eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach einminütiger Abkühlung der Lösung auf Eis werden der Suspension 100 µL *Protein Precipitation Solution* zugegeben und das Reaktionsgefäß für mindestens 20 Sekunden gevortext, bevor es für weitere 5 Min. auf Eis inkubiert wird. Anschließend wird das Präzipitat sedimentiert (4°C, 13200 xg, 5 Min.) und der Überstand in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 300 µL Isopropanol überführt. Die Suspension wird mindestens 50x invertiert und die DNA sedimentiert (RT, 13200 xg, 5 Min.). Der Überstand wird nachfolgend quantitativ abgezogen. Das Sediment wird mit 300 µL 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (RT, 13200 xg, 5 Min.). Der Überstand wird quantitativ abgezogen, das restliche Ethanol bei RT abgedampft und die DNA anschließend mit 100 µL *Hydration Solution* für eine Stunde (h) bei 65°C im Heizblock hydratisiert. Die Langzeitlagerung erfolgt bei -20°C bis -80°C.

2.2.1.8 Isolierung von Exosomen aus Leishmanien

Für die Isolierung von Exosomen aus Leishmanien werden $1x10^9$ Promastigote Parasiten aus einer stationären Kultur entnommen und in ein 50 mL Reaktionsgefäß gegeben. Die Parasiten werden für 10 Min. bei 4°C und 1250 xg sedimentiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wird in 30 mL PBS resuspendiert und die Zellen erneut bei denselben Einstellungen sedimentiert, der Überstand wird verworfen und der Waschschritt zweimal wiederholt. Die gewaschenen Parasiten werden anschließend in 5 mL serumfreies M199$^+$ Medium aufgenommen und in ein 25 cm^2 Zellkulturfläschchen (T25, Sarstedt) überführt. Die Fläschchen werden für 24 Stunden in einen Inkubator für 37°C und 5% CO_2 oder für 25°C platziert. Danach werden die Kulturen in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 4°C, 500 xg für 10 Min. sedimentiert. Der Überstand wird in ein frisches 15 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 1,10-Phenanthrolin (in

Methanol, Endkonz.: 10 mM) gegeben und dieses mehrmals invertiert. Anschließend wird der Überstand durch ein 0,22 μm Filter steril filtriert und zum Aufkonzentrieren der Exosomen auf ein Einengefilter gegeben (Centricon® Plus-70 *MWCO* 100 000 Da, Millipore), der vorher mit sterilem ddH_2O durchgespült wird. Der Überstand wird bei 4°C und 1900 xg für 5-10 Min. ultrafiltriert.

Ein Saccharose-Kissen wird in einem 5,2 mL Ultra-Clear (Beckman Coulter®) Röhrchen vorbereitet. Das eingeengte Filtrat wird auf 2 mL eiskaltes PBS, unterschichtet mit 750 μL eiskalter 1 M Saccharoselösung (20 mM Tris-HCl, 1 M Saccharose , pH 7,4) pipettiert. Die Röhrchen werden bis zum Rand mit PBS aufgefüllt, austariert und in den vorgekühlten SW 55 Ti-Rotor (Beckman Coulter®) eingespannt. Es folgt eine Zentrifugation bei 4°C und 100000 xg für 2 h. Die Exosomen wandern aufgrund ihrer Dichte (1,13 g mL^{-1}) in die Saccharoselösung. Die Saccharoselösung wird anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 3800 μL PBS vermischt. Das Gemisch wird auf drei 1,5 mL Reaktionsgefäße (Microfuge® Tube, Beckman Coulter®) aufgeteilt und austariert. Die Gefäße werden in den vorgekühlten TLA 55 Rotor (Beckman Coulter®) eingespannt und bei 4°C und 125000 xg für 2 h zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, die nicht sichtbaren Pellets in 40 μL 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgenommen und gevortext. Die Exosomenpräparate können direkt weiter verarbeitet oder für kurze Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.1.9 Denaturierender *Leishmania*-Aufschluss

Für den Nachweis von Proteinen in Leishmanien werden Lysate von den Parasitenzellen aus einer log. Wachstumsphase hergestellt. Dabei wird eine genaue Zellanzahl benötigt, die wie in 2.2.1.2 beschrieben, am CASY® bestimmt wird. Das benötigte Zellvolumen wird in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben, die Zellen sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.) und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die pelletierten Zellen werden in 1 mL PBS resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und wiederholt sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.). Das Sediment je nach gewünschter Zelldichte in 1 Vol. PBS und 1 Vol. Lämmli-Probepuffer (100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 4% SDS, 0.01% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 100 mM DTT) resuspendiert. Zum Abbau der zellulären Nukleinsäuren werden den Proben *Ribolyser Beads* (Thermo Hybaid) gegeben, die Proben 10 Sekunden gevortext und bei

95°C für 5 Minuten schüttelnd inkubiert. Das Gesamtprotein in der Lösung kann anschließend elektrophoretisch analysiert werden.

2.2.1.10 Fixieren von Leishmanien auf Objektträgern

Zur Analyse von Leishmanien mittels Giemsa-Färbung werden die Zellen auf einen Objektträger fixiert. Dazu werden 1x10^7 Parasiten aus einer logarithmischen Kultur entnommen, sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.) und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellsediment wird in 1 mL PBS resuspendiert und 20 μL davon auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Ausstriche werden nachfolgend luftgetrocknet und der Objektträger für die Fixierung der Zellen, 10 Min. in eiskaltem Methanol inkubiert. Nach Lufttrocknung der Objektträger werden die ausgestrichenen Leishmanien weiter behandelt oder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.1.11 Färbung der Zellen nach Giemsa

Die Giemsa-Färbung ist eine modifizierte Romanowsky-Färbung. Durch die Azur-Eosin-Methylenblaulösung erscheinen Nukleinsäurehaltige Organellen purpurrot und das Zytoplasma bläulich. Das Farbergebnis ist abhängig von dem pH-Wert sowie der Fixiermethode. Färbung von Zellen nach Giemsa ermöglicht eine Analyse der Zellmorphologie.

Dazu werden fixierte *Leishmania*-Ausstriche (2.2.1.8) für 12 Minuten in einer Giemsa-Färbelösung (1:10 Verdünnung mit Leitungswasser) bei RT inkubiert, die Färbelösung anschließend abgekippt und die überschüssige Farbe mit Leitungswasser ausgewaschen. Nach Lufttrocknung der Ausstriche können diese mikroskopisch analysiert und dokumentiert werden.

2.2.1.12 *In vivo* Infektion von Versuchstieren

Für die Infektionsstudien werden 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c oder C57BL/6 Mäuse eingesetzt. Die Injektion mit 2-4x10^6 Parasiten in PBS als Trägermedium wird in den rechten Fußballen mit einer 1 mL Spritze und einer 0,4 μm Kanüle gesetzt. Die für die Infektion benötigten *Leishmania* Typen werden bis zur stationären Wachstumsphase angezogen und die Zelldichte am CASY® bestimmt. Die benötigte Zellzahl wird in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben, die Zellen sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die gewaschenen, pelletierten Parasiten werden in eiskaltem

PBS resuspendiert und eine Zelldichte von 2-4x10^6 Parasiten/ 50 μL eingestellt. Die Infektionslösung wird direkt vor der Injektion in die 1 mL Spritze gezogen, auf die Spritze die Kanüle gesetzt, die Luftblasen aus der Spritze herausgepresst und die Kanüle desinfiziert. Die Mäuse werden in einer Sicherheitswerkbank manuell fixiert und die 50 μL der Infektionslösung wird in den rechten Fußballen injiziert. Die Mäuse werden in Gruppen in Käfigen bei sterilen Bedingungen gehalten. Die Fußschwellung wird wöchentlich gemessen.

2.2.2 Arbeiten mit Knochenmarksmakrophagen, HEK293T- und L929-Zellen

2.2.2.1 Herstellung von Knochenmarksmakrophagen

Knochenmarksmakrophagen (engl. **b**one **m**arrow derived **m**acrophages, BMM) wachsen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, durch die Zugabe von M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) ins Medium, heran. M-CSF stimuliert Überleben, Proliferation und Differenzierung von hematopoetischen Stammzellen. Es wird unter anderem von der Fibroblasten-Zelllinie L929 produziert und in den Überstand sezerniert. Nach ca. 10 Tagen sind die BMMs ausdifferenziert und für *ex vivo* Experimente einsatzbereit.

Für die Herstellung der Knochenmarksmakrophagen wird eine 6-8 Wochen alte C57BL/6 oder BALB/c Maus euthanasiert, Femur und Tibia herausgelöst und von Gewebe befreit. Die Knochen werden anschließend kurz in Isopropanol desinfiziert und getrocknet, bevor die Enden beider Knochen mit einer sterilen Schere angeschnitten werden. Das Knochenmark wird mit einer 5 mL Spritze und einer 0,4 μm Kanüle mit komplementiertem, L929 konditioniertem IMDM (IMDM$^+$) in eine Petrischale ausgespült und anschließend in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Während einer 5-minütigen Inkubation auf Eis setzen sich etwaige Knochensplitter auf dem Gefäßboden ab. Der knochensplitterfreie Überstand wird in ein frisches 50 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen sedimentiert (4°C, 500 xg, 10 Min.). Die pelletierten Zellen werden anschließend in frischem, vorgewärmten IMDM$^+$ resuspendiert und in eine 175 cm^2 Zellkulturflasche mit Filterdeckel (T175 Sarstedt) überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C und 5 % CO_2. In der Differenzierungsphase wird das Medium alle 3 Tage erneuert.

Die ausdifferenzierten Zellen werden nach 10 Tagen 2x mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit vorgewärmten Trypsin-EDTA (0,5 mg/mL Trypsin, 0,2 mg/mL EDTA in PBS)

bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen werden zur Inhibition des Trypsins in IMDM+ aufgenommen, sedimentiert (4°C, 500 xg, 10 Min.) und einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Die pelletierten Zellen werden in 5 mL IMDM+ resuspendiert und 1:10 mit Trypanblau verdünnt.Die Zelldichte wird mit einer Neubauer Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm^2) bestimmt. Abhängig vom Experiment wird eine bestimmte Zellzahl an BMMs eingesät und bis zur Adhärenz der Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.2.2 *Ex vivo* Infektionsstudien

Die Infektion von Knochenmarksmakrophagen dient der Analyse der Proliferationskinetik von intrazellulären Amastigoten. Dazu werden die ausdifferenzierten BMMs in *8-well chamber slides* (Nunc®) mit 2x10^5 Zellen in 500 µL IMDM+ pro Kammer eingesät. Nach 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 erfolgt die Infektion der BMMs mit *Leishmania major.* Für die Infektion werden Parasiten aus einer stationären Wachstumsphase verwendet. Nach Bestimmung der Zelldichte werden die Parasiten sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.), einmal gewaschen und im IMDM+ resuspendiert, wodurch eine Zelldichte von 1x10^6 Leishmanien/ 300 µL eingestellt (Infektionsverhältnis 1:10) wird. Der Makrophagenrasen wird mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zellen mit 300 µL der Infektionslösung überschichtet. Die Infektion erfolgt bei 37°C und 5 % CO_2 für vier Stunden. Anschließend wird die Infektionslösung abgenommen und die Zellen 2x mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend werden die infizierten BMMs mit 500 µL vorgewärmten IMDM+ überschichtet und für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Infektionsende wird der Zellrasen noch einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zellen entweder nach einer 10-minütigen Inkubation mit eiskaltem PBS auf Eis mit einem Zellschaber abgeschabt oder die Zellen kurz luftgetrocknet und anschließend mit eiskaltem Methanol für 10 Min. fixiert. Die fixierten Zellen werden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert und anschließend entweder nach Giemsa (Kap. 2.2.1.11) oder mit DAPI (Kap. 2.2.5.2) gefärbt. Die Parasitenlast wird durch Auszählen der Kinetoplasten pro Zelle bestimmt. Die abgeschabten Zellen werden sedimentiert (4°C, 500 xg, 10 Min.) und für eine RNA-Isolierung (Kap. 2.2.3.15) eingesetzt.

Für die Analyse lebender, infizierter Makrophagen werden 4x10^5 BMMs pro Well in eine 1*µ-Slide* 8-*well* Kammer (Ibidi®) eingesät, 1:10 mit P46::mCH exprimierenden Leishmani-

en infiziert und nach 24 Stunden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Kap. 2.2.5.2) ausgewertet.

2.2.2.3 Lipofektion von Knochenmarksmakrophagen

Für die Transfektion von Zellen mit Liposomen wird zunächst DNA mit Lipiden einer Transfektionsreagenz gemischt. Die negative Ladung der DNA bewirkt eine stabile Bindung an die polykationischen Lipide in der Lösung, wodurch DNA-Lipidkomplexe entstehen. Diese werden anschließend zu den eukaryotischen Zellen ins Medium gegeben und aktiv durch Endozytose aufgenommen. Im Zytosol der Zelle wird die DNA durch Fusion der Lipide mit der Endosomenmembran entlassen.

Die Lipofektion von BMM erfolgt in *8-well chamber slides* (Nunc®) mit $2x10^5$ Zellen pro Well. Ein genaues Abstimmen des Verhältnisses von DNA zum Transfektionsreagenz (Abk. TR) (ESCORT™ IV, Sigma-Aldrich) auf den jeweiligen Zelltyp ist ein wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Transfektion. Daher werden unterschiedliche DNA-Lipid-Verhältnisse getestet; 2 µg DNA: 4 µL TR (V1), 2 µg DNA: 2 µL TR (V2), 0,5 µg DNA: 2 µL TR (V3), 3 µg DNA: 6 µL TR (V4). Die Herstellung der DNA-Lipid-Komplexe erfolgt bei RT im serumfreien Medium (MEM, engl. *minimal essential medium*). Die erforderliche DNA-Menge und die entsprechende Transfektionsreagenzmenge werden getrennt voneinander mit je 50 µL MEM vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vermengen der beiden Lösungen erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei RT für die Bildung der DNA-Lipid-Komplexe. Während der Inkubation wird der BMM-Zellrasen mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zellen werden mit 400 µL MEM überschichtet. Die Lösung mit den DNA-Lipid-Komplexen wird im Anschluss an die Inkubation auf die Zellen geträufelt und der Transfektionsansatz für 4-6 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nachfolgend wird die Transfektionslösung von den Makrophagen abgezogen und die Zellen mit $IMDM^+$ für eine 24stündige Inkubation (37°C, 5% CO_2) überschichtet. Die Zellen werden anschließend entweder mit eiskaltem Methanol fixiert, mit DAPI gefärbt (Kap. 2.2.5.2) und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder aus den Zellen wird RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und es wird eine ***g**ene **o**f **i**nterest* (GOI)-spezifische qRT-PCR gemacht (Kap. 2.2.3.16).

2.2.2.4 Nukleofektion von Knochenmarksmakrophagen

Bei einer Nukleofektion wird DNA direkt in den Zellkern der transfizierten Zelle geleitet. Dies wird durch einen speziellen Nukleofektor-Puffer (Amaxa™ Nucleofector™ Technologie von Lonza) ermöglicht.

Die Nukleofektion wird mit Hilfe des Amaxa® Mouse Macrophage Nucleofector® Kits durchgeführt. Alle Lösungen müssen RT haben.

Die Makrophagen werden wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst und sedimentiert. Es werden $1x10^6$ Zellen pro Ansatz benötigt. Die pelletierten Zellen werden mit 100 µL des Nukleofektor-Puffers resuspendiert und mit 1-5 µg Plasmid-DNA versetzt (0,5 µg für den Kontrollvektor pmaxGFP™ von Amaxa™). Die Zell-DNA-Suspension wird mit Plastikpipetten in spezielle Elektroporationsküvetten (Amaxa™) überführt und in den Nucleofector™ eingespannt, dann wird das Nucleofector® Programm Y-001 gestartet. Nach dem Programmende wird den Zellen sofort 500 µL vorgewärmtes $IMDM^+$ zugegeben, die Zellen werden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C und 5 % CO_2 für 20 Minuten inkubiert, bevor sie in eine 24-Well Platte transferiert werden ($6x10^5$ Zellen pro Well). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wird die Transfektion der Zellen dokumentiert. Dazu werden die Zellen entweder mit eiskaltem Methanol fixiert, mit DAPI gefärbt (Kap.2.2.5.2) und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet oder aus den Zellen wird RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und es wird eine GOI-spezifische qRT-PCR gemacht (Kap. 2.2.3.16).

2.2.2.5 Kultivierung der L929-Zellen zur M-CSF Gewinnung

L929-Zellen werden in komplementiertem RPMI ($RPMI^+$) in 75 cm^2 Zellkulturflaschen (T75 Sigma) mit Filterdeckel bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die adhärent wachsenden Zellen vermehren sich schnell und werden alle drei Tage passagiert. Der Zellüberstand wird abgenommen und die nicht löslichen Bestandteile sedimentiert (4°C, 3200 xg, 10 Min.). Der M-CSF enthaltende lösliche Anteil wird nach Sterilfiltration bei -20°C gelagert. Der Zellrasen wird 1x mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst. Durch Zugabe von $RPMI^+$ (2 Vol.) wird Trypsin inhibiert, die Zellen werden anschließend resuspendiert und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Sedimentation der Zellen (4°C, 500 xg, 10 Min.) wird der Überstand verworfen, die Zellen in 30 mL $RPMI^+$ resus-

pendiert und auf drei T75 Zellkulturflaschen mit 20 mL vorgelegtem RPMI+ aufgeteilt. Die Zellen werden wiederum bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Der Überstand wird 2x wöchentlich gesammelt.

2.2.2.6 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen werden in DMEM+ (Tab. 2.2) in 25 cm^2 Kulturfläschchen mit Filterdeckel bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Zellen wachsen semi-adhärent, d.h. sie lassen sich bereits bei kräftigerem Flüssigkeitsdruck aus der Pipette leicht vom Flaschenboden lösen. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der Zellen werden diese dreimal wöchentlich verdünnt. Dazu wird das Medium von den Zellen entfernt, der Zellrasen vorsichtig mit vorgewärmten PBS gewaschen (PBS an die gegenüberliegende Wand des Fläschchens pipettieren und das Fläschchen leicht schwenken) und die Zellen mit vorgewärmten DMEM+ heruntergespült. Die Zellen werden anschließend sedimentiert (4°C, 500 xg, 10 Min.), in 5 mL DMEM+ aufgenommen, 1:10 mit Bromphenolblau (Blaufärbung von toten Zellen aufgrund von farbstoffdurchlässiger Membran nach Zelltod) verdünnt und die Zelldichte mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Für Experimente werden die Zellen in einer bestimmten Dichte ausgesät, für Kultivierung werden die Zellen 1:10 mit DMEM+ verdünnt, in 25 cm^2 Zellkulturfläschchen eingesät und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.2.7 Kryokonservierung von L929- und HEK293T-Zellen

Die L929-Zellen werden im flüssigen Stickstoff für längere Zeit stabil gelagert. Dazu werden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, gewaschen, in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Nach 24 Stunden bei -70°C werden die Kryoröhrchen in den Kryotank (-196°C) überführt und dokumentiert.

Zur Wiederaufnahme der kryokonservierten Zellen in Kultur werden die Kryoröhrchen bei 37°C aufgewärmt, dem angetauten Inhalt wird vorgewärmtes Kulturmedium zugesetzt, die gelösten Zellen werden in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und inkubiert. Das DMSO wird schnellstmöglich durch Waschen der Zellen und Wiederaufnahme in frisches Medium eliminiert.

2.2.2.8 Calcium-Phosphat Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung der Lenti-Vektoren

Für die Herstellung von Lenti-Viren werden die HEK293T-Zellen mit einem Lenti-Vektor aus der LeGO-Reihe (Weber *et al.*, 2008) und mit den lentiviralen Plasmiden der dritten Generation (siehe Tabelle 2.2) transfiziert und die Lenti-Viren aus dem Zellüberstand geerntet.

Es werden $5x10^6$ HEK293T-Zellen mL^{-1} in 10 mL $DMEM^+$ in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche eingesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Für die Transfektion der Zellen am nächsten Tag werden 20 µg von LeGO-iC2-p46, 10 µg von pMDLg/pRRE, 5 µg von pRSV-Rev und 2 µg von pCMV-VSV-G zusammengegeben und mit ddH_2O auf 437,5 µL verdünnt. Zu den Plasmiden werden 62,5 µL 2 M $CaCl_2$ gemischt und die Plasmid-$CaCl_2$-Lösung auf RT gebracht. In ein 15 mL Reaktionsgefäß werden 500 µL 2x HBS (Präzipitations-Puffer) vorgelegt. Mit einer Pasteurpipette und einer Pipettierhilfe Luft in das HBS geblasen, während die Plasmid-$CaCl_2$-Lösung tropfenweise zugegeben wird. Die Lösung wird anschließend für 20 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen werden die HEK293T-Zellen vorsichtig mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit 10 mL $DMEM^+$, versetzt mit 10 µL Chloroquine (25 mM in PBS gelöst) überschichtet. Auf das Medium wird im Anschluss an die 20-minütige Inkubationszeit die Plasmid-$CaCl_2$-Lösung geträufelt und die Transfektionslösung für 6 Stunden mit den Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nachfolgend wird die Transfektionslösung abgezogen und den Zellen frisches $DMEM^+$ zugegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 werden die Viruspartikel geerntet. Der Zellüberstand wird in ein 15 mL Reaktionsgefäß auf Eis steril filtriert (0,20 µm), daraus 500 µL Aliquots gemacht und bei -70°C gelagert (ÜS1). Die Zellen werden mit frischem $DMEM^+$ überschichtet und für weitere 24 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO_2). Nach der zweiten Ernte der Viruspartikel (ÜS2) werden die HEK293T-Zellen verworfen.

Vor der Transduktion der Zellen mit den Lenti-Viren müssen die virushaltigen Überstände titriert werden. Eine Transduktionrate von 5 % bis 20 % ist am besten, da man sonst von multiplen Integrationen ausgehen müsste (Fehse *et al.*, 2004). Von den HEK293T-Zellen werden $5x10^4$ pro Well einer 24-Well Platte eingesät. Nach Adhärenz der Zellen (5-8 Stunden) wird das Medium abgezogen und pro Well 500 µL $DMEM^+$ mit 8µg/mL *Polybrene* (8 mg/mL in PBS) sowie nachfolgend die virushaltigen Überstände zugegeben. Pro Well

werden jeweils in Triplikaten 0,1 µL, 1 µL, 10 µL und 100 µL ÜS1 und ÜS2 zu den Zellen gegeben. Die Viruspartikel werden durch die Zentrifugalkraft (24°C, 1000 xg, 1 Stunde) an die Zellen gebracht und die Zellen im Anschluss bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 Stunden wird das virushaltige Medium gegen 10 mL DMEM$^+$ ausgetauscht und die Zellen 48 Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO_2), bevor der Virus-Titer am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wird.

2.2.2.9 Transduktion von BMMs, HEK293T- und L929-Zellen mit Lenti-Viren

Die Transduktion der Zellen mit Lenti-Vektoren erfolgt in einer 24-Well Platte, die mit Deckgläschen für adhärent wachsende Zellen ausgelegt ist. Alle Zellen werden mit vorgewärmten PBS gewaschen, von dem Boden ihrer Kulturflasche abgelöst und in die vorbereitete 24-well Platte jeweils in Triplikaten eingesät. Die HEK293T-Zellen werden mit $4x10^4$ Zellen pro Well ca. 16 Stunden vor Versuchsbeginn eingesät. Die BMMs und L929-Zellen werden mit $7x10^5$ Zellen pro Well 48 Stunden vor Versuchsbeginn eingesät. Am Versuchstag wird von den Zellen Medium abgezogen und der Zellrasen einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend werden pro Well 500 µL *Polybrene* konditioniertes Medium (DMEM$^+$, IMDM$^+$ oder RPMI$^+$) gegeben, gefolgt von dem virushaltigem Überstand, wobei das Volumen von der Titer-Bestimmung abgeleitet wird. Zur homogenen Durchmischung der Viruspartikel im Medium, wird die Platte leicht geschwenkt und anschließend in den Zentrifugenrotor gespannt. Es wird eine Stunde bei 20°C und 1000 xg zentrifugiert und die Platten im Anschluss in den Inkubator (37°C, 5 % CO_2) überführt. Nach 24 Stunden wird das virushaltige Medium abgezogen und durch frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 erfolgt die Analyse der Transduktion am Fluoreszenzmikroskop.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. ***p**olymerase **c**hain **r**eaction*, **PCR**) ist eine Methode zur Vermehrung (Amplifikation) eines DNA-Abschnittes *in vitro*. Die Methode basiert auf sich wiederholenden Schritten von Erhitzen und Abkühlen der Reaktionslösung. Diese Lösung besteht aus dem DNA-*template* (Matritze), den *forward* und *reverse* Primern, dem

Puffer, Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. der ***Taq***-Polymerase, die ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium ***Thermus aquaticus*** isoliert wurde). Primer sind Oligonukleotide, die *revers* komplementär zu dem 5´- und 3´-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes sind. In der Kettenreaktion wird ein aus drei Teilen bestehender Zyklus bis zu 35 mal wiederholt.

Schritt 1: Denaturierung der DNA-Stränge (Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen)

Schritt 2: Primerhybridisierung an die DNA-Einzelstränge (Annealing)

Schritt 3: Elongation der Primer (DNA-Polymerisation)

Vor dem ersten Zyklus wird die Probe auf 98°C für 30 Sekunden (Initiale Denaturierung) und im Anschluss an den letzten Zyklus auf 72°C erhitzt (finale Elongation).

Kritisch für die Reaktion sind die Annealing-Temperatur, die von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer abhängig ist, sowie die Elongationszeit, die sich nach der Polymerisationsgeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes richtet (15-30 Sek./ kb für die iProof™-Polymerase von Bio-Rad). Für die PCR von *Leishmania* gDNA wird aufgrund des hohen GC-Gehaltes das Kit „iProof™ High-Fidelity PCR“ verwendet. Ein beispielhaftes Pipettierschema sowie ein zugehöriges PCR-Programm sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

Tabelle 2.6: PCR-Ansatz und -Programm (iProof™ Bio-Rad)

Angegeben ist der Standard PCR-Ansatz und das Standard PCR-Programm nach Herstellerangaben.

PCR-Ansatz	PCR-Programm	
10 ng Plasmid, 500 ng gDNA	Initiale Denaturierung 98°C 30 Sek.	
10 µL iProof GC-Puffer (2x)		
0,5 µL 5´ Primer	1. Denaturierung: 98°C 10 Sek.	25-35 Zyklen
0,5 µL 3´ Primer	2. Annealing: 40-68°C 20 Sek.	
0,6 µL DMSO	3. Elongation: 72°C 15-30 Sek./ kb	
x µL ddH_2O		
20 µL Gesamtvolumen	finale Elongation: 72°C 5 Min.	

Mit der PCR-Methode können, außer der Vervielfältigung der DNA, gewünschte Restriktionsschnittstellen an das 5´- sowie das 3´-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes eingefügt. Diese werden für die spätere Ligation der PCR-Produkte in ein Plasmid benötigt. Hierfür werden die Primer mit überhängenden Sequenzen gestaltet, welche der Palindromsequenz der gewünschten Restriktionsendonukleasen entsprechen. Der DNA-Abschnitt wird während der Polymerase-Reaktion um die zusätzlichen Sequenzen verlängert.

Für die Reinheitskontrolle einzelner PCR-Komponenten wird bei jeder PCR eine Kontrolle ohne DNA-*template* durchgeführt. Die PCR-Produkte werden im Anschluss elektrophoretisch analysiert.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese basiert auf der Auftrennung negativ geladener Nukleinsäure-Moleküle in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Molekülgröße. Die Auftrennung erfolgt in einem Gel aus quervernetzter Agarose (D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose). Je nach prozentualem Anteil der Agarose variiert die Porengröße der Gel-Matrix, wodurch eher größere oder eher kleinere Nukleinsäure-Moleküle besser aufgetrennt werden. Am häufigsten werden 0,8 % w/v Agarose in TAE-Puffer bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgekocht und mit Ethidiumbromid (0,1 μg mL^{-1}) versetzt. Ethidumbromid interkaliert in die DNA, wodurch diese mit einem UV-Transilluminator nachgewiesen und dokumentiert werden kann.

Nach Aushärtung des Gels wird dieses mit DNA-Proben, versetzt mit DNA-Ladepuffer, beladen und an ein elektrisches Feld angeschlossen (10 V cm^{-1} für 1-2 Stunden). Mit Hilfe einer DNA-Leiter wird die Größe der aufgetrennten Fragmente bestimmt.

2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei dieser Methode basiert die Gel-Matrix auf der Quervernetzung von Acrylamid mit N, N´-Methylenbisacrylamid (Verhältnis 19:1). Für das Gel werden die Acrylamide, ddH_2O und TBE-Puffer mit dem Radikalstarter Ammoniumperoxidsulfat (APS) sowie dem Polymerisierungskatalysator (TEMED) gemischt und zwischen zwei gereinigte, in eine vertikale Gießkammer eingespannte Glasplatten gegossen. Abhängig von dem gewünschten Quervernetzungsgrad des Gels variiert der prozentuale Acrylamid-Anteil. Nach vollständiger Polymerisierung des Gels wird es mit DNA-Proben, versetzt mit DNA-Ladepuffer, beladen.

Für den DNA-Nachweis wird das Gel in einem TBE-Ethidiumbromidbad (0,5 μg mL^{-1}) für 10 Min. und anschließend für 10 Min. in TBE zur Eliminierung überschüssigen Ethidiumbromids inkubiert. Am UV-Transilluminator kann die DNA dokumentiert werden.

2.2.3.4 Extraktion von DNA aus Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten können diese aus dem Gel extrahiert werden. Das gewünschte DNA-Fragment wird unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean up* Kits (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Auflösung des Gels bei 50°C wird die in der Lösung enthaltene DNA an spezielles Säulenmaterial (NucleoSpin®) gebunden, zweimal mit einem Waschpuffer gewaschen, mit dem Eluationspuffer wieder von der Säule gelöst und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die reine DNA kann anschließend für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.3.5 Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden ursprünglich aus Bakterien isoliert, wo sie dem Schutz der Zelle vor artfremder DNA dienen. Die Enzyme spalten doppelsträngige DNA an spezifischen, palindromischen Sequenzen, die sich aus mindestens vier Basenpaaren zusammensetzen. Bei der Spaltung können entweder glatte (*blunt*) oder überhängende (*sticky*) Enden entstehen. In der Molekularbiologie werden Restriktionsendonukleasen für die gerichtete Klonierung oder zur Identifizierung von DNA-Präparationen eingesetzt. Das Puffersystem und das Temperaturoptimum der Enzyme wird von dem Hersteller bestimmt und entsprechend angewendet.

Für analytische Zwecke werden 0,5 - 1 μg Plasmid-DNA und 4 U Enzym bei einem Reaktionsvolumen von 20 μL eingesetzt. Für eine präparative Aufbereitung der DNA werden bis zu 10 μg DNA und 2x 40 U Enzym eingesetzt bei einem Reaktionsvolumen von 100 μL. Die Restriktion erfolgt für mindestens 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad.

2.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man in der Molekularbiologie die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA- bzw. RNA-Fragmente an ihren Enden. Die Phosphodiesterbindung wird

durch die T4-Ligase (gewonnen aus dem Bakteriophagen T4) unter ATP-Verbrauch geknüpft.

Die Ligation eines *Inserts* (GOI, engl. *gene of interest*) in einen Vektor erfolgt in einem Reaktionsvolumen von 10 µL mit einem Insert : Vektor-Verhältnis von 3:1, mit 4 U von der T4-Ligase in einem speziellen T4-DNA-Ligase Puffer. Die Reaktionslösung wird für die Verknüpfung von glatten Enden für 3 Stunden bei RT inkubiert. Überhängende Enden werden über Nacht bei 4°C verknüpft. Nachfolgend werden kompetente Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert.

2.2.3.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Bakterien werden durch die Aufnahme von sich frei in Lösung befindender DNA transformiert. Die Aufnahme wird durch physikalischen Einfluss auf die Bakterien erzwungen.

Es werden 50 µL chem. kompetente Zellen (DH5α *subcloning efficiency cells,* NEB) in ein vorgekühltes 1,5 mL Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt. Zu den Bakterien werden 1-10 ng Plasmid oder 5 µL von dem Ligationsansatz gegeben und durch Schnippen mit den Bakterien gemischt. Die Bakterien-DNA-Suspension wird für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen im Wasserbad bei 42°C für 20 Sekunden hitzegeschockt und sofort im Anschluss für 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterien werden mit 950 µL vorgewärmten LB-Medium gemischt und für eine Stunde schüttelnd bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nachfolgend werden 100 µL der Bakteriensuspension auf eine vorgewärmte LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Wahl des Antibiotikums ist abhängig von dem Plasmid mit dem die Bakterien transformiert wurden. Die Platte wird über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Für die Plasmidpräparation wird am nächsten Tag LB-Medium mit den Bakterienkolonien inokuliert, das entsprechende Antibiotikum zugegeben und die Proben für ca. 16 Stunden bei 37°C unter Luftzufuhr schüttelnd inkubiert.

2.2.3.8 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Die elektrokompetenten XL1-Blue-Zellen werden auf Eis aufgetaut. Anschließend werden 50 µL der Bakterien in eine gekühlte Küvette auf Eis vorgelegt. Zu den Bakterien werden 2-5 ng Plasmid gegeben und durch Schnippen mit den Bakterien vermischt. Die Küvette wird in ein Elektroporationsgerät (Micro Pulser™, Bio-Rad) eingespannt und ein elektrisches Feld angelegt (Programm Ec-1, einmal pulsen). Den Zellen wird sofort im Anschluss

450 µL vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Die gesamte Suspension wird in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, die Küvette mit weiteren 450 µL LB-Medium gespült und diese ebenfalls zur Zellsuspension gegeben. Die Suspension wird für eine Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend werden 100 µL der Bakteriensuspension auf eine aufgewärmte LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht im Inkubator bei 37°C gehalten. Nachfolgend wird für die Plasmidpräparation LB-Medium mit den Bakterienkolonien inokuliert.

2.2.3.9 Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Zur Analyse eines Plasmid-Konstruktes werden Minipräparationen von Plasmiden gemacht. Hier wird wenig DNA aus einer kleinen Bakterienkultur gewonnen.

Es werden 2-4 mL LB-Medium mit einer transformierten Bakterienkolonie inokuliert und mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Die Flüssigkultur wird über Nacht bei 37°C unter Luftzufuhr geschüttelt. Die Bakterien werden anschließend sedimentiert (4°C, 16000 xg, 3 Min.), in 100 µL Lsg. 1 resuspendiert und durch Invertieren mit 200 µL Lsg.2 gemischt. Dabei erfolgt die alkalische Lyse der Bakterien und die Anlagerung von SDS an Zellproteine und -Lipide. Durch Zugabe von 150 µL Lsg. 3 und durch eine 5-minütigen Inkubation auf Eis wird der pH-Wert der Lösung neutralisiert und die SDS-Protein- und SDS-Lipid-Komplexe werden gefällt. Die Zelltrümmer sowie gefällte Zellbestandteile werden sedimentiert (4°C, 16000 xg, 12 Min.) und der nukleinsäurehaltige Überstand in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 mL 96%igen Ethanol wird die DNA aus der Lösung gefällt (20°C, 16000 xg, 30 Min.). Das Nukleinsäure-Pellet wird im Anschluss mit 500 µL 70%igen Ethanol überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (20°C, 16000 xg, 10 Min.) wird der Ethanol abgezogen, abgedampft (37°C), das Nukleinsäure-Pellet in 40 µL TE-RNaseA aufgenommen und zwecks RNA-Abbaus bei 37°C für 30 Min. schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wird die Plasmid-DNA für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt (2.2.3.5).

2.2.3.10 Isolierung reiner Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Leishmanien oder anderen eukaryotischen Zellen wird eine hochreine Plasmid-DNA verwendet. Diese wird aus einem Casiumchlorid-Dichtegradient isoliert und anschließend gefällt.

Für die Präparation hochreiner Plasmid-DNA werden 200 mL *Cycle-Grow* LB-Medium mit einer transfizierten, verifizierten Bakterienkolonie inokuliert und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Kultur wird unter Luftzufuhr bei 37°C schüttelnd über Nacht inkubiert, die Bakterien anschließend sedimentiert (4°C, 5000 xg, 20 Min.) und in 5 mL Lsg. 1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 mL Lsg. 2 wird das Gemisch durch mehrmaliges Invertieren und durch 10-minütige Inkubation auf dem Rollschüttler gemischt, wobei die Zellen lysiert werden. Durch Zugabe von 7,5 mL Lsg. 3 und durch eine Inkubation auf Eis für 10 Min. präzipitiert das SDS zusammen mit den daran gebundenen Proteinen und Lipiden. Das Präzipitat wird sedimentiert (4°C, 5000 xg, 30 Min.) und der nukleinsäurehaltige Überstand über einen Faltenfilter gereinigt. Dem Filtrat werden 0,7 Vol. Isopropanol zugefügt, die Lösung wird durch mehrmaliges Invertieren homogenisiert und die Nukleinsäuren gefällt (20°C, 3220 xg, 30 Min.). Das Nukleinsäure-Pellet wird mit 10 mL 70% Ethanol überschichtet und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20°C, 3220 xg, 10 Min.) in 4 mL TE-Puffer (pH 8,0) vollständig resuspendiert. Der Nukleinsäurelösung werden anschließend 4,9 g Cäsiumchlorid sowie 150 μL Ethidiumbromid (10 mg mL^{-1}) zugegeben, die Lösung bei RT auf dem Rollschüttler homogenisiert und mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Quick-Seal-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter®) überführt. Die Röhrchen werden austariert und luftblasenfrei verschweißt. Der CsCl-Gradient stellt sich bei der 8-stündigen Ultrazentrifugation bei 70 000 rpm und 25°C ein. Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid können die gDNA-, Plasmid-DNA- und RNA-Banden voneinander unterschieden werden. Die Plasmid-DNA-Bande wird nach der Ultrazentrifugation vorsichtig entnommen und zwecks Eliminierung des Ethidiumbromids zweimal mit je 1 Vol. Ammonium-Acetat gesättigtem Isopropanol gewaschen (Trennung in zwei Phasen, Ethidiumbromid wird zusammen mit der organischen Phase abgenommen und verworfen). Die DNA wird durch Zugabe von 2 Vol. ddH_2O, 0,1 Vol. 7,5 M NH_4-Acetat und 2,5 Vol. 96% Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt (20°C, 3220 xg, 30 Min.) und je nach Ausbeute in 200 μL-500 μL TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Nach vollständiger Lösung der DNA wird ihre Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.3.12) und die Plasmid-Sequenz durch Sequenzierung (2.2.3.13) überprüft.

2.2.3.11 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient in der Molekularbiolgie der Trennung von Proteinen sowie von DNA und RNA aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten dieser Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion. Wird auf ein Denaturierungsmittel verzichtet, so kann sich die RNA nicht lösen und es wird gezielt nur DNA extrahiert.

Für die DNA-Extraktion aus einer Lösung wird dieser 0,1 Vol. 4,5 M NH_4Acetat und 1 Vol. Phenollösung (Tris stabilisiert, pH 8,0) zugesetzt und das Reaktionsgefäß für 5 Min. bei RT invertiert. Nach Zugabe von 1 Vol. einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) wird weitere 5 Min. bei RT invertiert bevor die Substanz zur Phasentrennung zentrifugiert wird (22°C, 16000 xg, 3 Min.). Die untere, organische Phase wird ohne Störung der Interphase abgenommen und die obere, wässrige Phase mit 1 Vol. einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) ausgeschüttelt. Nach Phasentrennung (22°C, 16000 xg, 5 Min.) wird die obere, wässrige Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die gelöste DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. 96%gen Ethanols gefällt (22°C, 16000 xg, 20 Min.). Das DNA-Pellet wird mit 70%gem Ethanol überschichtet, erneut zentrifugiert (22°C, 16000 xg, 10 Min.), der Ethanol abgezogen und abgedampft und die DNA in TE-Puffer aufgenommen. Die gelöste DNA kann für weitere Experimente verwendet werden. Die Sequenzierung der extrahierten DNA ist aufgrund von Phenol-Chloroform-Spuren in der Lösung nicht aussichtsreich.

2.2.3.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung für Nukleinsäuren in Lösung erfolgt photometrisch anhand der Berechnung der Absorption (engl. ***o**ptical **d**ensity*, OD) des Lichts von Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Eine Absorptionseinheit OD_{260} =1 entspricht 50 μg mL^{-1} dsDNA (**d**oppel-**s**trängige DNA) oder 40 μg mL^{-1} RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation ergibt sich aus dem 260/280-Quotient. Das Absorptionsmaximum von Proteinen (und Phenol) liegt bei 280 nm. Für reine DNA sollte der Quotient bei 1,8 liegen, für RNA bei 2,0. Werte unter 1,8 indizieren eine Protein (oder Phenol) -Kontamination.

2.2.3.13 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der klonierten Plasmide auf eventuelle Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen durch Mutationen innerhalb des GOI erfolgen Sequenzanalysen der hochreinen Plasmid-DNA. Dafür wird die Plasmid-DNA an ein externes Labor (LGC-Genomics, Berlin) verschickt und dort nach der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert. Diese Methode basiert auf der PCR-Methode. Hier wird einer der beiden DNA-Stränge ausgehend von einem Primer durch eine Polymerase verlängert. Allerdings finden sich in der Probelösung neben dNTPs auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), die an ihrem 3´-Ende keine Hydroxylgruppe tragen und so die Polymerase-Reaktion abbrechen. Die vier ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) sind an unterschiedliche Fluorochrome konjugiert, so dass das jeweilige endständige ddNTP der Kettenabbruchprodukte nachgewiesen werden kann. Die Abfolge der nachgewiesenen Signale gibt die Sequenz der Basenabfolge der eingesetzten DNA wieder.

Die Auswertung der Sequenzanalysen erfolgt mit dem Programm MacVector, Inc.© Version: 12.7.4.3. Vergleichende Sequenzanlysen erfolgen mittels der Datenbank TriTryp.

2.2.3.14 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Für die Bestimmung der Parasitenlast in poplitealen Lymphknoten (popLK) infizierter Mäuse wird die gesamte gDNA aus den präparierten Lymphknoten isoliert und anschließend der Anteil der Parasiten-gDNA bestimmt.

Die im rechten Fußballen infizierten Mäuse werden euthanasiert und der den Fuß drainierende popLK herauspräpariert. Zur Kontrolle wird auch der den linken (nicht infizierten Fuß) drainierende popLK herauspräpariert. Die LKs werden jeweils in 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben und im flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung der gDNA aus den popLKs erfolgt mit Hilfe des Gentra® Puregene® *Tissue* Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Die gefrorenen LKs werden mit etwas flüssigem Stickstoff zermörsert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 300 µL *Cell Lysis Solution* auf Eis überführt. Die Suspension wird durch Invertieren vermischt und mit 1,5 µL Puregene Proteinase K versetzt, die Gefäße wieder invertiert und für 3 Stunden bei 55°C im Wasserbad inkubiert (optional). Die Proben werden in diesen 3 Stunden alle 20 Min. invertiert. Anschließend wird die Lö-

sung kurz auf Eis abgekühlt und 1,5 µL RNaseA zugegeben. Es folgt eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die Proben werden im Anschluss auf Eis abgekühlt, mit 100 µL der *Protein Precipitation Solution* gemischt und bei voller Leistung des Vortexgeräts für 20 Sek. gemischt. Das Proteinpräzipitat wird im Anschluss sedimentiert (4°C, 16000 xg, 5 Min.) und der DNA-haltige Überstand in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit vorgelegten 300 µL Isopropanol überführt ohne das Proteinpellet aufzuwirbeln. Die DNA wird gefällt (20°C, 16000 xg, 30 Min.), das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet und nach erneuter Zentrifugation (20°C, 16000 xg, 10 Min.) bei 37°C getrocknet. Die DNA wird mit 100 µL *DNA-Hydration-Solution* versetzt und für eine Stunde bei 65°C im Heizblock geschüttelt. Während dieser Inkubation werden sämtliche DNasen inhibiert. Nach 24 Stunden bei RT ist die gDNA einsatzbereit.

2.2.3.15 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Das Transkriptom einer Zelle korreliert zwar nur in wenigen Zellen mit dem Proteom, trotzdem können durch RNA-Analysen mögliche Effekte auf die Expression eines Gens aufgedeckt werden.

Durch den Anteil an *Leishmania*-RNA in einer RNA-Präparation aus infizierten *ex vivo* Makrophagen kann man nicht nur überprüfen, wie stark ein Gen im Amastigotenstadium exprimiert wird, sondern auch die durchschnittliche Parasitenlast in den Makrophagen bestimmen.

Die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen wird mit Hilfe des InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kits (Stratec) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Isolierung von RNA aus Leishmanien werden $1x10^8$ Zellen aus einer logarithmischen Wachstumsphase entnommen, sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.), einmal mit 20 mL PBS (4°C) gewaschen (4°C, 1250 xg, 10 Min.), die pelletierten Zellen in 1 mL PBS (4°C) resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Parasiten werden erneut sedimentiert (4°C, 1250 xg, 10 Min.), der Überstand abdekantiert und das Pellet im restlichen PBS resuspendiert. Zu der *Leishmania*-Suspension werden 350 µL *Lysis-Solution* versetzt mit 1/100 DTT gegeben und die Lösung mit der Pipette gemischt.

Für die Isolierung der RNA aus infizierten Makrophagen werden die in einem 1:10 Verhältnis mit *L. major* infizierten Makrophagen (Kap. 2.2.2.2) 24 Stunden nach Infektion mit

warmem PBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Inkubation der Zellen in eiskaltem PBS. Die Zellen werden anschließend abgeschabt, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert (4°C, 500 xg, 10 Min.), der Überstand abdekantiert und das Zellpellet im restlichen PBS resuspendiert. Zu der Zellsupsension werden 350 µL *Lysis-Solution* versetzt mit 1/100 DTT gegeben und die Lösung mit der Pipette gemischt.

Alle weiteren Schritte der RNA-Isolierung sind für beide Zellarten gleich.

Die lysierten Zellen werden auf einen *DNA-Binding-Spin*-Filter gegeben und für 1 Min. bei RT und 13400 xg zentrifugiert. Der DNA-bindende Filter wird verworfen, der Durchlauf mit 250 µL 96%igem Ethanol gemischt und auf ein *RNA-RTA Spin* Filter überführt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 9300 xg und RT wird der Durchfluss verworfen. Der Filter wird einmal mit 600 µL *Wash Buffer* R1 (RT, 9300 xg, 30 Sek.) und einmal mit 700 µL *Wash Buffer* R2 gewaschen (RT, 9300 xg, 30 Sek.). Der Filter wird durch Zentrifugation (RT, 13400 xg, 5 Min.) getrocknet und die RNA mit 40 µL *Elution Buffer* R nach 5-minütiger Inkubation bei RT in ein RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert (RT, 9300xg, 1 Min.). Die isolierte RNA wird sofort auf Eis inkubiert. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.3.12).

2.2.3.16 Semi-quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Der Gehalt eines Gen-Transkripts (RNA) in einer Zelle oder der Anteil des Gens in einer gDNA-Präparation kann semi-quantitativ durch die qRT-PCR bestimmt werden.

Für diese Methode wird gDNA oder cDNA eingesetzt. Die cDNA wird aus RNA unter Verwendung von *random Primern* und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wird das Kit „DyNAmo cDNA *Synthesis“* (Finnzymes) verwendet.

Die cDNA sowie gDNA werden unter der Verwendung von GOI-spezifischen Primern als *templates* in der qRT-PCR eingesetzt. Es wird nur ein spezifischer Teil des GOI amplifiziert. Die qRT-PCR wird mit Hilfe des „DyNAmo *Color Flash SYBR Green* qPCR“ Kits (Finnzymes) im *Corbett Rotor Gene* 6000 durchgeführt. Durch die Interkalation des im Kit enthaltenen Farbstoffs *SYBR Green* in die amplifizierte DNA wird der Gehalt des GOI quantifiziert und dokumentiert.

Für die Quantifizierung des GOI wird der Aktin-Gehalt in der Probe als interner Standard bestimmt. Dadurch lassen sich die Werte des GOI-Gehaltes in unterschiedlichen Proben

normalisieren und untereinander vergleichen. Für die Parasitenlastbestimmung in Makrophagen werden Maus-Aktin-spezifische Primer und *Leishmania*-Aktin-spezifische Primer für die qRT-PCR eingesetzt. Aus dem realtiven Leishmanien-Aktin-Gehalt lässt sich die relative Parasitenlast in den Makrophagen bestimmen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe unter denaturierenden Bedingungen. Aufgrund des SDS in Gel und Laufpuffer bekommen die Proteine eine netto negative Ladung, die direkt proportional zu ihrer Größe ist, wodurch die Proteine nur nach Größe und nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt werden. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem weitmaschigen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 und einem engmaschigen Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8. Der pH-Gradient führt zur Sammlung und Fokussierung der Proteine an der Grenze zum Trenngel. Im elektrischen Feld wandern die Proteine ihrer Größe entsprechend schneller oder langsamer durch das Trenngel und werden so aufgetrennt.

Für die Gelmatrix wird der Acrylamid-Bisacrylamid-Anteil (37.5:1, 40%) ebenfalls wie in der PAGE (2.2.3.3) in Abhängigkeit von der Proteingröße gewählt. Das Trenngel (1,5 M Tris-HCl [pH 8,8], 7.5-12 % Acrylamid-Bisacrylamid, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) wird zwischen zwei gereinigte Glasplatten, in einem vertikalen Gießstand, gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymeristaion des Gels, wird das Isopropanol abgezogen. Das Sammelgel (1 M Tris-HCl [pH 6,8], 5 % Acrylamid-Bisacrylamid, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) wird auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingeführt. Nach der Polymerisation des Gels wird der Gießstand in eine Gelkammer eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0.1% SDS) gefüllt. Die Proteinproben werden in dem Proben-Puffer (Lämmli) für 5 Min. bei 95°C aufgekocht und auf das Gel geladen. Eine Spannung von 15 V cm^{-1} wird angelegt und die Proteine für 1-2 Stunden aufgetrennt. Pro Bahn werden Zelllysate (2.2.1.9) aus $5x10^6$ - $1x10^7$ Leishmanien aufgetragen. Als Größenstandard werden der PageRuler *Prestained Protein Ladder* (Lonza) für die Western-Blot Analyse und der PageRuler *Unstained Protein Ladder* (Fermentas) für die Coomassie Brilliant Blau Färbung verwendet.

Zum Nachweis der Proteine werden diese entweder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder auf einer Membran immobilisiert (Wester-Blot) und mit Antikörpern nachgewiesen (Immunoblot).

2.2.4.2 Färbung des SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie® Brilliant Blau

Der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau R-250 lagert sich an basische Seitenketten von Aminosäuren an, wodurch alle Proteine in einem SDS-Gel unspezifisch angefärbt werden. Dazu wird das Gel für 2 Stunden oder über Nacht bei RT in die Färbelösung (1 g mL^{-1} Coomassie Brilliant Blau R-250, 40% Ethanol [96%] 10% Essigsäure) gegeben und leicht geschüttelt. Für eine selektive Proteinfärbung wird der Farbstoff aus dem Gel durch die Inkubation in einer Entfärberlösung (40% Ethanol [96%], 10% Essigsäure) entfernt. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach dem gewünschten Grad der Entfärbung. Die Entfärberlösung wird anschließend mit ddH_2O weggespült, das Gel dokumentiert und das Gel luftblasenfrei zwischen zwei feuchten Zellophanpapieren konserviert.

2.2.4.3 Western Blot (*semi dry*)/ Immunblot

Bei dieser Methode werden Proteine auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose oder Polyvinyldifluorid (PVDF) immobilisiert (engl. *blotting*). Die Proteine werden mit einer *semi dry* Transferapparatur auf die Trägermembran übertragen und können auf dieser durch Bindung spezifischer Antikörper identifiziert werden. Der Nachweis der Proteine erfolgt dabei indirekt durch ein enzymkatalysiertes Signal. Zur Verstärkung des Signals wird das Protein im ersten Schritt von einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) gebunden und im zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper an die Fc-Region des primären Antikörpers. Der Sekundärantikörper ist an ein „Reporterenzym“ konjugiert. Das Enzym (Alkalische Phosphatase [AP] oder Meerrettichperoxidase [engl. ***h**orser**a**dish **p**eroxidase*, HRP]) setzt chromogene oder fluorogene Substrate in der Lösung um, wodurch als Nachweissignal entweder ein Farbstoff oder eine Chemiluminezenz entsteht.

Für den Nachweis von Proteinen wird das Protein-Gemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine PVDF-Membran (Fluorotrans, 0,2 μm) wird entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten, in Methanol aktiviert, kurz mit ddH_2O gespült und im Transferpuffer äquilibriert. Vier Lagen 3 MM Whatman Filter werden entsprechend der Membrangröße mit 0,5 cm Überhängen zugeschnitten und mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wird luftbla-

senfrei auf das Polyacrylamidgel gelegt und beides zwischen die vier Lagen feuchte Whatman Filter platziert, alle Luftblasen werden ausgestrichen und die Anode auf die Apparatur aufgesetzt. Der Proteintransfer erfolgt in einem Feld von 1 mA/cm² für eine Stunde. Die Membran kann nachfolgend zwischen zwei Filtern gelagert werden oder direkt zur Absättigung freier Bindestellen auf der Membran in eine Blocklösung (5% w/v Magermilchpulver in TBS, 0.1 % Tween 20) gegeben werden. Anschließend erfolgt die Bindung des primären Antikörpers an das nachzuweisende Protein. Dazu wird der Protein-spezifische Antikörper in der Blocklösung verdünnt (Huhn anti-P46 1:200, Huhn anti-Hsp90/-Hsp100 1:500) und die Lösung auf die Membran gegeben. Die Bindung erfolgt für eine Stunde bei RT auf einem Horizontalschüttler. Im Anschluss werden nicht gebundene Antikörper in einem dreimaligen Waschschritt mit TBST-Puffer (TBS, 0.02 % Tween 20) von der Membran gewaschen (je 5 Minuten bei RT auf dem Horizontalschüttler). Es folgt eine einstündige Inkubation der Membran mit dem in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörper (anti-Huhn AP 1:2000, anti-Huhn HRP 1:40000). Nach dem dreimaligen Waschschritt erfolgt der indirekte Proteinnachweis über die Enzymreaktion.

Bei geringer Proteinausbeute kann das Nachweissignal durch einen Zwischenschritt verstärkt werden. Für die Bindung des Primärantikörpers wird ein anti-Huhn-Biotin Konjugat eingesetzt (1:10000 in Blocklösung). Die Antikörperlösung wird für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert, die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt und das an den Antikörper konjugierte Biotin durch ein Streptavidin-AP- oder Streptavidin-HRP-Konjugat (1:5000, 1:40000) identifiziert. Streptavidin hat hohe Affinität zu Biotin. Durch ein zusätzliches Molekül in der Bindungskette und die starke Bindung von Biotin und Streptavidin ist eine größere Enzymmenge zur Identifizierung des immobilisierten Proteins vorhanden, wodurch das Signal verstärkt wird.

Für den kolorimetrischen Nachweis der Alkalischen Phosphatase wird die Membran im Anschluss an den letzten Waschschritt im AP-Puffer äquilibriert. Die Enzymsubstrate NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat) als chromogenes Substrat werden mit AP-Puffer gemischt und auf die Membran gegeben. Bei der Substratumsetzung von AP entsteht ein blauer unlöslicher Indigo-Farbstoff. Bei gewünschter Intensität der Proteinbanden wird die Enzymreaktion mit Leitungswasser gestoppt, die Membran zwischen zwei Filtern getrocknet und am Scanner dokumentiert.

Der Proteinnachweis durch die Meerrettichperoxidase erfolgt mit Hilfe der *ECL (*engl. *enhanced chemiluminescence) Prime Western Blotting Detection* Reagenz (Amersham). Diese Reagenz besteht aus Lösung A und Lösung B, die unmittelbar vor der Verwendung 1:1 gemischt werden. Meist sind es hochkonzentrierte Peroxide wie 1,2-Dioxetan, die mit einem Puffer gemischt werden. Die Membran wird nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper fünfmal gewaschen, mit dem gemischten ECL-Reagenz überschichtet und zwischen zwei Cellophanfolien platziert. Es folgt die Subtratumsetzung durch das Enzym zu einem Chemilumineszenz-Signal, das einen Film (Amersham Hyperfilm ECL) in der Dunkelkammer belichtet. Durch das Entwickeln des Films am ECL-Entwickler (Curix 60, AGFA) werden die Proteinbanden als schwarzes Signal sichtbar und können dokumentiert werden.

2.2.4.4 Nachweis von Proteinen aus Saccharose-gereinigten Exosomen

Der Nachweis von Proteinen in Exosomen erfolgt entsprechend den Kapiteln 2.2.4.2 und 2.2.4.3. Die sedimentierten Exosomen werden in PBS und Lämmli-Probenpuffer (1:1) aufgenommen, wodurch es zum Aufschluss der Exosomen kommt. Die Proben werden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert und über Antikörper identifiziert.

Zum Nachweis von membranumschlossenen Vesikeln wird die Exosomenpräparation aus einer Kultur auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die pelletierten Exosomen (Kap. 2.2.1.8) werden entsprechend den Angaben in der Tabelle 2.7 im Puffer resuspendiert und mit Trypsin (Promega) behandelt.

Tabelle 2.7: Probenzusammensetzung für den Nachweis membranumschlossener Proteine.

In der Tabelle sind die Probenzusammensetzungen und die jeweiligen Zusätze aufgeführt.

Exosomen	Probe 1	80 μL 20mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS	40 μg mL^{-1} Trypsin	Inkubation bei 37°C, 2 Stunden
	Probe 2	80 μL 20mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS **+0,1% Triton X-100**	40 μg mL^{-1} Trypsin	
	Probe 3	80 μL 20mM Tris-HCl (pH 7,4) in PBS	-----	

Nach der Inkubation im Wasserbad werden die Proben in je 1 Vol. Lämmli-Probenpuffer, versetzt mit dem Trypsin-Inhibitor PMSF (200 mM Stocklösung in Methanol, Endkonzentration 20 mM), aufgenommen, gevortext, 5 Min. bei 95°C aufgekocht und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran werden diese mit dem Primärantikörper identifiziert und mit dem Sekundärantikörper nachgewiesen. Der Nachweis sollte nur in Probe 1 und 3 (Tab. 2.7) möglich sein, da die Proteine hier von einer Membran vor Trypsin geschützt sein müssten.

2.2.4.5 P46-Antigen-Aufreinigung aus Bakterien

Für die Biosynthese eines P46-spezifischen Antikörpers werden Hühner mit einem P46-Antigen immunisiert. Dieses Antigen wird durch die Expression des P46 in Bakterien und die Aufreinigung des Proteins aus den Bakterien gewonnen. Für die Aufreinigung des Antigens über eine Nickel-Affinitätschromatographie wird es in den Bakterien His-tag-gekoppelt exprimiert. Der His-tag besteht aus sechs Histidinen, die mit dem N-Terminus des Antigens fusioniert sind.

Für die Antigen-Produktion werden BL21 Zellen mit dem Vektor pJC45-p46 oder pJC45 über Hitzeschock transformiert (Kap. 2.2.3.7). Mit den transformierten Bakterien werden 2 mL LB-Medium, versetzt mit 0,1% Glukose, Ampicillin (0,1 μg mL^{-1}) und Kanamycin (0,02 μg mL^{-1}), inokuliert. Die Flüssigkultur wird für 2 Stunden unter Luftzufuhr bei 37°C geschüttelt und anschließend in 400 mL LB, versetzt mit Glukose, Ampicillin und Kanamycin überführt. Die Bakterien werden bei 37°C unter Luftzufuhr geschüttelt und ihr Wachstum photometrisch bei OD_{600} überwacht. Bei einer OD_{600} von 0,05-0,1 wird der Bakterien-Suspension 0,4 mmol L^{-1} IPTG zugegeben und so die Expression von *His-P46* initiiert. Nach 2 Stunden bei 37°C werden die Bakterien sedimentiert (4°C, 5000 xg, 20 Min.), die pelletierten Zellen in 80 mL eiskaltem PBS vollständig resuspendiert und erneut sedimentiert (4°C, 3220 xg, 20 Min.). Die pelletierten Bakterien werden in insgesamt 20 mL Puffer 1 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt durch Sonifikation auf Eis bei 100 % Output (6x 20 Sek., je 1 Min. Pause dazwischen). Nach Sedimentation der löslichen Bestandteile (4°C und 5000 xg für 30 Min.) wird das Pellet in 10 mL Puffer 2 resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Rollschüttler gemischt. Im Anschluss folgt eine erneute Zentrifugation für 30 Min. bei 4°C und 5000 xg. Der proteinhaltige Überstand wird mit der aktivierten Matrix

(*His Bind Resin*) bei 4°C 1 Stunde auf dem Rollschüttler gemischt, wobei der His-tag des Antigens an das Nickel in der Matrix bindet.

Aktivierung der Matrix: 2 mL Matrix in ein 15 mL Reaktionsgefäß geben und mit 10 mL Puffer 2 mischen, bei RT und 3220 xg für 2 Min. sedimentieren, Überstand verwerfen, die Schritte zwei mal wiederholen. Nach dem dritten Waschschritt die Matrix mit 2 mL 100 mM $NiSO_4$ mischen, für 10 Min. bei RT inkubieren, sedimentieren (selbe Konditionen wie zuvor), Überstand verwerfen, einmal mit Puffer 2 waschen.

Eine Säule wird mit ddH_2O preäquilibriert und mit der Protein-Matrix beladen. Die Protein-Matrix wird nacheinander mit je 10 mL Puffer 2, 3 und 4 gewaschen, wobei der Durchlauf aufgefangen und bei -20°C eingefroren wird. Das Antigen wird mit Puffer 5 in 5x 1,5 mL Aliquots eluiert und bei -20°C eingefroren. Es folgt die Verifizierung der Proteinexpression durch Elektrophorese und die Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau.

Die Proteinaufreinigung wird durch die Verwendung von Stichproben aus dem Aufreinigungsverfahren (Bakterien vor und nach Induktion, Probe vor Zelllyse sowie der Überstand nach Zelllyse und der Überstand mit Puffer 2) kontrolliert. In der Regel wird das Protein mit den Eluationsaliquots #1, #2 und #3 von der Säule gelöst.

Als Kontrolle zur Proteinexpression werden Bakterien mit dem leeren Vektor transfiziert. Aus diesen Bakterien werden ebenfalls, wie oben beschrieben, Proteine isoliert und nachgewiesen.

Für die Immunisierung von Hühnern muss das Antigen von jeglichen *E.coli* Komponenten gereinigt werden, was durch die Dialyse (MWCO 6-8000 Da) erreicht wird.

2.2.4.6 IgY-Extraktion aus einem Eidotter

Für die Produktion von gewünschten Antikörpern werden Hühner mit einem Antigen immunisiert und produzieren als Folge Antikörper gegen dieses. Der Antikörper wird aus dem Eidotter des gelegten Hühnereis isoliert.

Die Immunisierung der Hühner erfolgt mit 200-400 μg rekombinantem, gereinigtem Protein, das 1:1 mit komplett Freundschem Adjuvanz gemischt wird. Das Protein-Adjuvanz-Gemisch wird subkutan in den Halsbereich der Hühner injiziert. Nach drei Wochen wird die Immunisierung nach demselben Verfahren aufgefrischt. Nach drei Wochen können die Eier zur Antikörpergewinnung genutzt werden.

Das Eigelb wird vom Eiweiß getrennt und mit ddH_2O vorsichtig abgespült. Nach Entfernung der Dotterhaut wird das Eigelb in ein 50 mL Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 Vol. Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer) bei RT auf dem Rollschüttler gemischt. Nach Zugabe von 1 Vol. KP-Puffer mit 7% PEG 6000 erfolgt zur Fällung der Lipide eine 30-minütige Inkubation auf dem Rollschüttler bei 4°C. Das Präzipitat wird im Anschluss bei 16 000 xg und 4°C für 10 Min. sedimentiert und der Überstand durch Mull und Faltenfilter in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Antikörper werden durch die Zugabe von 10% w/v PEG 6000 zum Filtrat und die anschließende Inkubation bei RT auf dem Rollschüttler gefällt. Nach kompletter Auflösung des PEG werden die Antikörper sedimentiert (4°C, 16 000 xg, 10 Min.) und in 10 mL KP-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 1 Vol. KP-Puffer mit 24% PEG werden die Antikörper erneut gefällt und erneut sedimentiert (4°C, 16 000 xg, 10 Min.). Das Pellet wird in 5 mL KP-Puffer resuspendiert und ungelöste Substanzen durch Sedimentation (4°C, 16 000 xg, 10 Min.) vom Überstand getrennt. Der klare Überstand wird als Antikörperlösung verwendet. Zur Langzeitlagerung wird der Überstand mit 0,02% Natriumazid versetzt, in je 500 μL-Proben aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Um die Antikörper nicht durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren zu beschädigen, wird eine Antikörper-Lösung 1:1 mit Glycerin (98%) gemischt und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Mikroskopische Methoden

2.2.5.1 Lichtmikroskopie

Mit der Lichtmikroskopie wird das Wachstum aller Zellen in Kultur regelmäßig beobachtet und die Zellbeschaffenheit beurteilt. Die ausgestrichenen und nach Giemsa gefärbten Zellen werden ebenfalls lichtmikroskopisch betrachtet und dokumentiert. Dazu wird das Lichtmikroskop Evos xL von PeqLab genutzt.

2.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie

Am Fluoreszenzmikroskop werden Fluorochrome wie DAPI (4´,6-Diamidino-2-phenylindol), GFP oder mCherry mit dem Licht eine bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren ein energieärmeres Licht, das durch spezielle Filter geleitet und dokumentiert wird.

Für den Nachweis von nukleinsäurehaltigen Zellorganellen wie den Nuklei und den Kinetoplasten (bei Leishmanien) wird DAPI genutzt. Dieser Farbstoff interkaliert bevorzugt in

AT-reiche DNA-Regionen. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht (358 nm) emittiert DAPI Licht im blauen Bereich (461 nm).

Fixierte Leishmanien (Kap. 2.2.1.10) oder fixierte, infizierte Makrophagen (Kap. 2.2.2.2) werden für 5 Min. bei RT mit Waschpuffer (PBS [pH 7,4], 0.01 % Triton-X100) auf dem Horizontalschüttler gewaschen und die Zellmembran anschließend permeabilisiert. Dafür werden die Zellen in einer Feuchtkammer für 15 Min. bei RT mit einer Permeabilisierungslösung (50 mM NH4Cl, PBS [pH 7,4], 0.1% Triton-X100) inkubiert. Der DAPI-Farbstoff ($1 \mu g\ \mu L^{-1}$) wird 1:50 in Blocklösung (2% w/v BSA in PBS, 0.1% Triton-X100) verdünnt und im Anschluss an die Permeabilisierung für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln. Es folgen drei je 5-minütige Waschschritte mit dem Waschpuffer auf dem Horizontalschüttler, bevor die Zellen mit einem Tropfen Mowiol Eindeckmedium (25% Glyzerol, 0.1 M Tris-HCl [pH 8,5], 10% w/v Mowiol 4-88) konserviert werden.

Auch eGFP- (Absorption: 509 nm; Emission: 488 nm) oder mCherry- (Absorption: 610 nm; Emission: 587 nm) tragende Leishmanien werden mit DAPI gefärbt, mit Mowiol konserviert und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die Proben werden am Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica) oder am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Olympus) ausgewertet. Am letzteren ist auch die Auswertung lebender Zellen in Kulturmedium möglich.

2.2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei dieser Mikroskopie wird ein feingebündelter Elektronenstrahl in einem Muster über ein Objekt geführt (Abrasterung). Die verschiedenen Wechselwirkungen des Objekts mit dem Elektronenstrahl geben Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit des Objekts. Die Auswertung erfolgt anhand der Intensität des Signals.

In dieser Arbeit wurden Exosomen aus Leishmanien isoliert (Kap. 2.2.1.8) und mit dem REM dokumentiert. Die über Saccharose gereinigten, pelletierten Exosomen werden mit 500 μL 2% Glutaraldehyd (in 0,01 M Na-Cacodylat-Puffer) fixiert. Anschließend werden 20 μL dieser Lösung auf mit 0,01 % Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gegeben und getrocknet. Es folgt ein 10-minütiger Waschschritt mit Na-Cacodylat-Puffer und eine erneute Fixierung der Exosomen für 1 Stunde bei 4°C mit 1% Osmiumtetraoxid (OSO_4). Die Exosomen werden zweimal mit ddH_2O gewaschen, um das OSO_4 zu entfernen. Die Probe

wird mit Isopropanol in einer absteigenden Verdünnung (2x5 Min. in 30%-50%-70%-80%-90%-100% Isopropanol) entwässert. Es folgt die *critical point* Trocknung im Gerät Polaron CPD7501 (40°C und 1300 psi). Die Deckgläschen werden schließlich auf Metallträgern befestigt, mit Goldstaub beschichtet und am Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM) „gerastert“. Mit Hilfe einer Kleinbildkamera werden die Mikroskopie-Bilder auf einem APX schwarz/weiß Film dokumentiert und anschließend digitalisiert.

2.2.6 Datenverarbeitung

2.2.6.1 Bildbearbeitung

Die Aufnahmen von Agarosegelen werden unter UV-Beleuchtung gemacht und digitalisiert. Die Coomassie Brillinat Blau gefärbten SDS-Gele sowie Immunblots werden mit einem Flachbettscanner (*Epson Perfection V700 Photo*) digitalisiert. Die digitalen Bilder werden mit dem Programm Adobe Photoshop® CS3® *Extenden* Version 10.0.1 bearbeitet und mit dem Programm Intaglio 3.0.2. gestaltet und beschriftet.

Alle digitalen Bilder vom jeweiligen Mikroskop werden mit Hilfe der Programme ImageJ und Adobe Photoshop® CS3® *Extenden* Version 10.0.1 bearbeitet. Überlagerungen mehrerer Aufnahmen werden mit den selben Programmen gemacht. Die bildliche Gestaltung und Beschriftung erfolgt mit dem Programm Intaglio 3.0.2. Selbst erstellte Bilder werden ebenfalls mit dem Programm Intaglio 3.0.2 gestaltet.

Alle Graphen werden mit der Software GraphPad Prism 5.0 erstellt und gestaltet.

3. Ergebnisse

3.1 P46-Nullmutante, Herstellung und Charakterisierung

3.1.1 Herstellung der P46-Nullmutanten

P46 wurde als Virulenzfaktor in *Leishmania major* (*L. major*) identifiziert. Reiling *et al*. (2010) zeigten eine virulenzsteigernde Wirkung des Proteins bei Überexpression in *L. major*. Eine ausführliche Charakterisierung von P46 und seiner Rolle als Virulenzfaktor war Gegenstand dieser Arbeit.

Zur Charakterisierung der Rolle eines Proteins in der Zelle ist die Erzeugung von Protein-Nullmutanten eine etablierte Strategie. Diese Methode wird als Reverse Genetik bezeichnet, da man hier nicht von einem Phänotyp auf das Gen schließt, sondern ausgehend von dem Gen dessen Funktion aufzuklären versucht. Die Allele des Protein-kodierenden Gens lassen sich normalerweise leicht durch die Ausnutzung der zelleigenen homologen Rekombination gegen ein Antibiotikum-Resistenzgen austauschen (Cruz and Beverley, 1990; Ommen et al., 2009). Es wird ein Vektor hergestellt, der die untranslatierten Bereiche (abgekürzt UTR, engl. ***u**n**t**ranslated **r**egion*) stromauf- und -abwärts (5´UTR -> 3`UTR) des auszutauschenden Gens trägt. Zwischen die UTRs wird das Antibiotikum-Resistenzgen platziert. Für die homologe Rekombination muss das Konstrukt linearisiert und durch Elektroporation transfiziert werden. Nachfolgend können die transfizierten Parasiten unter den entsprechenden Antibiotika selektiert werden.

Ein Genaustausch ist möglich, wenn (i) das Protein-kodierende Gen nicht in multiplen Kopien vorliegt, (ii) das Protein nicht essentiell für das Überleben der Zelle ist oder (iii) der Expressionslevel des Gens ausreichend ist. Das Letztere trifft wahrscheinlich nicht auf das P46-Gen zu, da die transfizierten Leishmanien bereits bei einem Allel-Austausch nicht überlebensfähig waren (M. Chrobak, D. Zander, nicht publizierte Daten). Basierend auf der Hypothese eines zu niedrigen Expressionslevels des P46-Genlokus und der damit ver-

bundenen mangelnden Antibiotikaresistenz bei einem Genaustausch wurde eine neue Strategie für den P46-Genaustausch entwickelt.

Zur Überwindung des vermutet niedrigen Expressionslevels des P46-Genlokus wurde das Genaustausch-Konstrukt durch UTRs eines Gens mit hoher Expressionsrate ergänzt, welche z.B. den sogenannten Haushaltsgenen eigen ist.

Eines der bekanntesten Haushaltsgene kodiert für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Abk., GA3PDH). Dieses Enzym katalysiert einen Schritt in der Glykolyse, bei dem energiereiche Verbindungen entstehen. Da alle Zellen Energie benötigen und die meisten Zellarten Glukose als Energielieferant nutzen können, ist die GA3PDH ein ubiquitäres Enzym. Die 5´-3´-UTRs des GA3PDH-Gens von *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) konnten bereits als effizient für die Expression der Antibiotika-Resistenzgene bestätigt werden (Kelly, 1994).

Für die Herstellung der P46 Nullmutanten wurden daher diese GA3PDH-Sequenzen flankierend zum Antibiotikum-Resistenzgen eingefügt. Nach Einfügen der Selektionsmarker-Genkassette wurden die jeweiligen Konstrukte für die Elektroporation von *L. major* linearisiert (Abb. 3.1 B, D). Da *Leishmania* spp. typischerweise diploid sind, das Fehlen sexueller Stadien *in vitro* Kreuzungsreaktionen aber ausschließt, mussten für die Herstellung einer P46-Nullmutante beide Allele des P46-Gens sukzessiv gegen Antibiotika-Resistenzgene ausgetauscht werden.

Hierfür wurden zwei Konstrukte hergestellt, welche entweder ein Neomycin-Resistenzgen oder ein Puromycin-Resistenzgen tragen (Abb. 3.1 B, D). *L. major* 5ASKH wurden nacheinander mit beiden Konstrukten transfiziert. Genaustauschmutanten wurden zunächst unter Neomycin und nach der zweiten Transfektion unter Neomycin und Puromycin selektiert. Die resistenten Parasiten wurden durch *limiting dilution* klonal vermehrt.

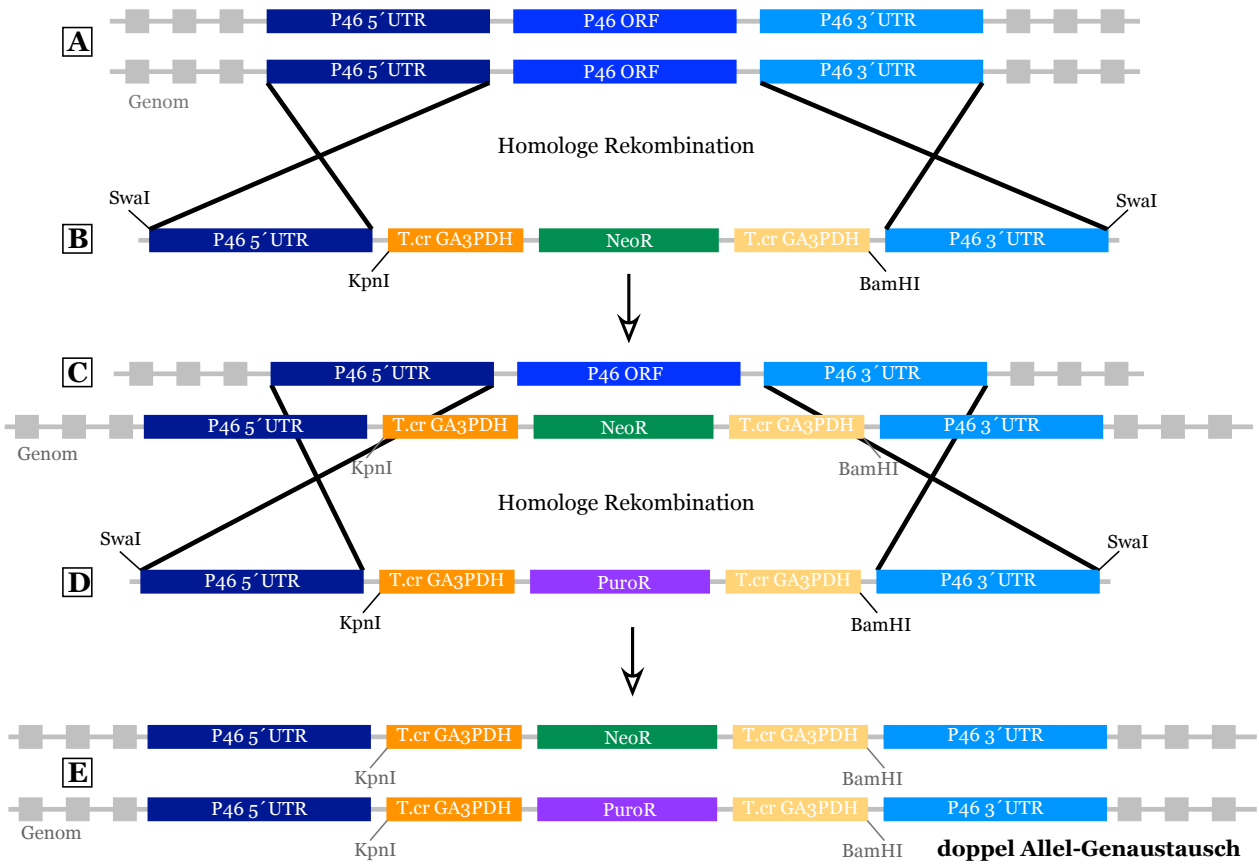


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zur Herstellung von P46 Nullmutanten.

Zum Austausch beider P46-Allele des P46-ORF (Blau) (**A**) im *L. major* Genom wurde ein lineares Konstrukt hergestellt (**B**), in dem das Neomycin-Resistenzgen (Abk. NeoR, grün) von den 5´-und 3´-UTRs des GA3PDH-Gens aus *T. cruzi* (dunkel-und hellorange) flankiert wird. Diese Resistenzgen-Kassette wurde mittels der Schnittstellen für *Kpn*I und *Bam*HI zwischen die 5´-und 3´-UTRs (dunkel- und hellblau) des P46-Gens integriert; nachfolgend wurde das Konstrukt mit der Restriktionsendonuklease *Swa*I linearisiert (**B**). Nach Transfektion von *L. major*-Zellen wurde die Resistenzgen-Kassette durch homologe Rekombination an den P46-UTRs in den P46-Genlokus inseriert (**C**). Einzel-Allel-Austauschmutanten wurden unter Neomycin selektiert. Das zweite P46-Allel wird über eine homologe Rekombination gegen ein Puromycin-Resistenzgen (Abk. PuroR, lila) ausgetauscht (**D**). Nachfolgend wurde unter Neomycin und Puromycin auf P46-Nullmutante selektiert (**E**).

ORF engl. *open reading frame*
UTR engl. *utranslated region*

3.1.2 Verifizierung der P46-Nullmutanten auf gDNA- und mRNA-Ebene

Bevor die Auswirkungen des P46-Verlustes auf den Parasiten untersucht werden konnten, musste der erfolgreiche Austausch beider P46-Allele gegen Antibiotika-Resistenzgene bestätigt werden.

Es wurden drei bis vier Klone der vereinzelten Parasitenpopulationen auf den Verlust des P46-Genlokus hin überprüft. Hierfür wurde aus den Parasiten (*L. major P46-/-*) genomische DNA (Abk. gDNA) isoliert und als *template* zur Amplifikation des P46-ORF in PCRs eingesetzt (Abb. 3.2. A). Als Kontrolle für die erfolgreiche Isolierung der gDNA wurde zusätzlich eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die eine Amplifikation des vollständigen Hsp23-ORFs erlauben (Abb. 3.2 B). Die Produkte aus beiden Reaktionen wurden elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 3.2 A&B).

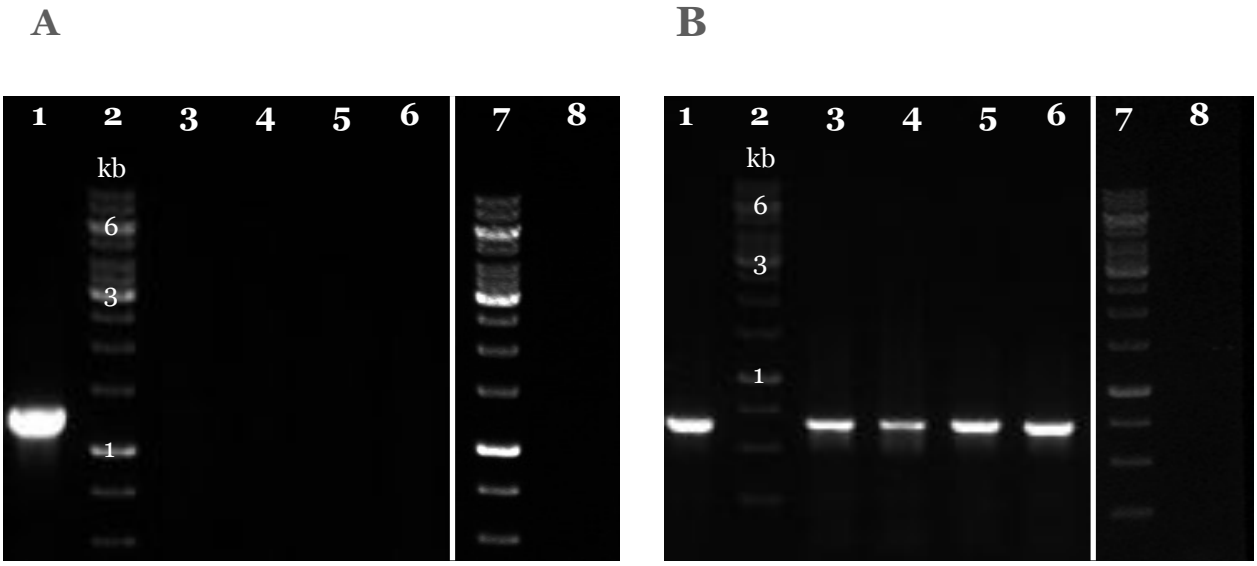


Abb. 3.2: Analytisches Agarosegel nach PCR mit gDNA aus L.mj *P46-/-* als *template*.

Das Bild zeigt Produkte aus der P46-Amplifikation (**A**) bzw. Hsp23-PCR (**B**). Die gDNA aus L.mj Wildtyp-Zellen (**Bahn 1**) diente als Positivkontrolle. Getestet wurden L.mj *P46-/-* #1 (**Bahn 3**), L.mj *P46-/-* #2 (**Bahn 4**), L.mj *P46-/-* #3 (**Bahn 5**), L.mj *P46-/-* #4 (**Bahn 6**) und eine Negativkontrolle (**Bahn 8**). In den **Bahnen 2** und **7**: 1-kb DNA-Leiter. Die Länge für die hervorgehobenen Banden ist jeweils in kilo-Basenpaaren (kb) angegeben. Die Länge des *P46*-PCR-Produkts beträgt 1,26 kb, während sich die Länge des *Hsp23*-PCR-Produktes auf 630 bp beläuft.

Wie aus der Abbildung 3.2 A hervorgeht, war eine *P46*-Amplifikation mit gDNA aus den vier putativen *L. major P46-/-* Klonen (Bahnen 3-6) nicht möglich, während die PCR mit

gDNA aus *L. major* Wildtyp-Zellen (L.mj WT) ein *P46*-Amplifikat ergab (Abb. 3.2 A, Bahn 1). Die Amplifikation von *Hsp23* aus den selben gDNAs war dagegen durchweg erfolgreich (Abb. 3.2 B, Bahnen 3-6). Ein falsch positives Ergebnis ist auszuschließen, da ohne gDNA-*template* keine Kontamination erfolgte (Abb. 3.2 B, Bahn 8). Somit war der Verlust der P46-Allele im *L. major*-Genom bestätigt.

Weiterhin wurde die Deletion des P46-Gens auf mRNA-Ebene überprüft. Hierfür wurde RNA aus *L. major* WT und aus drei *L. major P46-/-* Klonen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde als *template* für die Durchführung einer semiquantitativen *real time* (qRT)-PCR eingesetzt (Abb. 3.3). Die Analyse ergab, dass in den *L. major P46-/-* Promastigoten tatsächlich keine P46-RNA mehr nachweisbar war (Abb. 3.3).

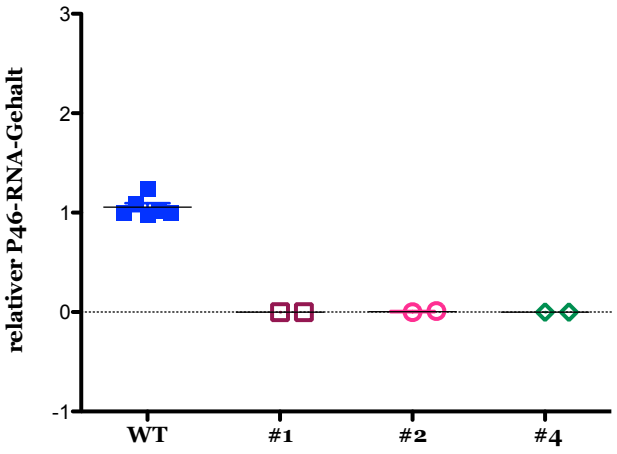


Abb. 3.3: Bestimmung des P46-RNA-Gehalts von L.mj WT und L.mj P46-Nullmutanten.

Es wurde jeweils die Gesamt-RNA aus $1x10^8$ Promastigoten von L.mj WT bzw. L.mj *P46-/-* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als *template* in die qRT-PCR eingesetzt unter Verwendung P46-spezifischer Starter.
Die Abb. zeigt Einzelwerte und Mediane der Doppelbestimmungen für L. mj *P46-/-* und der Sechsfachbestimmung für L.mj WT.

Aus den Ergebnissen beider Versuche geht hervor, dass *P46* in *L. major* 5ASKH vollständig deletiert wurde. Damit wurde die P46-Nullmutante bestätigt und für weitere Versuche zur Analyse der P46-Deletion eingesetzt.

3.1.3 Analyse der Zellmorphologie und der Wachstumskinetik der P46-Nullmutanten

Um die Funktion von P46 näher zu beleuchten, untersuchte ich in der nun folgenden Phänotypanalyse von P46-Nullmutanten die Auswirkungen des P46-Verlustes auf die Morphologie, Viabilität und Infektiosität der Parasiten.

Als erstes wurde die Zellmorphologie der *L. major P46-/-* Parasiten untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach Giemsa (Giemsa, 1902, 1905, 1907) gefärbt und mikroskopisch analysiert.

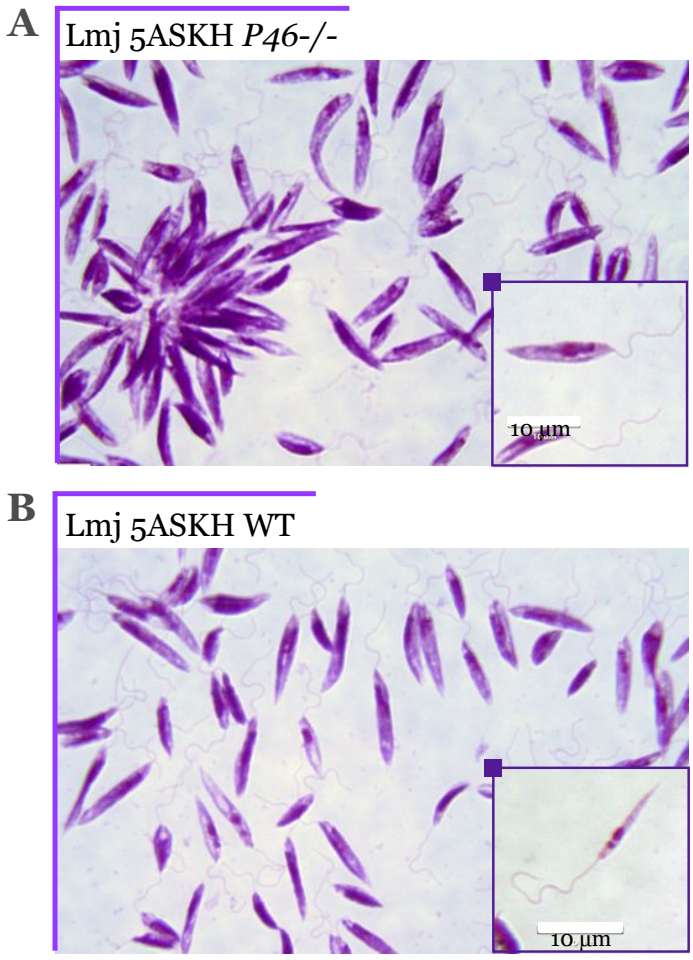


Abb. 3.4: Morphologie der P46-Null-mutanten.

Promastigoten von L.mj *P46-/-* (**A**) oder L.mj WT (**B**) wurden fixiert, nach Giemsa gefärbt und im Hellfeld mikroskopisch (100x) untersucht. Die Ausschnitte zeigen einzelne Zellen und die Größenbalken (10 µm).

Die Analyse der Zellmorphologie ergab keine Auffälligkeiten für die *L. major P46-/-* Promastigoten. Sowohl *L. major P46-/-* Promastigoten (Abb. 3.4 A) als auch *L. major* WT Promastigoten (Abb. 3.4 B) sind gleich stark angefärbt, was auf ähnliches intrazelluläres Milieu schließen lässt. Der Vergleich mit *L. major* WT zeigt, dass die P46-Deletion keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie der promastigoten Leishmanien hat.

Als nächstes wurde die Proliferationskinetik verglichen, um zu überprüfen ob die P46-Nullmutante Wachstumsdefizite aufweist. Dazu wurden je $1x10^6$ Z mL^{-1} eingesät. Nachfolgend wurden die Zellzahlen täglich bestimmt. Das Auftragen der Zellzahlen gegen den Messzeitraum ergab die Wachstumskinetik der untersuchten *L. major P46-/-* Klone im Vergleich zu *L. major* WT (Abb. 3.5).

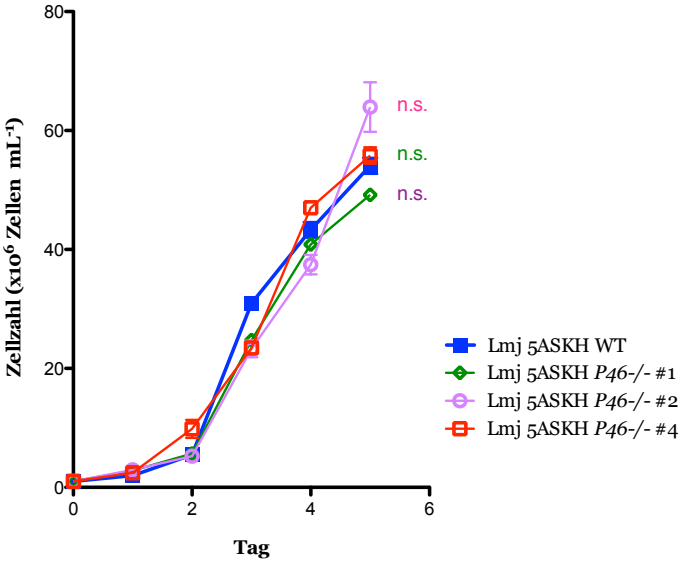


Abb. 3.5: Wachstumskinetik von L.mj *P46-/-*.

Promastigote L.mj WT und L.mj *P46-/-* Klone 1, 2 und 4 wurden mit einer Zelldichte von 1x10^6 Z mL^{-1} eingesät und 5 Tage lang inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte täglich.
n=4, Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. n.s. = Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (U-Test).

Die *P46-/-* Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein nicht unterscheidbares Wachstum. Somit wird P46 weder für die Erhaltung der Zellmorphologie noch für die Proliferation der Promastigoten benötigt.

Die Tatsache, dass die P46-Allele problemlos ausgetauscht werden konnten, sowie die Ergebnisse der ersten Phänotyp-Analysen zeigen, dass P46 im Promastigotenstadium des Parasiten – zumindest in *in vitro* Kultur – nicht benötigt wird.

3.1.4 Charakterisierung der P46-Nullmutanten *in vivo*

Leishmanien durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus, dessen Stadien mit unterschiedlichen Umweltbedingungen und damit Anforderungen an den Parasiten verbunden sind, was sich in alterierender Proteinbiosynthese und Morphologie niederschlägt. Amastigoten unterliegen somit anderen Anforderungen als Promastigoten. Da P46 bereits eine Rolle als Virulenzfaktor zugewiesen wurde (Reiling et al., 2010), ist ein Phänotyp der Nullmutanten im Amastigotenstadium sehr wahrscheinlich.

Um dies zu untersuchen, wurden Wildtyp-Zellen und P46-Nullmutanten einer *in vivo* Passage in BALB/c Mäusen unterzogen. *L. major* WT bzw. *L. major P46-/-* wurden in den rechten, hinteren Fuß inokuliert. Nachfolgend wurde die Fußdicke wöchentlich gemessen (Abb. 3.6).

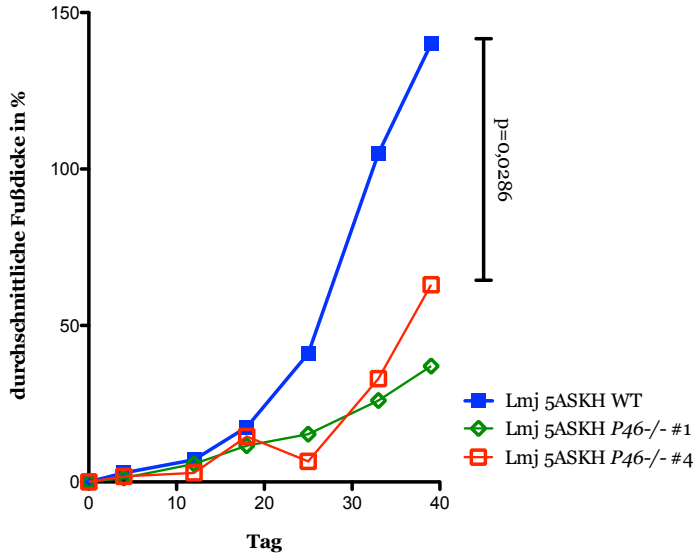


Abb. 3.6: Erreger-Passage von L.mj WT oder L.mj *P46-/-* in BALB/c-Mäusen.

Weibliche BALB/c Mäuse wurden jeweils mit $2x10^6$ L.mj WT (n=4), L.mj *P46-/-* #1 oder #4 (n=2) am rechten, hinteren Fußballen inokuliert. Die Schwellung wurde wöchentlich gemessen und als prozentuale Fußdickenzunahme dargestellt.
*=p<0,05 (U-Test)

Während die Infektionen mit *L. major* Wildtyp innerhalb von 21 Tagen zu einer progressiven Fußschwellung führten, zeigten beide *L. major P46-/-* Mutanten einen, gemessen an den Fußschwellungen, abgeschwächten Infektionsverlauf. Mit *L. major* WT infizierte Mäuse entwickelten zudem nach 40 Tagen Anzeichen ulzerierender Läsionen. Ulzerationen waren nach Infektion mit *L. major P46-/-* nicht zu beobachten. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und Nullmutanten sind signifikant und zeigen die Bedeutung von P46 für die Pathogenese auf.

Zur Bestimmung der Parasitenlast und zur Rückgewinnung der passagierten Parasiten wurden die infizierten Mäuse nach 40 Tagen euthanasiert. Aus dem Läsionsgewebe wurden die Parasiten *in vitro* angezüchtet und für spätere Verwendung kryogenisch konserviert. Außerdem wurde der den Fuß drainierende popliteale Lymphknoten (Abk., popLK, Kniekehlenlymphknoten) herauspräpariert und zur Isolierung von genomischer DNA eingesetzt. Durch qRT-PCR wurden aus dem gDNA-Gemisch *Leishmania*- und Maus-Aktin-Gene amplifiziert. Durch Normalisierung des *Leishmania*-Aktin-DNA-Gehaltes gegen den Maus-Aktin-DNA-Gehalt in der isolierten gDNA konnte die Parasitenlast in den popLKs semiquantitativ bestimmt werden (Abb. 3.7).

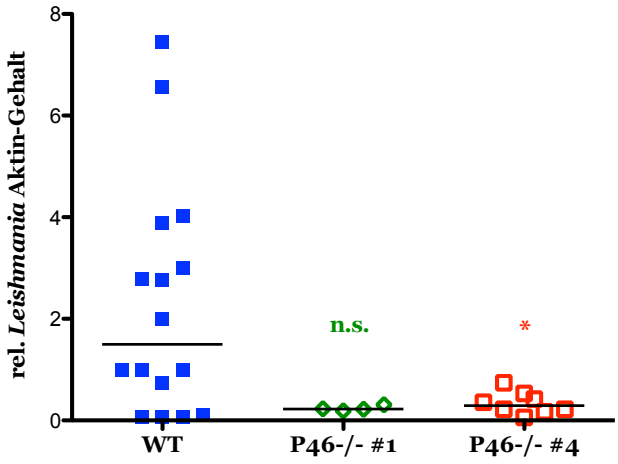


Abb. 3.7: Parasitenlast in den popLKs infizierter Mäuse

Aus den poplitealen Lymphknoten infizierter Mäuse wurde gDNA isoliert und für eine qRT-PCR zur relativen Quantifizierung von Maus- und L.mj-Aktin eingesetzt. Durch die Normalisierung des *Leishmania*-Aktin-DNA-Gehaltes gegen den Maus-Aktin-DNA-Gehalt konnte die relative Parasitenlast in den popLKs bestimmt werden.
Die Abbildung zeigt jeweils den Median der Werte für die Parasitenlast nach Infektion mit L.mj WT (**WT,** n=4), L.mj *P46-/-* #1 (**P46-/- #1,** n=1) und #4 (**P46-/- #1,** n=2). n.s.= nicht signifikant, * = p<0,05 (U-Test)

Das Ausmaß der Fußschwellung spiegelt die Parasitenlast in den Lymphknoten infizierter Mäuse wider. Die größte Parasitenlast wird durch *L. major* WT verursacht, während die P46-Nullmutanten nur in ca.10-fach geringerer Zahl in den Lymphknoten persistierten.

Aus beiden Ergebnissen geht hervor, dass die P46-Nullmutante eine verminderte Infektiosität in Mäusen besitzt.

3.2 Die Komplementierung der P46-Deletion

Für umfangreiche Analysen von Protein-Nullmutanten wird die Gen-Deletion durch eine episomale Genkopie kompensiert, wodurch sich der bestehende Phänotyp wieder dem WT angleichen sollte.

Für die episomale Expression von *P46* in L.mj *P46-/-* (L.mj *P46-/-/+*) wurde ein neuer Vektor (pEB3S) hergestellt, in dem das P46-Gen zwischen die P46-UTRs integriert wurde (pEB3S-P46). L.mj WT und L.mj *P46-/-* (#4) wurden mit diesem Plasmid transfiziert.

Zunächst wurde die *P46*-Expression auf RNA-Ebene überprüft: Dazu wurde die gesamte RNA aus den *Leishmania* Kulturen – L.mj WT, L.mj WT [pEB3S-p46] (*P46+/+/+*), L.mj *P46-/-* (#4), L.mj *P46-/-* (#4) [pEB3S-p46] (*P46-/-/+*) – isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurde anschließend für eine qRT-PCR mit P46-spezifischen Oligonukleotid-primern eingesetzt, um den relativen P46-RNA-Gehalt zu bestimmen (Abb. 3.8).

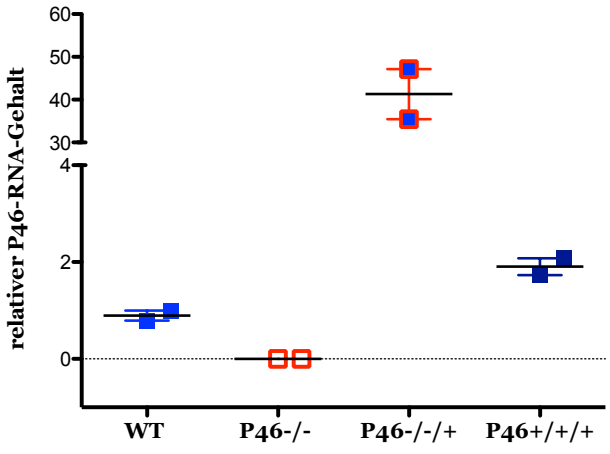


Abb. 3.8: Quantifizierung der P46-RNA in Promastigoten.

Die RNA wurde aus L.mj **WT**, L.mj ***P46-/-***, L.mj *P46-/-* [pEB3S-p46] (**P46**-/-/+), L.mj [pEB3S-p46] (**P46**+/+/+) isoliert und in cDNA umgeschrieben. *P46* wurde mit spezifischen Oligonukleotiden durch qRT-PCR amplifiziert und über die Interkalation von SYBR Green quantifiziert. Die Werte wurden durch den *Leishmania* Aktin-RNA-Gehalt normalisiert und die Mittelwerte der Doppelbestimmungen inkl. Standardabweichungen in der Abbildung dargestellt.

Zunächst bestätigte sich, dass die Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp keine P46-RNA enthält. In L.mj *P46-/-/+* wird das episomale *P46* 40fach stärker exprimiert als im Wildtyp. In L.mj *P46+/+/+* führt die episomale Überexpression lediglich zu einer zweifachen Verstärkung der *P46*-Expression. Die Gründe für die starke Überexpression in der Nullmutante sind nicht bekannt.

Mit diesem Ergebnis wurde zunächst eine P46-Expression in transfizierten Zellen nachgewiesen. Weitere *in vivo* und *ex vivo* Infektions-Experimente sollten den Effekt dieser Überexpression auf L.mj *P46-/-* zeigen.

3.2.1 Charakterisierung von L.mj *P46-/-/+ in vivo* und *ex vivo*

Um zu überprüfen, ob die P46-Transgene die verringerte Infektiosität von *L. major P46-/-* aufheben kann, wurden die Parasiten in zwei unabhängigen Versuchen in BALB/c Mäusen passagiert. Die Fußschwellung wurde wöchentlich dokumentiert (Abb. 3.9 A&B)

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Inkubation der L.mj *P46-/-/+* mit Nurseothricin zur Stabilisierung der episomalen P46-Expression einen Einfluss auf die Infektiosität

der Parasiten im Mausmodell nimmt, wurden sowohl L.mj WT als auch L.mj *P46-/-* für den Vergleich mit dem P46-Expressionsvektor mit dem leeren Vektor (pEB3S) transfiziert. Die Parasiten wurden anschließend einer Passage in der BALB/c Maus unterzogen (Abb. 3.9 B).

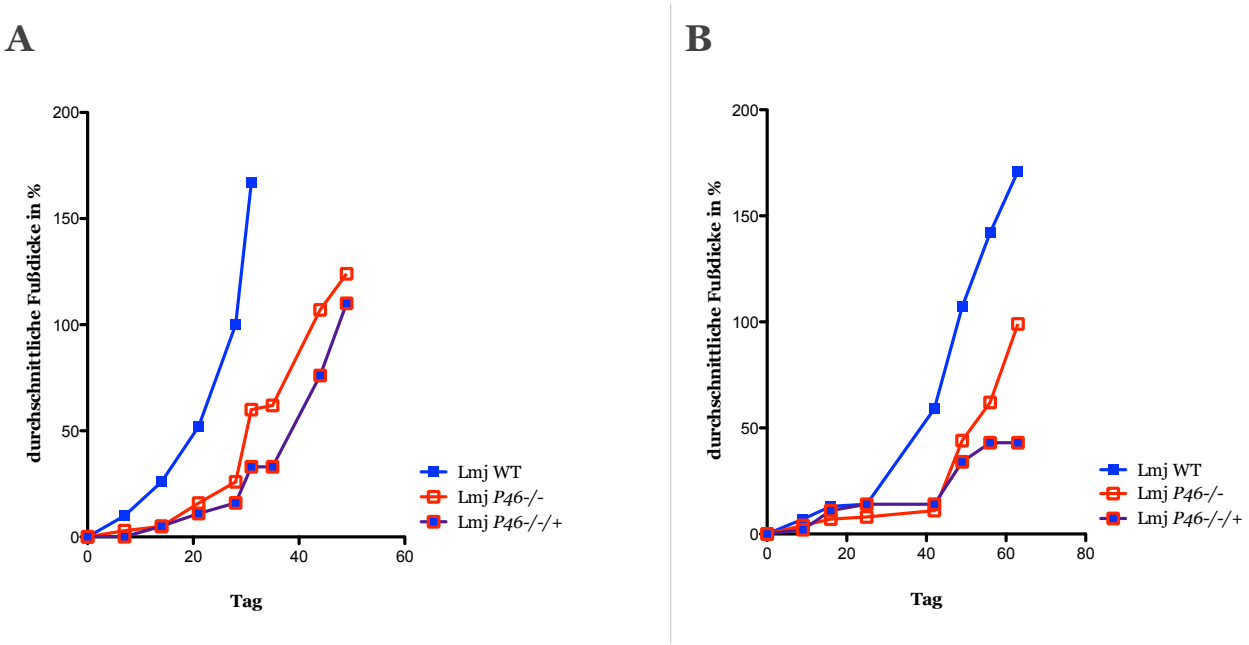


Abb. 3.9: Passage der rekonstituierten P46-Nullmutanten.

A: BALB/c Mäuse (n=5) wurden mit je 2x10^6 L.mj WT, L.mj *P46-/-* #4 und L.mj *P46-/-/+* inokuliert. Die Fußschwellung wurde in einem Zeitraum von 50 Tagen wöchentlich gemessen.
B: BALB/c Mäuse (n=4) wurden mit je 2x10^6 L.mj [pEB3S], L.mj *P46-/-* #4 [pEB3S] und L.mj *P46-/-/+* inokuliert. Die Fußschwellung wurde in einem Zeitraum von 63 Tagen wöchentlich gemessen.
Beide Abbildungen zeigen die durchschnittliche, prozentuale Zunahme der Fußdicke. Die Unterschiede sind nicht signifikant (U-Test).

Es zeigt sich, dass der Infektionsverlauf in beiden Versuchen ähnlich abläuft, mit einer rapiden Fußdickenzunahme bei Infektion mit *L. major* WT und einer verzögerten Zunahme bei Infektion mit L.mj *P46-/-* und L.mj *P46-/-/+*. In der ersten Mauspassage (Abb. 3.9 A) nimmt die Fußdicke bei den *L. major* WT-infizierten Mäusen bereits nach 20 Tagen um 50% zu, während in der zweiten Mauspassage dieselbe Fußdickenzunahme erst nach Tag 40 erreicht ist (Abb. 3.9. B). Auch bei den *in vivo* Passagen von L.mj *P46-/-* und L.mj *P46-/-/+* ist eine ähnlich verzögerte Fußdickenzunahme bei den Mäusen zu beobachten. Die Inkubation der Parasiten mit Nurseothricin vor dem Infektionsversuch scheint tatsächlich einen Einfluss auf die Infektiösität der Parasiten *in vivo* zu nehmen. Allerdings ist der Effekt nicht aufgehoben, sondern nur verzögert.

Die Expression von *P46* in P46-Nullmutanten (*P46-/-/+*, rot umrandete, blaue Quadrate) kann die Infektiosität des Parasiten *in vivo* nicht wieder herstellen. Die Parasiten büßen im Vergleich zu den P46-Nullmutanten sogar leicht an Infektiosität ein, was sich bei der zweiten (Abb. 3.9 B) Mauspassage deutlicher zeigt als in der ersten (Abb. 3.9 A).

Zur Bestimmung der Parasitenlast in den Lymphknoten und zur Rückgewinnung der passagierten Parasiten wurden die Mäuse euthanasiert und die popLKs herauspräpariert. Passagierte Leishmanien wurden aus den Füßen angezogen und für spätere Versuche kryogenisch verwahrt. Die popLKs aus *L. major* WT-infizierten Mäusen waren im Durchschnitt um 0,041 mg schwerer verglichen mit naiven popLKs. Die popLKs aus Mäusen infiziert mit L.mj *P46-/-* oder L.mj *P46-/-/+* waren durchschnittlich um 0,036 mg bzw. 0,028 mg schwerer (Daten nicht gezeigt). Aus den popLKs wurde genomische DNA isoliert und mit *Leishmania*-Aktin spezifischen Startern in einer qRT-PCR eingesetzt (Abb. 3.10).

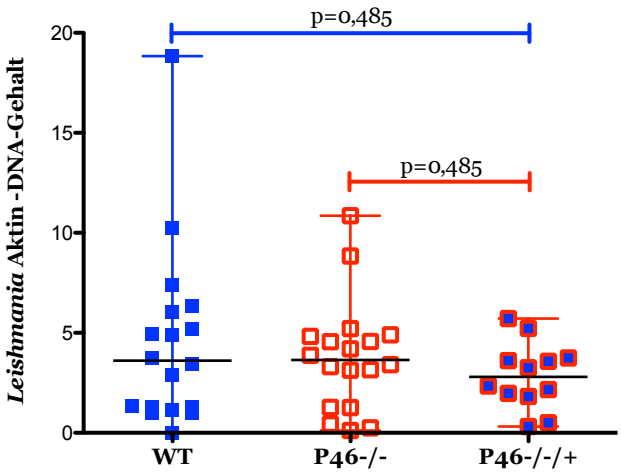


Abb. 3.10: Parasitenlast in den popLKs infizierter Mäuse.

Die Abbildung zeigt die Parasitenlastbestimmung kombiniert aus beiden Infektionsversuchen (Abb. 3.9 A&B).
Mit L.mj WT (**WT**), L.mj *P46-/-* (**P46-/-**) und L.mj *P46-/-/+* (**P46-/-/+**) infizierte Mäuse wurden zur Entnahme der poplitealen Lymphknoten euthanasiert. Die gDNA aus den LKs wurde isoliert und in eine qRT-PCR eingesetzt. Durch die Normalisierung des *Leishmania*-Aktin-DNA-Gehaltes gegen den Maus-Aktin-DNA-Gehalt konnte die relative Parasitenlast in den popLKs bestimmt werden. Dargestellt ist jeweils der Median und die Standardabweichung der ermittelten Werte für den relativen Gehalt an *Leishmania* Aktin-DNA für L.mj WT (**WT,** n=9), L.mj *P46-/-* #4 (**P46-/-,** n=9) und L.mj *P46-/-/+* (**P46-/-/+,** n=6). Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (p=0.485, t-Test).

Die Parasitenlast in den popLKs infizierter Mäuse variiert nur schwach. Obwohl *L. major* WT eine stärkere Fußschwellung hervorruft als *L. major P46-/-* (Abb. 3.9 A&B), ist die Pa-

rasitenlast in den drainierenden Lymphknoten vergleichbar. Es erscheint daher möglich, dass die P46-Nullmutante durch die vorherige Passage bereits eine genetische Anpassung erfahren hat, die zur Wiederherstellung der Infektiosität führt. *L. major P46-/-/+* verursacht eine geringere Fußschwellung bei BALB/c Mäusen und zugleich eine geringere Parasitenlast. Trotz der geringeren Infektiosität von *L. major P46-/-/+* führt die Infektion mit diesem Parasiten zu verstärkter Läsionsbildung bei Mäusen (persönliche Beobachtung). Dieser destruktive Phänotyp ist möglicherweise auf Überexpression von P46 in L.mj *P46-/-/+* zurückzuführen.

Um die Proliferation der genetisch veränderten *L. major* Parasiten in ihren Zielzellen, den Makrophagen, zu überprüfen, wurden diese für eine *ex vivo* Infektion von primären Knochenmarksmakrophagen (engl. **b**one **m**arrow derived **m**acrophages, **BMM**s) eingesetzt. Nach der Infektion wurden die Makrophagen fixiert und die Parasitenzahl pro Makrophage bestimmt (Abb. 3.11 B).

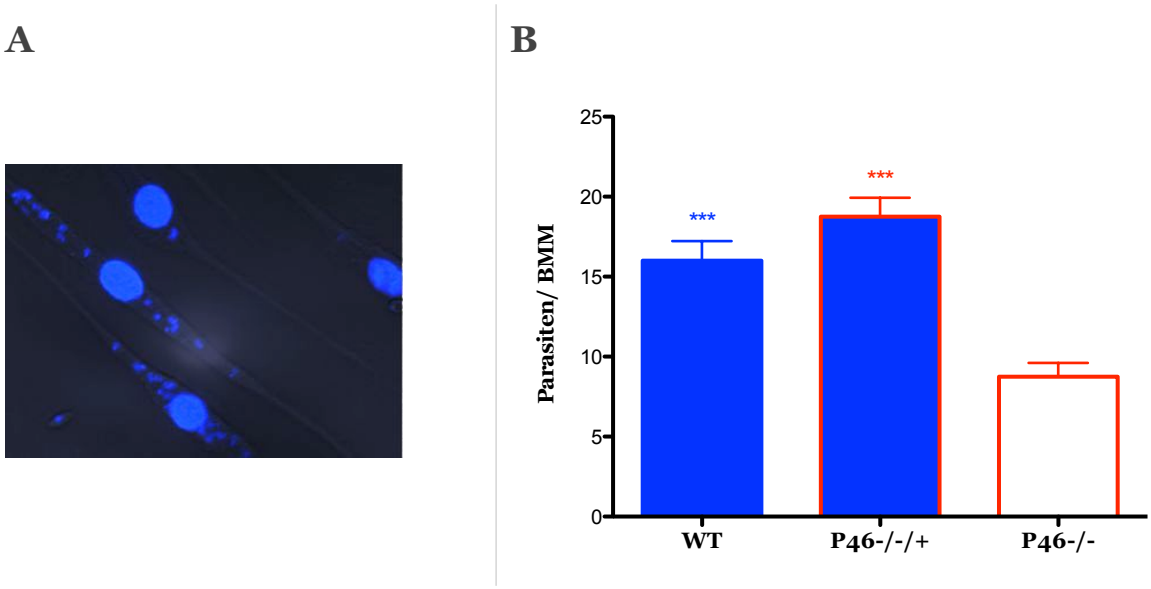


Abb. 3.11: Infektion von *ex vivo*-Knochenmarksmakrophagen mit rekonstituierten P46-Nullmutanten.

Makrophagen aus C57BL/6 Mäusen wurden im Verhältnis 1:10 mit L.mj WT (**WT**), L.mj *P46-/-* (**P46-/-**) oder L.mj *P46-/-/+* (**P46-/-/+**) infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Makrophagen fixiert und nukleinsäurehaltige Organellen über DAPI-Interkalation sichtbar gemacht (**A**). Die intrazelluläre Parasitenzahl wurde für je 50 Makrophagen bestimmt (n=4) (**B**). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. *** = p≤ 0,001 (t-Test).

Leishmanien liegen nach einer Infektion der BMMs als Amastigoten im Zytoplasma der Zellen vor (Abb. 3.11 A). Im Gegensatz zur *in vivo* Infektion (Abb. 3.9) zeigt *L. major*

P46-/-/+ in der *ex vivo* Infektion eine signifikant höhere intrazelluläre Parasitenlast als *L. major P46-/-* und sogar als *L. major* WT.

Da sich die Parasitenlast für *L. major P46-/-/+* in Mäusen von der in isolierten Zellen (BMMs) unterscheidet, deuten die Ergebnisse aus Abb. 3.9 und Abb. 3.11. auf das Wirts-Immunsystem als Interaktionspartner für P46 hin.

3.3 P46 und Exosomen

Virulenzfaktoren werden von Pathogenen für ihre Etablierung im Wirt und die Modulierung des Wirt-Immunsystems genutzt. Auch *Leishmania* spp. sekretieren Proteine in die Wirtszellen unter anderem zur Deaktivierung von Abwehrmechanismen. Silverman *et al*. konnten 2010 zeigen, dass der Großteil der von Leishmanien ausgeschleusten Moleküle in Exosomen verpackt in den Makrophagen gelangen. Die Simulation der Wirtszell-Umgebung (37°C, pH 5.5) *in vitro* führte bei den Parasiten zu einer vermehrten Exosomenfreisetzung. Die Inkubation von Makrophagen mit den freigesetzten Exosomen veränderte selektiv das Interleukin-Profil des Makrophagen zu Gunsten des Parasiten (Silverman et al., 2010a; Silverman et al., 2010b).

Reiling *et al*. (2010) zeigten weiterhin, dass P46 im Zytosol eines infizierten Makrophagen zu finden ist. Ob P46 als Virulenzfaktor ebenfalls in der Exosomenbeladung zu finden ist, sollte im Folgenden untersucht werden.

Für die vermehrte Freisetzung von Exosomen wurden *L. major* Promastigoten 24 Stunden bei 37°C im serumfreien Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Überstand getrennt, aus dem durch mehrmalige Zentrifugationsschritte die Exosomen gewonnen wurden (Abb. 3.12).

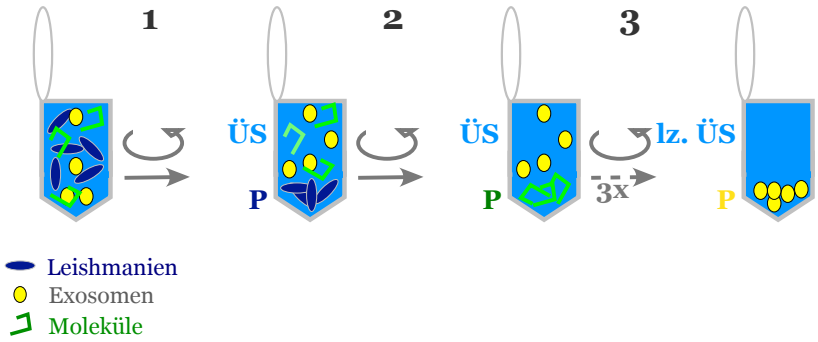


Abb. 3.12: Schematische Darstellung einer Exosomenisolierung.

Leishmanien werden aus einer 37°C-Parasitenkultur sedimentiert (**1**). Zur Abtrennung von Molekülen und Zelltrümmern wird der parasitenfreie Überstand (**ÜS**) zentrifugiert (**2**). Der dritte Schritt (**3**) vereinigt insgesamt drei Zentrifugationsschritte: Eine Ultrafiltration (*MWCO* 10 000 Da) sowie die Exosomen-Aufreinigung über ein Saccharose-Kissen. Nach der letzten Ultrazentrifugation finden sich die Exosomen im Pellet (**P**). Der letzte Überstand (**lz.ÜS**) ist molekülfrei.

Zunächst wurden die Zellen nach Giemsa gefärbt und mikroskopisch analysiert (Abb. 3.13), um deren Integrität zu verifizieren.

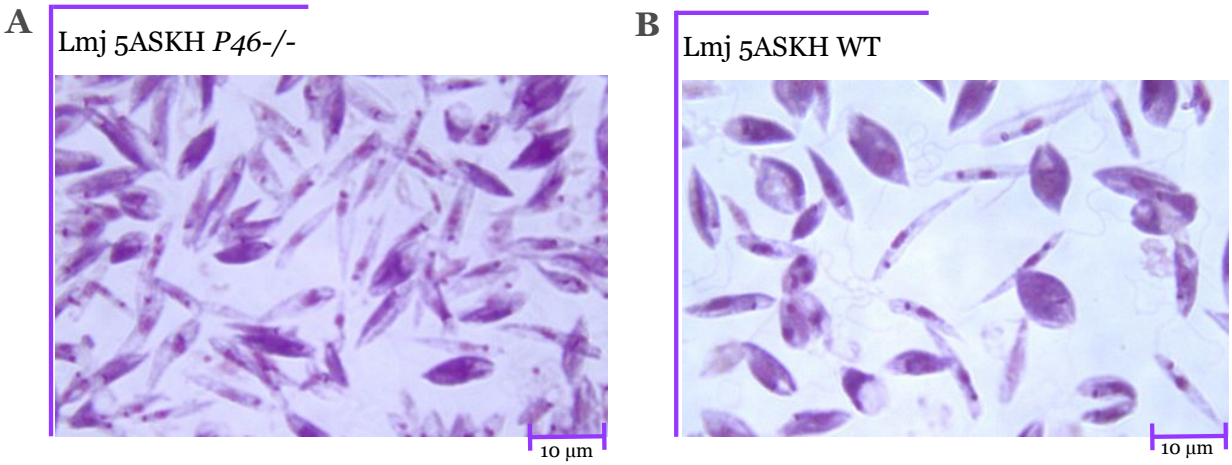


Abb. 3.13: Morphologie der Promastigoten nach Hitzestress.

Promastigoten von L.mj *P46-/-* (**A**) und L.mj WT (**B**) wurden nach 24h bei 37°C fixiert, nach Giemsa gefärbt und im Hellfeld mikroskopisch (100 x) untersucht. Ein Größenbalken von 10 µm ist gezeigt.

Da sich *L. major in vitro* bei 37°C nicht spontan in Amastigote umwandelt, zeigen beide Ausstriche promastigote Parasiten. Neben der gewohnten promastigoten Form sind in den Ausstrichen ebenfalls dunkel angefärbte, rundliche Zellen zu finden. Die Zellmorphologie hat sich durch die Stressfaktoren Hitzeschock (25°C -> 37°C) und Mangelmedium zwar verändert, jedoch bleiben Zellkern und Kinetoplast intakt, was für lebende Zellen spricht.

Um zu überprüfen, ob die Temperatur für die vermehrte Freisetzung von Exosomen bei diesem Versuch entscheidend ist, wurden die Parasitenkulturen jeweils bei 37°C und 25°C in serumfreiem Medium gehalten. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen getrennt und eingeengt. Sowohl die sedimentierten Zellen als auch der eingeengte Überstand wurden auf den Gehalt von Hsp90 und Hsp100 hin überprüft (Abb. 3.14).

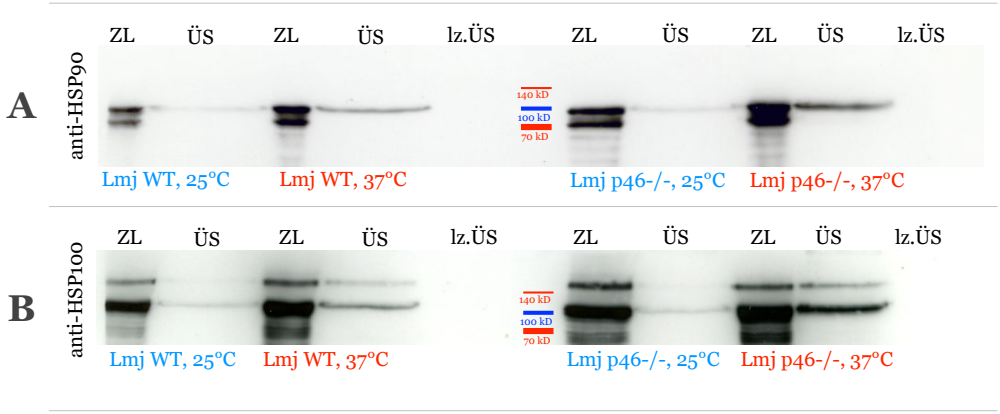


Abb. 3.14: Der Effekt der Umgebungstemperatur auf die Sekretion von Hsp90 und Hsp100 aus *L. major*.

L.mj WT und L.mj *P46-/-* wurden für 24h bei je 37°C bzw. 25°C inkubiert. Hsp90 und Hsp100 wurden anschließend sowohl im Kulturüberstand als auch in den Zellsedimenten durch Immunoblot nachgewiesen.

Leishmanien sekretieren tatsächlich Proteine (Abb. 3.14 A&B). Die Proteinbanden der 37°C-Überstände sind intensiver als die der 25°C-Überstände. Dieses Verhältnis gilt allerdings auch für die Proteinbanden der Zelllysate. Im letzten Überstand der Exosomenisolierung (Abb. 3.12) waren keine Proteine mehr nachweisbar, was gegen freie Proteine in der Fraktion spricht.

Ob es sich beim Sediment um membranumschlossene Vesikel handelt, wurde in einem Experiment nach Silverman *et al.*, 2010a überprüft. Dafür wurde *L. major P46-/-* für 24h bei 25°C oder bei 37°C gehalten. Aus den Überständen wurden Exosomen isoliert und auf drei Proben aufgeteilt. Je zwei Proben wurde Trypsin oder Trypsin im Beisein von TritonX-100 zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde in den Proben Hsp90 nachgewiesen (Abb. 3.15).

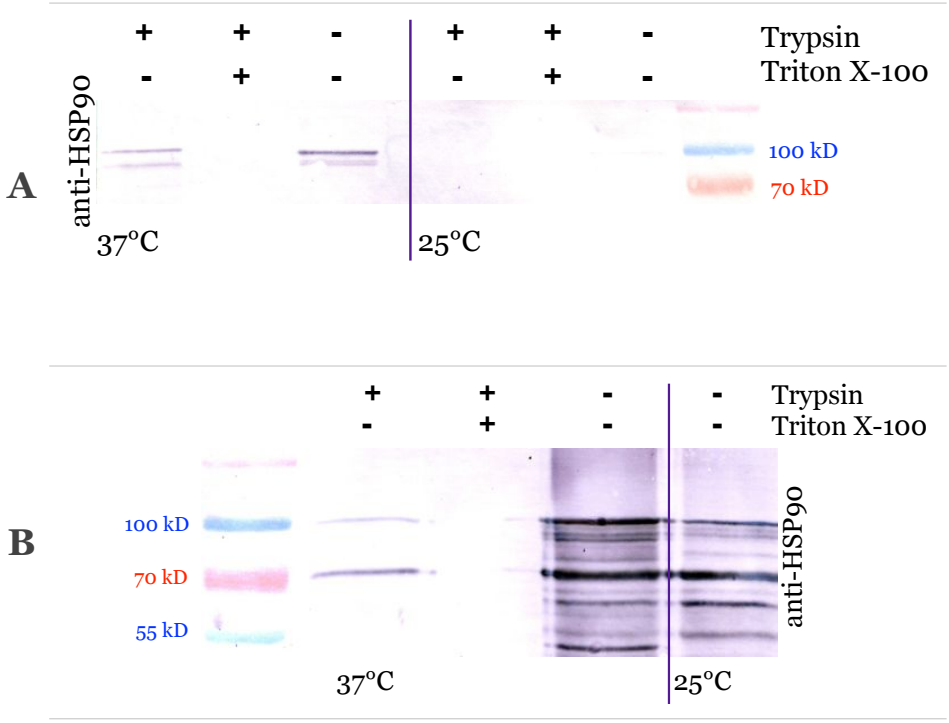


Abb. 3.15: Nachweis von Hsp90 als Indikator für einen Membranumschluss.

L.mj *P46-/-* Promastigoten wurden für 24h bei 37°C bzw. 25°C inkubiert. Die Parasiten wurden sedimentiert, aus dem Überstand wurden Exosomen aufgereinigt. Exosomen (**A**) und sedimentierte Zellen (**B**) wurden mit Trypsin allein oder mit Trypsin im Beisein von Triton-X100 (zur Zerstörung etwaiger Membranen) behandelt. Anschließend wurden alle Proben auf den Exosomenmarker Hsp90 getestet.

Trypsin, eine Peptidase, spaltet alle Proteine und somit auch Hsp90. Ist das Protein nicht durch eine Membran vor Trypsin geschützt, sollte es nach einem Trypsinverdau nicht mehr nachweisbar sein. Die Zerstörung der schützenden Membran wurde durch Zugabe des Detergenz Triton-X100 bewirkt.

Wie in Abb. 3.15 A&B gezeigt, war Hsp90 sowohl in den Vesikel-Proben als auch in Leishmanien nach einer Behandlung mit Triton-X100 und Trypsin nicht mehr nachweisbar. Trypsin allein konnte Hsp90 nichts anhaben, was einen Membranumschluss beweist.

In der Exosomenpräparation aus einer 25°C-Kultur war Hsp90 nicht nachweisbar, was für eine verminderte Exosomenfreisetzung spricht. In den Zellen dieser Kultur war Hsp90 nur geringfügig schwächer nachweisbar als in den Zellen aus der 37°C-Kultur. Eine variierende Parasitenzahl war demnach nicht für die verminderte Exosomenfreisetzung verantwortlich.

Für eine tatsächliche Abbildung der Exosomen wurden diese nach der Aufreinigung über Saccharose für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) präpariert. Nachfolgend wurden die Exosomen am REM dokumentiert (Abb. 3.16).

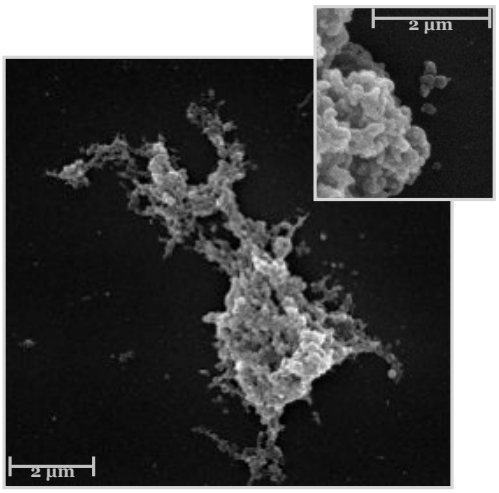


Abb. 3.16: REM-Bilder von isolierten Exosomen

Exosomen wurden aus dem Überstand einer L.mj WT-Kultur aufgereinigt, für die Mikroskopie präpariert und am Rasterelektronenmikroskop dokumentiert. Größenbalken = 2 µm

Die REM-Analyse der Exosomenpräparate ergab großflächig zusammenhängende Partikel, die eine runde, vesikuläre Form aufweisen. Orientiert an dem Größenbalken sind diese Vesikel nicht größer als 100 nm. Diese Größe wurde bereits mehrfach für Exosomen gezeigt (Pan et al., 1985; Raposo et al., 1997; Silverman et al., 2010b; Thery et al., 2009; Twu et al., 2013).

Nach dem Nachweis von Exosomen wurde deren Ladung auf P46 hin analysiert (Abb. 3.17). Ein wichtiger Faktor für die Exosomenbeladung ist Hsp100, dem wie P46 eine Rolle als Virulenzfaktor zugewiesen wurde, da L.mj Hsp100-Nullmutanten *in vitro* zwar lebensfähig, *in vivo* jedoch avirulent waren (Clos and Krobitsch, 1999; Hübel et al., 1997; Silverman et al., 2010b). Aus Hsp100-Nullmutanten isolierte Exosomen zeigten eine von Wildtyp-Exosomen abweichende Proteinzusammensetzung (Silverman et al., 2010b). Ob die Exosomenbeladung mit P46 von dem Virulenzfaktor Hsp100 abhängig ist, wurde ebenfalls im folgenden Experiment überprüft (Abb. 3.17).

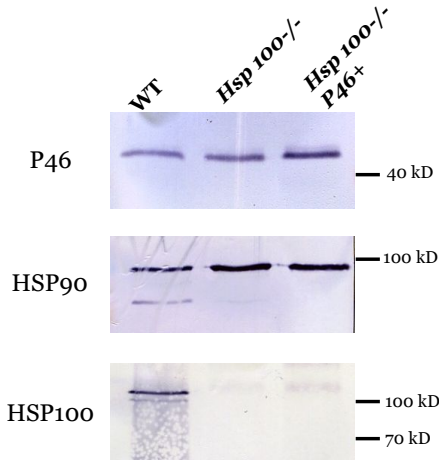


Abb. 3.17: Die Beladung der Exosomen

Aus den Kulturüberständen von L.mj WT, L.mj Hsp*100-/-* und L.mj Hsp*100-/- P46+* wurden Exosomen aufgereinigt; nachfolgend wurde ihre Beladung auf den Gehalt an P46, Hsp90 oder Hsp100 hin überprüft.
Die Postione von Proteingrößenmarkern ist jeweils am Rand in kD angegeben.

P46 konnte in der Beladung von Exosomen aus L.mj WT, L.mj *Hsp100-/-* und L.mj *Hsp100-/- P46+* nachgewiesen werden. In den Exosomenpräparationen aus L.mj *Hsp100-/-* mit episomalem *P46* (*P46+*) ist die Intensität der Proteinbande stärker. Die Beladung von Exosomen mit P46 ist von Hsp100 unabhängig, da P46 in Exosomen aus beiden Hsp100-Nullmutanten nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.17, oben). Hsp90, das sowohl als Beladungskontrolle als auch als Exosomenmarker genutzt wurde, konnte in gleicher Intensität in allen Exosomenpräparationen nachgewiesen werden.

Die *ex vivo* Infektion von BMMs und ihre Behandlung mit Exosomen sollte nachfolgend zeigen, welche Wirkung P46 in den Exosomen auf die Parasiten-Wirtszellen hat. Dazu wurden BMMs vor der Infektion mit *L. major* WT mit Exosomen aus unterschiedlichen *L. major* -Kulturen inkubiert. Nach der Infektion wurden die BMMs fixiert und auf intrazelluläre Parasitenlast hin mikroskopisch ausgewertet (Abb. 3.18).

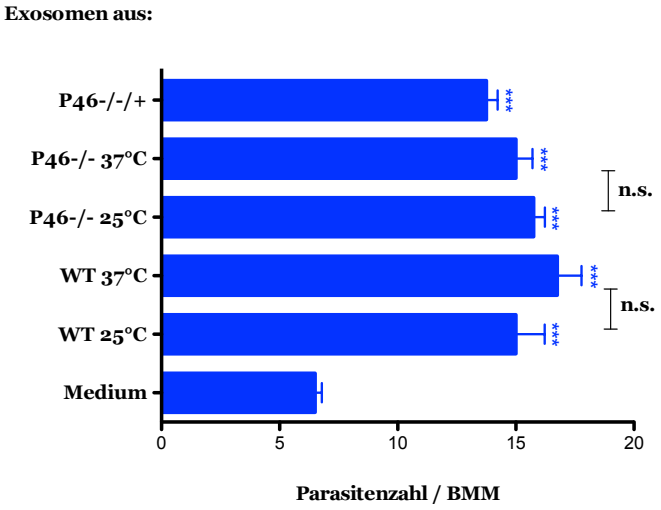


Abb. 3.18: Die Wirkung von Exosomen auf die Parasitenlast in BMMs.

Exosomen wurden aus den Kulturen von L.mj WT, L.mj *P46-/-* und L.mj *P46-/-/+* aufgereinigt und anschließend mit Makrophagen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Leishmanien-freies Medium der Exosomenpräparations-Prozedur unterzogen und die Präparation anschließend äquivalent zu den anderen Proben mit Makrophagen inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Makrophagen mit L.mj WT im Verhältnis 1:10 infiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde die intrazelluläre Parasitenzahl für je 50 Makrophagen bestimmt (n=4). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. *** = p≤ 0,001 (t-Test).

Aus der Infektionsanalyse geht hervor, dass bereits Exosomen allgemein die intrazelluläre Parasitenlast erhöhen. Dies geht aus dem Vergleich zwischen Makrophagen hervor, die vor der Infektion mit dem präpariertem Medium oder mit den präparierten Exosomen inkubiert wurden (Abb. 3.17). Die höchste Parasitenlast wird durch die Behandlung der Makrophagen mit den Exosomen aus *L. major* WT aus einer 37°C-Kultur erreicht. Der Verlust von P46 in der Exosomenbeladung hat einen moderaten Effekt auf die Parasitenlast in den BMMs. Der im Vergleich zu den anderen Exosomenpräparationen geringste pro-parasitische Effekt wird von den Exosomen aus der *L. major P46-/-/+* Kultur gezeigt. Dennoch ist die Parasitenlast in den BMMs nach dieser Exosomenbehandlung signifikant höher als bei der Kontrolle.

Wie schon bei den Infektionsexperimenten *in vivo* gezeigt, scheint sich die massive Überexpression von *P46* (Abb. 3.8; Abb. 3.9) nachteilig auf die Infektiosität des Parasiten auszuwirken.

3.4 Lokalisation von P46 in der Wirtszelle

Reiling *et al.* haben P46 im Zytoplasma eines infizierten Makrophagen nachgewiesen. Dieser Befund sollte in lebenden Zellen durch ein P46::mCherry (mCH) Fusionsprotein bestätigt werden.

Die Fusion eines Gens mit einem Reportergen kann sowohl am C- als auch am N-Terminus erfolgen. Je nachdem, welches Proteinende für die Funktion des Proteins entscheidend ist, wählt man den entgegengesetzten Terminus für die Fusion. Da die P46-Proteinsequenz keine bekannten Signalsequenzen aufweist, wurde P46 sowohl am C- als auch am N-Terminus mit mCH fusioniert.

P46 ist ein kleines Protein (420 AS), dessen Größe durch die Fusion an mCH (657 AS) annähernd um 50% verdoppelt wird. Ob die Fusion von P46 mit mCH einen Effekt in Promastigoten hat, wurde durch die Proliferationskinetik der Parasiten überprüft (Abb. 3.19 B).

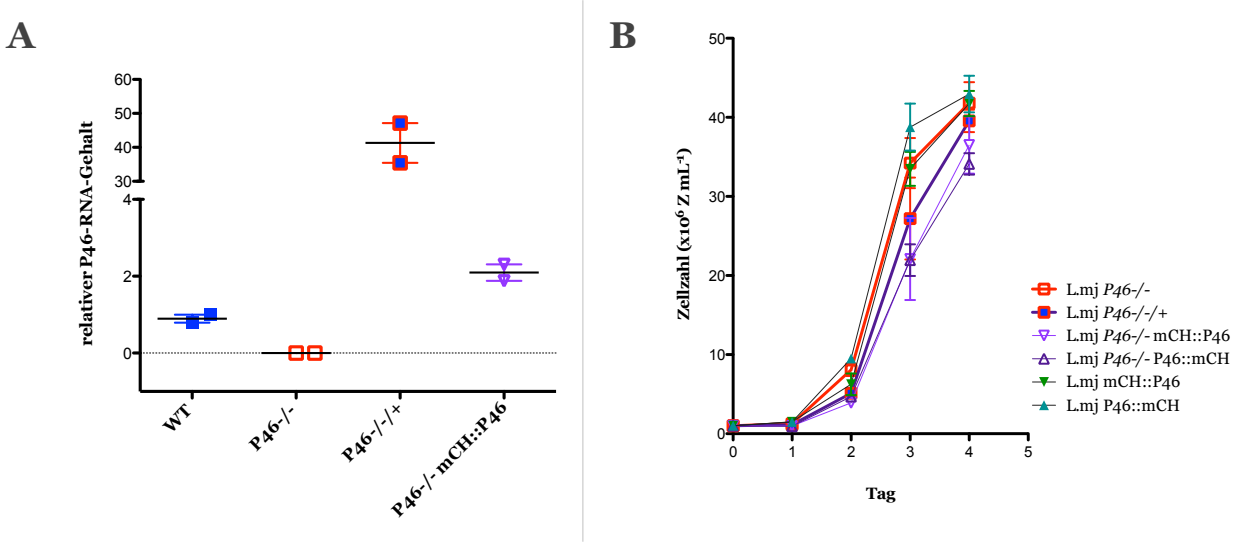


Abb. 3.19: mCH::P46 RNA-Gehalt (**A**) und die Proliferationskinetik transfizierter Parasiten (**B**).

(**A**) Es wurde jeweils die Gesamt-RNA aus L.mj *P46-/-* [mCH::P46], L.mj WT, L.mj *P46-/-*, L.mj*P46-/-/+* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als *template* für die qRT-PCR eingesetzt unter Verwendung P46-spezifischer Starter. Gezeigt sind Einzelwerte der Doppelbestimmungen inkl. Standardabweichungen.
(**B**) Promastigote L.mj *P46-/-*, L.mj *P46-/-* [P46::mCH], L.mj *P46-/-* [mCH::P46], L.mj *P46-/-/+* sowie L.mj WT [mCH::P46] und L.mj WT [P46::mCH] wurden mit einer Zelldichte von $1x10^6$ Z mL^{-1} eingesät, nachfolgend wurden die Zellzahlen über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich bestimmt. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (U-Test, nicht dargestellt).

Das Fusionsgen mCH::P46 wird in P46-Nullmutanten im Gegensatz zum episomalen *P46* nur etwa 2-fach verstärkt exprimiert (Abb. 3.19 A). Dies ist eine gute Ausgangsbasis für Folgeexperimente.

Die transfizierten Parasiten mit einem *P46-/-* Hintergrund weisen ein verlangsamtes Wachstum auf. Die Proliferation der Zellen ist jedoch stetig (Abb. 3.19 B) und *P46* wird

nachweislich in den P46-Nullmutanten exprimiert (Abb. 3.19 A). Daher wurden diese Parasiten für *ex vivo* Infektionen von BMMs eingesetzt.

Nach einer 24-stündigen Infektion der Makrophagen mit L.mj WT, L.mj *P46-/-* mCH::P46 oder L.mj *P46-/-* P46::mCH und anschließender Färbung mit dem Hoechst-Farbstoff wurden die Zellkerne und die Fusionsproteine Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert (Abb. 3.20).

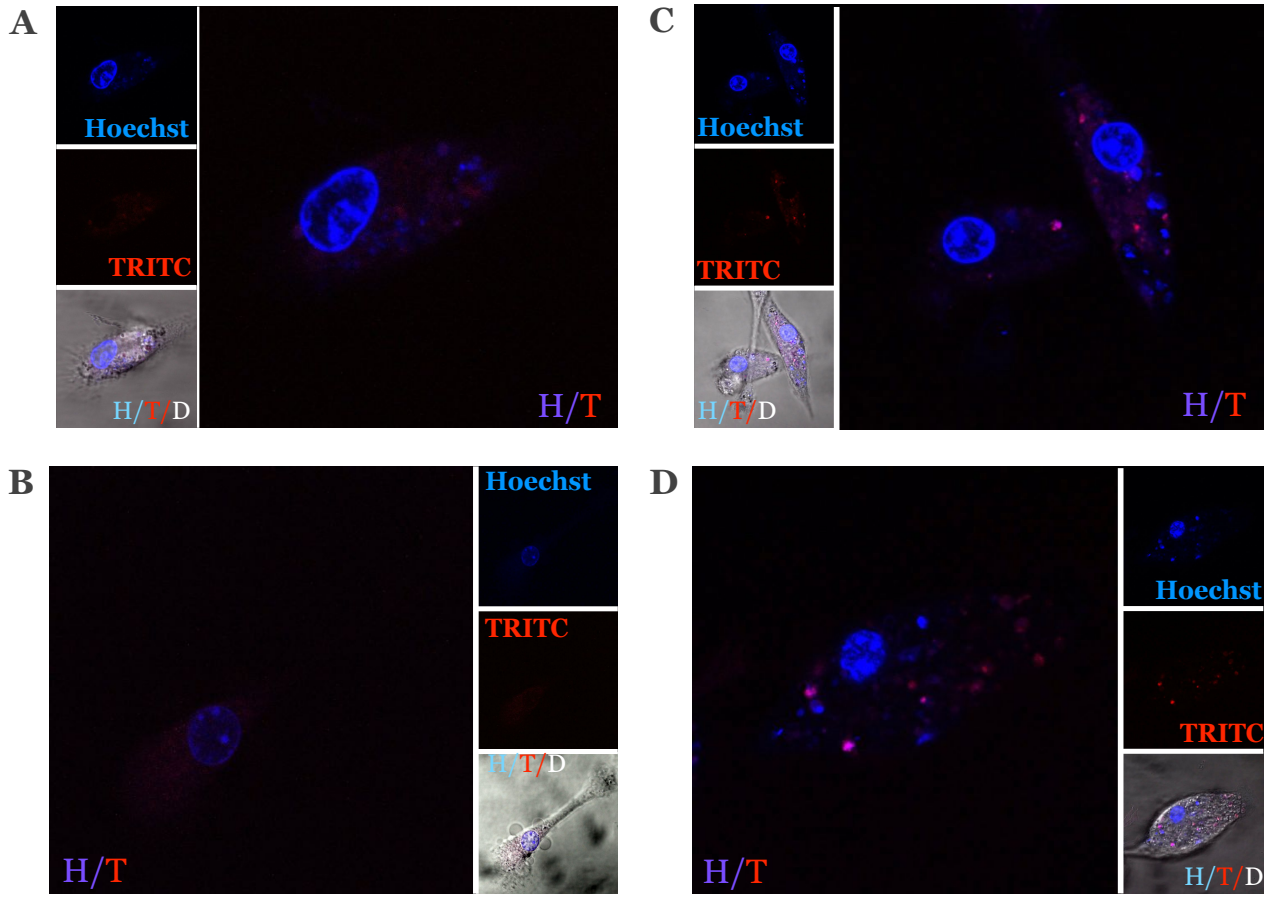


Abb. 3.20: Lebend-Zell-Mikroskopie von infizierten Knochenmarksmakrophagen.

Knochenmarksmakrophagen (BMMs) wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit L.mj WT (**A**), L.mj *P46-/-* mCH::P46 (**C**) oder L.mj *P46-/-* P46::mCH (**D**) infiziert. Eine uninfizierte BMM-Probe diente als Kontrolle (**B**). Nach Färbung mit Hoechst 33342 wurden die Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Bilder wurden bei Durchlicht (DIC) und bei DAPI- (405 nm) oder TRITC- (594 nm) Emission aufgenommen. Überlagerung der Kanäle erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ. H=Höchst, T=TRITC, D=Durchlicht

In BMMs, die mit L.mj *P46-/-* mCH::P46 (Abb. 3.20 C) oder L.mj *P46-/-* P46::mCH (Abb. 3.20 D) infiziert wurden, sind deutlich Akkumulationen von P46::mCH im Makrophagenzytoplasma zu erkennen, die nicht immer mit den intrazellulären Parasiten kolokalisieren.

In Gegensatz dazu sind in *L. major* WT-infizierten BMMs (Abb. 3.20 A) solche Signale nicht zu beobachten. Die Makrophagen scheinen eine leichte Eigenfluoreszenz im roten Bereich zu besitzen, wie in den nicht infizierten BMMs zu beobachten ist (Abb. 3.20 B). Allerdings ist dieses Signal diffus über die ganze Zelle verteilt und sehr schwach.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass P46 in lebenden Zellen tatsächlich in das Makrophagenzytoplasma transportiert wird und dort akkumuliert vorliegt.

Außerdem wurden mit L.mj *P46-/-* mCH::P46 und L.mj *P46-/-* P46::mCH infizierte Makrophagen nach 24h fixiert, um die intrazelluläre Parasitenlast zu bestimmen (Abb. 3.21).

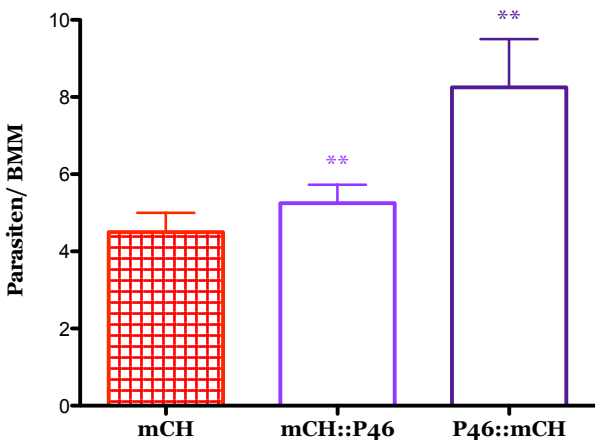


Abb. 3.21: Parasitenlast in infizierten *ex vivo* BMMs.

Knochenmarksmakrophagen wurden im Verhältnis 1:10 mit L.mj *P46-/-* [**mCH**], L.mj *P46-/-* [**mCH::P46**] oder L.mj *P46-/-* [**P46::mCH**] infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Makrophagen fixiert; anschließend wurde für je 50 Makrophagen die intrazelluläre Parasitenzahl bestimmt (n=4). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. ** = $p \leq 0{,}01$ (t-Test).

Die L.mj *P46-/-* P46::mCH verursachen eine signifikant höhere Parasitenlast in BMMs im Vergleich zu Parasiten, die mCherry allein exprimieren, oder im Vergleich zu L.mj *P46-/-* mCH::P46. Nach dem Ergebnis aus Abbildung 3.20 (C&D) scheint es für die Funktion von P46 belanglos zu sein, an welchem Terminus mCherry hängt, da beide Parasiten P46 in die Wirtszelle ausschleusen. Nach der Auswertung der intrazellulären Parasitenzahl jedoch wird deutlich, dass durch die Kopplung von mCherry an den N-Terminus die Funktion von P46 eingeschränkt wird.

3.5 P46-Funktionsanalysen

Die Aminosäuresequenz von P46 gibt keinerlei Hinweise auf mögliche Domänen in dem Protein. Da durch die Kopplung von mCherry an den N-Terminus von P46 dessen Funktion in BMMs eingeschränkt wird, wurde das Protein für weitere Funktionsanalysen fragmentiert um Bereiche zu identifizieren, die für die Funktion wichtig sind. Insgesamt wurde

P46 in fünf sich überlagernde Fragmente unterteilt und in Expressionsvektoren eingefügt (Abb. 3.22).

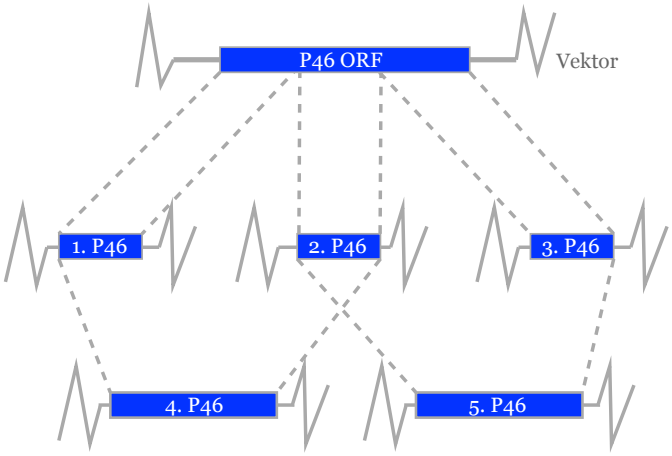


Abb. 3.22: Schematische Darstellung der P46-Fragmente ausgehend vom P46-ORF

Für die Funktionsanalyse von P46 wurde der P46-ORF in drei einzelne (1-3) und zwei überlappende Fragmente (5 und 4) geteilt.

Für die Funktionsanalyse wurden die transfizierten Leishmanien für *ex vivo* Infektionsstudien von BMMs eingesetzt (Abb. 3.23).

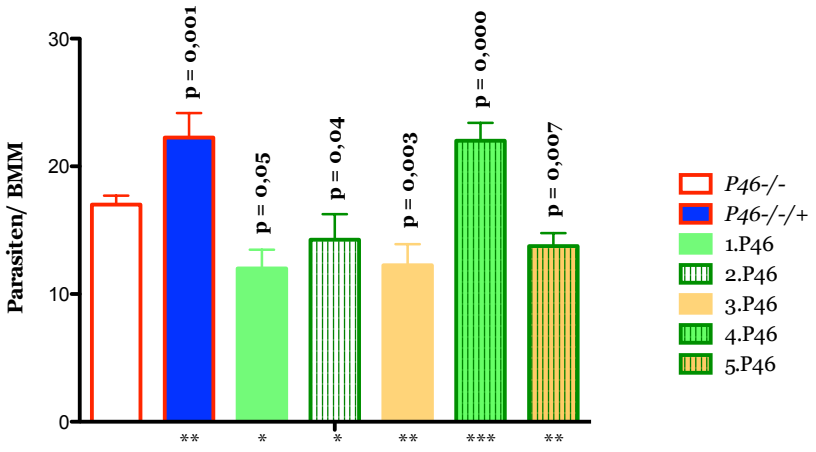


Abb. 3.23: Infektion von *ex vivo* BMMs mit verschiedenen L.mj *P46-/-* Transfektanten.

P46-Nullmutanten wurden mit P46-Expressionskonstrukten (1.P46 – 5. P46) transfiziert und zur Infektion von Knochenmarksmakrophagen verwendet. Als Kontrolle diente die Infektion der BMMs mit L.mj *P46-/-* bzw. L.mj *P46-/-/+*. Nach 24h wurden die BMMs fixiert; anschließend wurde die Parasitenlast in je 50 Makrophagen bestimmt (n=4). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$ (t-Test).

Die Auswertungen der *ex vivo*-Infektionen zeigen, dass im Vergleich zur P46-Nullmutanten L.mj *P46-/-* transfiziert mit den *P46*-Fragmenten 1, 2, 3 und 5 in geringerer Zahl in den

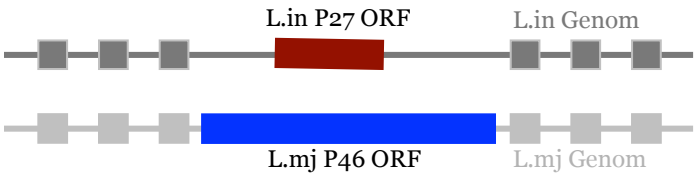
BMMs persistieren. Im Gegensatz dazu sind die durch L.mj *P46-/-/+* und L.mj *P46-/- 4.P46* verursachten Parasitenlasten signifikant höher und untereinander vergleichbar.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass der C-terminale Bereich für die Funktionalität von P46 unwichtig ist. Dafür spricht auch die Aktivität des P46::mCH Fusionsproteins (Abb. 3.21).

Leishmania major ist die einzige *Leishmania*-Spezies, die ein vollständiges P46-Gen (*L.mjF33.3060*) aufweist. Während *Leishmania tropica* ein von Stoppkodons unterbrochenes P46-Pseudogen (Daten nicht gezeigt) aufweist, besitzt *Leishmania infantum* (L.in) ein verkürztes, aber möglicherweise funktionsfähiges P46-Gen (*LinJ33.3220*) mit 88% Ähnlichkeit zu L.mj *P46*. Dieses verkürzte L.in P46-ORF umspannt fast genau den mittleren Teil des L.mj P46-ORFs (Abb. 3.24) und kodiert für ein Protein von ca. 27 kD (L.in 27).

Abb. 3.24: Schematische Darstellung der orthologen ORFs im L.mj- und L.in-Genom.

Das orthologe P46-Gen im L.in Genom (P27) umfasst vom Start-bis zum Stoppkodon 462 Basenpaare (bp), während das L.mj P46-Gen aus 1261 bps besteht. Der Überlagerungsbereich von L.in P27 liegt mit leichter Tendenz zum N-Terminus in der Mitte des L.mj P46-ORF.



Um zu überprüfen, ob das P46-homologe Protein aus L.in ebenfalls mit Virulenzsteigerung des Parasiten korreliert, wurde das L.in P27-ORF in einen Expressionsvektor eingefügt und mit L.mj *P46* in *ex vivo* Infektionsstudien verglichen (Abb. 3.25).

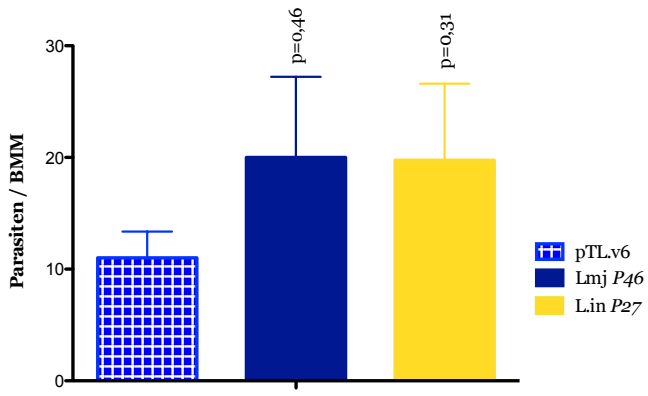


Abb. 3.25: Vergleich zwischen P46 und P27 in *ex vivo* Infektionsstudien.

Knochenmarksmakrophagen wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit L.mj *P46*, L.mj *P27* oder L.mj [pTL.v6] infiziert. Nach 24 h wurden die Makrophagen fixiert; anschließend wurde die Parasitenlast für je 100 BMMs bestimmt. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (t-Test).

Die Virulenz von L.mj WT wird durch das L.in P46-Homologon in gleichem Maße gesteigert wie durch das L.mj P46. Verglichen mit der Kontrolle (L.mj pTL.v6) führen beide Genprodukte zu einer erhöhten Parasitenlast in Knochenmarksmakrophagen.

Es scheint, dass im L.in Genom nur der für die Proteinfunktion entscheidende Teil des P46 verblieben ist. Somit kann der mittlere Abschnitt von P46 als Funktionsträger angesehen werden.

3.6 Transfektion von Knochenmarksmakrophagen

Es wurde gezeigt, dass P46 in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert wird und wahrscheinlich dort im Zusammenspiel mit dem Immunsystem seine virulenzsteigernde Wirkung entfaltet. Alle bisherigen Ergebnisse wurden von der Seite des Parasiten her gewonnen. Interessant war die Frage, ob das P46 bei Expression im Makrophagen selbst zur Virulenz der Leishmanien bei einer Infektion beiträgt. Hierzu sollten Makrophagen mit einem P46-Expressionsvektor transfiziert und nachfolgend infiziert werden.

Knochenmarksmakrophagen sind primäre Zellen und daher sehr empfindlich. Es wurden drei unterschiedliche Methoden zur Transfektion der BMMs eingesetzt: Lipofektion (Abb. 3.25), Nukleofektion (Abb. 3.26) und ein lentivirales Transduktionssystem (Abb. 3.27). Die erste Methode basiert auf Liposomen, die zweite auf Elektroporation und die dritte auf Lentiviren.

3.6.1 Lipofektion

Bei der Lipofektion wird die Endozytose-Fähigkeit der Zielzelle ausgenutzt. Positiv geladene Lipide binden negativ geladene DNA, wodurch DNA-Lipid-Komplexe gebildet werden. Bei Inkubation dieser Komplexe mit den zu transfizierenden Zellen fusionieren diese mit der Membran der Zielzellen und werden endozytotisch aufgenommen. In der Zelle werden die Komplexe abgebaut und die DNA zum Teil in den Zellkern transportiert (Abb. 3.25 A).

Für die Transfektion wurden die Knochenmarksmakrophagen ausgesät. DNA und das Transfektionsreagent wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (entscheidend für die Transfektionseffizienz) gemischt, inkubiert und zu den BMMs gegeben. Nach sechs Stunden im Brutschrank wurde die Transfektionslösung gegen Kulturmedium ausgetauscht und

die Makrophagen für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte mikroskopisch die Auswertung der Transfektion anhand des Reportergens *GFP* (Abb. 3.25 B&C).

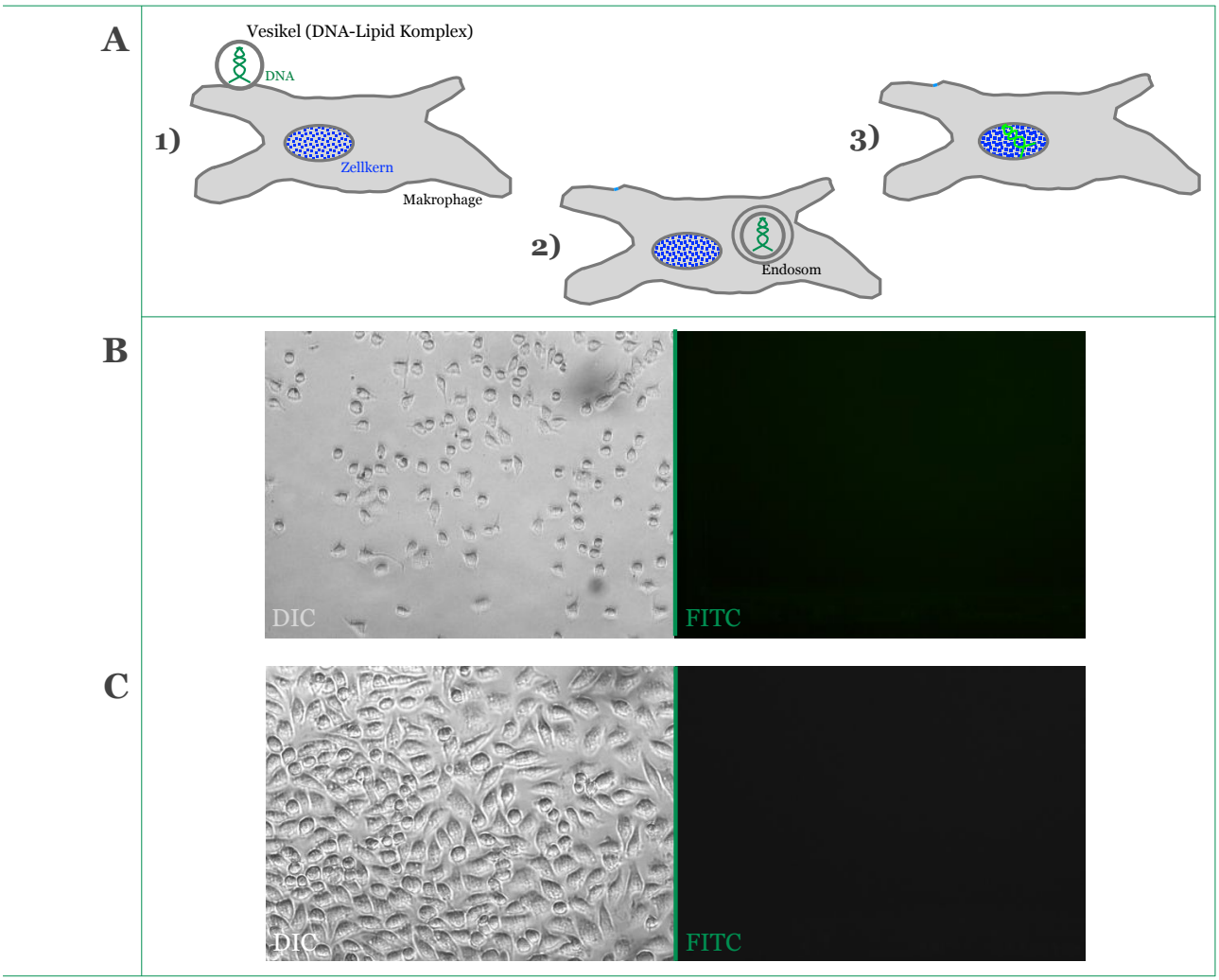


Abb. 3.25: Lipofektion.

(**A**) Skizzierter Ablauf einer Lipofektion. Das Plasmid, welches das GOI trägt, wird mit dem Transfektionsreagenz gemischt, sodass es zur Bildung von DNA-Lipid-Komplexen kommt. Diese fusionieren mit der Membran der Zielzellen (**1**), die sie über Endozytose aufnehmen (**2**). Der Komplex wird abgebaut und die DNA in den Kern transportiert, wo das GOI exprimiert werden kann (**3**).
Die Auswertung der Lipofektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Abgebildet sind transfizierte Knochenmarksmakrophagen (**B**) sowie eine Negativkontrolle (**C**).

Nach der Lipofektion ist die Zellzahl dezimiert und die Zellen sehen abgerundet aus. Die transfizierten Zellen exprimieren nachweislich kein eGFP (Abb. 3.25 B). Die Kontrollzellen sehen dagegen gesund aus und sind dicht gewachsen (Abb. 3.25 C).

Bei der Lipofektion scheint das Plasmid selbst in Kombination mit dem Lipidreagent schädigend für die Zellen zu sein. Auch die Transfektion der Zellen mit einem kleineren Plasmid ohne P46-Gen brachte keine besseren Ergebnisse, sodass diese Methode nicht weiter verwendet wurde.

3.6.2 Nukleofektion

Die Nukleofektion ist eine spezielle Form der Elektroporation. Bei der Elektroporation wird die Membran der zu transfizierenden Zelle mit kurzen elektrischen Impulsen porös gemacht, wodurch sich in der Lösung befindende DNA in die Zelle eindringen kann (Abb. 3.26 A). Bei der Nukleofektion ermöglicht der für jede Zellart spezielle Nukleofektor-Puffer sowie das für jede Zellart spezielle Programm am Nukleofektor™ (Amaxa-System von Lonza) das Eindringen der DNA direkt in den Zellkern der transfizierten Zelle. Dies soll eine Transfektionseffizienz von bis zu 60 % auch bei sich nicht teilenden Zellen ermöglichen.

Für die Nukleofektion von Knochenmarksmakrophagen wurden die Zellen mit dem speziellen Puffer und den Plasmiden gemischt und in eine Küvette (Lonza) transferiert. Nach erfolgter Nukleofektion wurden die Zellen in Kulturgeschirr eingesät und für 48 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und am Mikroskop ausgewertet (Abb. 3.26 B, C, D). Da sowohl das Kontrollplasmid von Amaxa (pmaxGFP) als auch das *P46* kodierende Plasmid pcDNA3.1-*P46-eGFP* das Reportergen *GFP* tragen, konnten erfolgreich transfizierte Zellen anhand des GFP-Signal identifiziert werden.

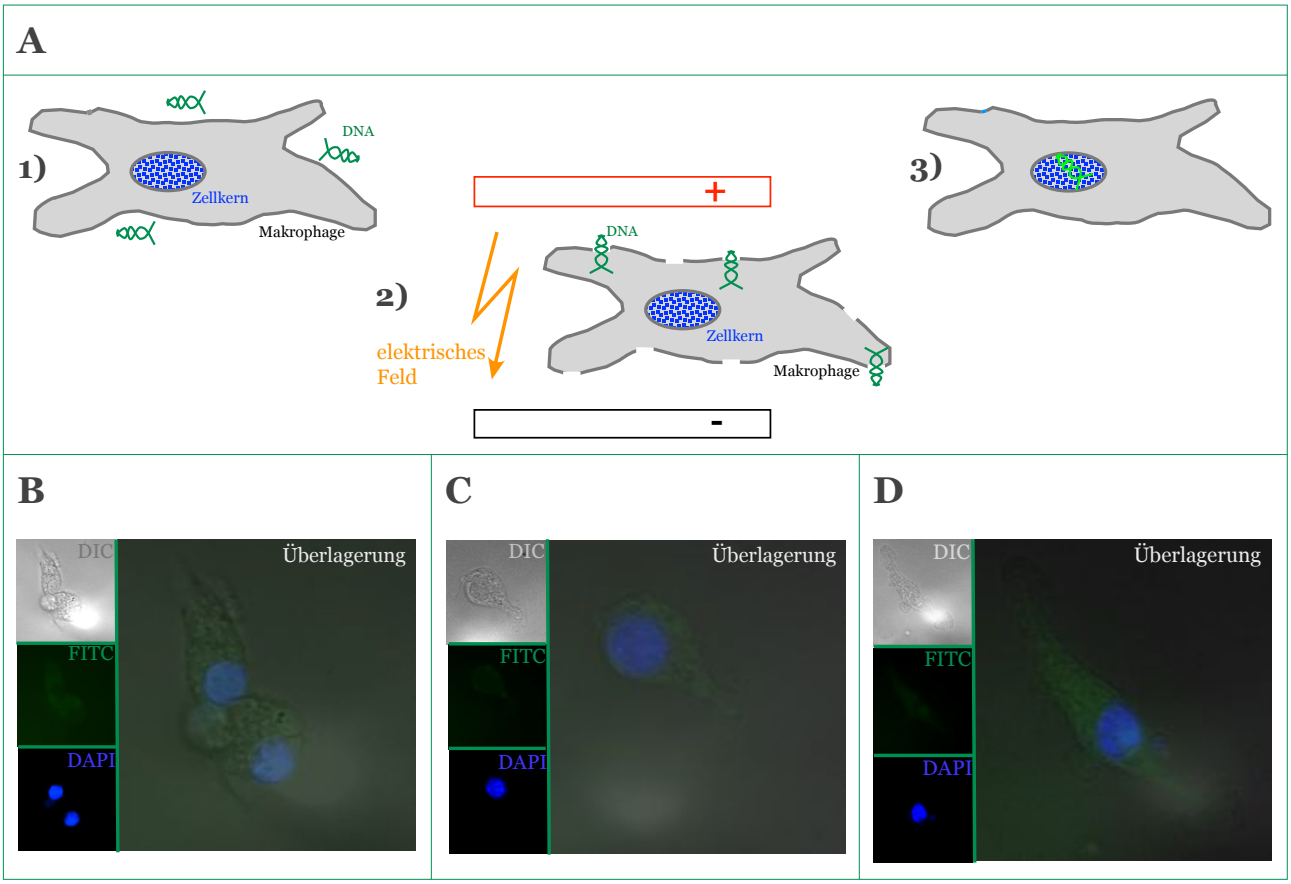


Abb. 3.26: Nukleofektion.

(**A**) Schematische Darstellung einer Nukleofektion. Die DNA wird mit dem Nukleofektor-Puffer (Lonza) gemischt und zu den Zellen gegeben (**1**). Durch kurze elektrische Impulse wird die Zellmembran porös (**2**) und die DNA kann bis direkt in den Zellkern gelangen. Nach Abstellen des elektrischen Feldes verschließen sich die Membranlücken wieder (**3**).
Die Auswertung der Nukleofektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Abgebildet sind die Zellen der Negativkontrolle (**B**), der Positivkontrolle (**C**) sowie der mit pcDNA3.1-*P46*-EGFP transfizierten Zellen (**D**).

Die ausgewerteten Aufnahmen zeigen ein schwaches, grünes Signal in allen behandelten Zellen unabhängig von der Präsenz eines Plasmides. Bei dem Signal handelte es sich offensichtlich um die Eigenfluoreszenz der Makrophagen. Es konnten keine für GFP positiven Makrophagen entdeckt werden. Nach der Nukleofektion war die Zellzahl stark dezimiert und die verbliebenen Zellen waren zumeist abgerundet (Daten nicht gezeigt). Auch nach weiteren Versuchen war es nicht möglich die BMMs erfolgreich zu transfizieren. Daher wurde zur letzten Transfektionsmethode übergegangen.

3.6.3 Transduktion durch Lenti-Vektoren

Lentiviren gehören zu den Retroviren. Sie haben ein Einzelstrang-RNA-Genom und werden in der Molekularbiologie unter anderem zur Transduktion von ruhenden Zellen eingesetzt. Die VSV-G pseudotypisierte Retroviren werden von „Verpackungs"-Zellen - wie der HEK 293T-Zelllinie - hergestellt und in den Überstand entlassen. Die geernteten Virus-Partikel können anschließend für die Transduktion der gewünschten Zellen verwendet werden (Abb. 3.27).

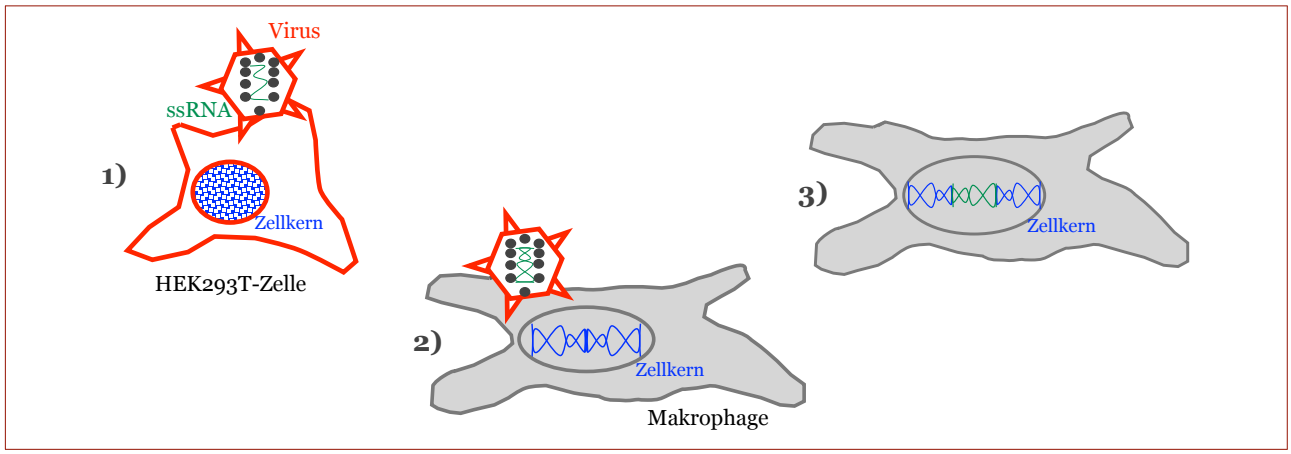


Abb. 3.27: Schematische Darstellung einer Zell-Transduktion durch Lenti-Vektoren.

Die Zelllinie HEK 293T wurde für die Herstellung der Lenti-Vektoren mit 4 Plasmiden (pMDLg/ pRRE, pRSV-Rev, phCMV-VSV-G, LeGO-iC2-P46) co-transfiziert (**1**). Anschließend wurden Makrophagen mit dem virushaltigen Überstand inkubiert (**2**). Nach Eintritt der Viren in die Zelle wird das Einzelstrang-RNA (ssRNA)-Genom des Virus durch das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in das Genom der Wirtszelle integriert (**3**).

Zur Herstellung der Virus-Partikel wurden HEK 293T-Zellen mit vier Plasmiden co-transfiziert. Die jeweiligen Plasmide tragen das GOI (*P46*) und das Markergen (mCherry) verbunden über eine **i**nterne **r**ibosomale **E**intritts**s**telle (abk. IRES) für eine gekoppelte Translation beider Gene, die Gene Gag und Pol für die Synthese der viralen RNA und für die Integration des Viren-Genoms in das Wirt-Genom nach Infektion, das Gen für die reverse Transkriptase, sowie das Gen für das Glykoprotein G von VSV, das für den Eintritt des Virions in die Zielzelle wichtig ist.

Der virushaltige Überstand wurde einmal pro 24 Stunden abgenommen und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Lenti-Vektoren titriert und für die Transduktion von Zellen eingesetzt. Durch die Kopplung des P46-Gens an das mCherry-Gen über IRES

werden beide Gene gleichermaßen exprimiert. Ein mCherry-Signal ist somit gleichbedeutend mit einer P46-Expression in der Zelle (Abb. 3.28 A, B, C).

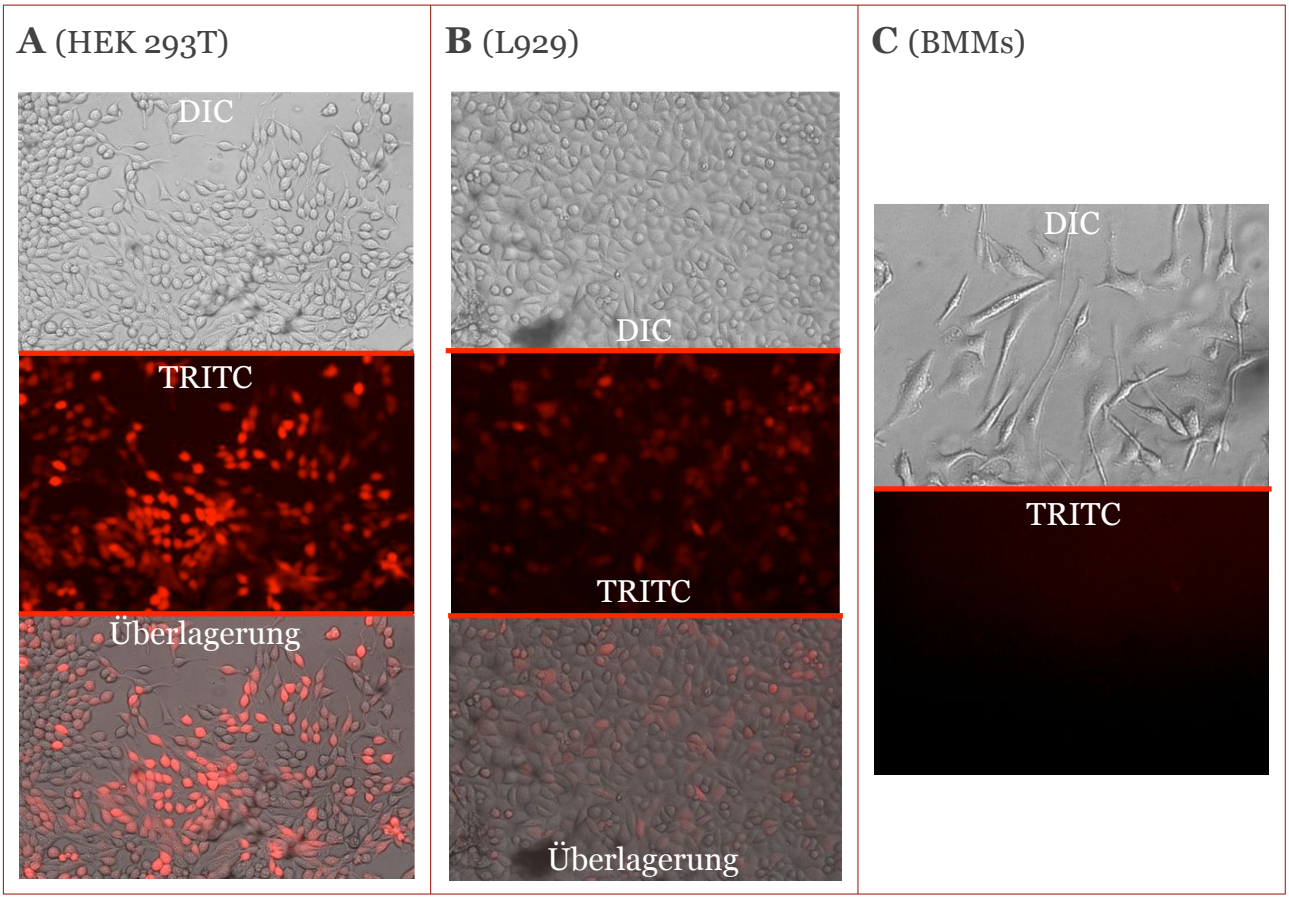


Abb. 3.28: Transduktion von Knochenmarksmakrophagen, HEK 293T- und L929-Zellen mit Lenti-Viren.

Es wurden je 100 µL virushaltigen Überstandes für die Transduktion der Zellen HEK 293T (**A**), L929 (**B**) und Knochenmarksmakrophagen (**C**) verwendet. Nach 48 h erfolgte die Auswertung der Transduktion am Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld bzw. im TRITC-Kanal. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm ImageJ überlagert.

Die Transduktion der Kontrollzellen HEK 293T (Abb. 3.28 A) und L929 (Abb. 3.28 B) war erfolgreich. Obwohl die Transduktion durch Lenti-Vektoren eine sehr schonende und zuverlässige Methode ist, konnten die Knochemarksmakrophagen (BMMs, Abb. 3.28 C) auch nach mehrmaligen Versuchen nicht transduziert werden.

Knochenmarksmakrophagen lassen sich nur geringfügig transfizieren. Zudem sind die Zellen nach der Behandlung oft schwer beschädigt, sodass weitere Experimente nicht lohnenswert sind (Abb. 3.25 B). Durch die geringe Transfektionsrate und die starke Schädi-

gung der Zellen waren die BMM-Transfektionsversuche nicht aussichtsreich und wurden eingestellt.

3.7 Phylogenie der P46-Sequenzen

Im Laufe der Klonierungen von *P46* für unterschiedliche Experimente wurden Sequenzunterschiede im P46-Gen zwischen dem Referenzstamm *L. major* Friedlin und dem Laborstamm *L. major* 5ASKH festgestellt. Um diese Entdeckung näher zu untersuchen wurden gDNA-Präparate von *L. major*-Isolaten aus Afrika, dem Nahen Osten und Zentralasien (Tabelle 3.1) auf die P46-Sequenz hin überprüft.

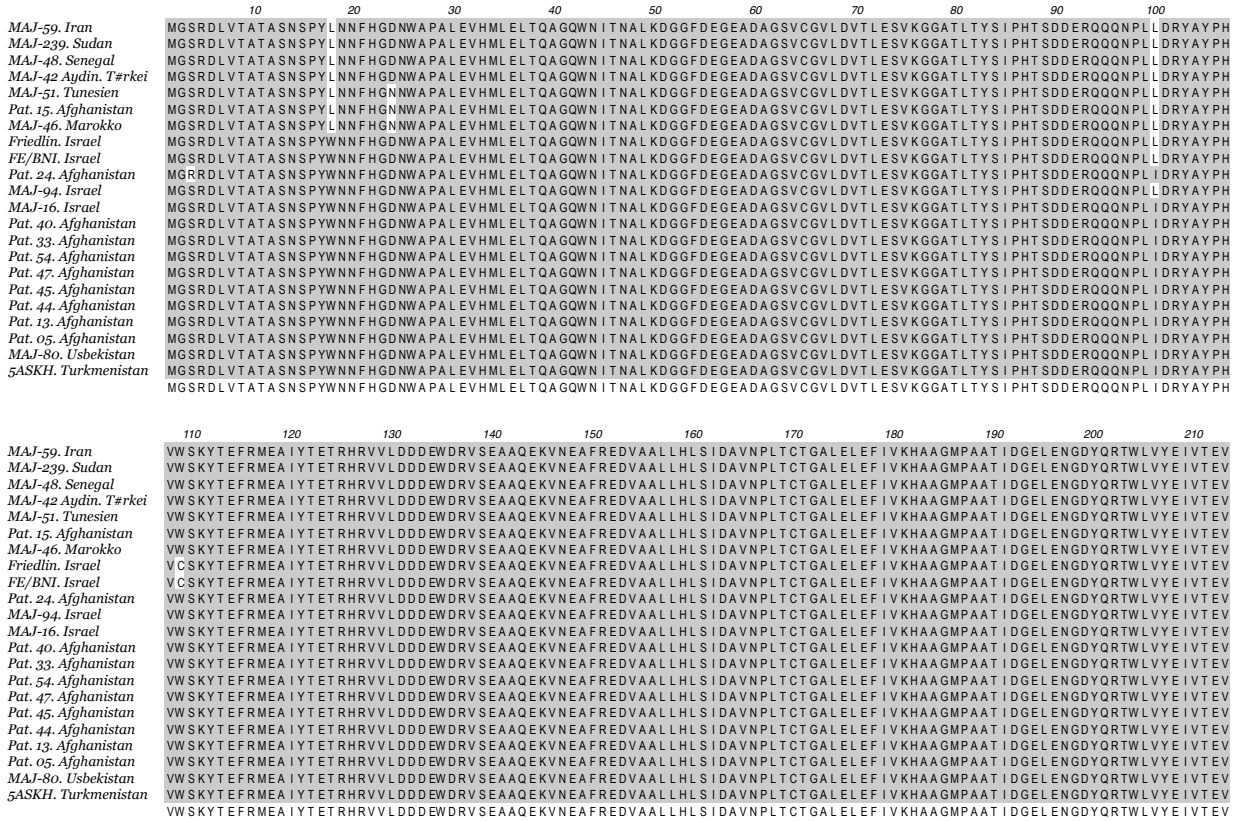
Tabelle 3.1 Liste der untersuchten *L. major*-Isolate.

ID	WHO Kode	Geografischer Ursprung
MAJ-01	MHOM/TM/1973/5ASKH	Askhabad, Turkmenistan
MAJ-13	MHOM/IL/1980/Friedlin	Jordan Valley, Israel
FE/BNI	MHOM/IL/81/FEBNI	Israel
MAJ-16	MPSA/IL/1983/PSAM398	Arava, Israel
MAJ-42	MHOM/TR/1993/SY	Ayden, Türkei
MAJ-46	MHOM/MA/92/LEM2463	Ain Beni Mathar, Marokko
MAJ-48	MHOM/SN/96/LEM3181	Thies, Senegal
MAJ-51	MHOM/TN/97/LPN162	Sfax, Tunesien
MAJ-59	MHOM/IR/76/Vaccine strain	nicht bekannt
MAJ-80	MHOM/UZ/02/17h	Mubarek, Usbekistan
MAJ-94	MHOM/IL/03/LRC-L952	Qeziot, Israel
MAJ-239	MHOM/SD/06	Nord Sudan
Pat. 5	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 13	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 15	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 24	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 33	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan

ID	WHO Kode	Geografischer Ursprung
Pat. 40	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 44	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 45	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 47	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan
Pat. 54	k.A.	Mazar-i-Sharif, Afghanistan

Die Spalten zeigen jeweils die kurze ID der Isolate, den WHO Kode, falls vorhanden, sowie den geografischen Ursprung.
Die gDNA-Präparate wurden freundlich zur Verfügung gestellt von Gabrielle Schönian (Berlin) und Ulrike Schleicher (Erlangen). Pat. =Patient, k.a.= keine Angaben.

Die erhaltenen gDNAs wurden für eine PCR eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass das gesamte P46-ORF amplifiziert werden konnte. Die P46-Varianten wurden in das pUC19-Plasmid kloniert und sequenziert. Die erhaltenen P46-Nukleotid-Sequenzen wurden *in silico* in Aminosäure-Sequenzen translatiert und durch das Programm MacVector ® über den MUSCLE Algorithmus (Edgar, 2004) miteinander verglichen (Abb. 3.29).



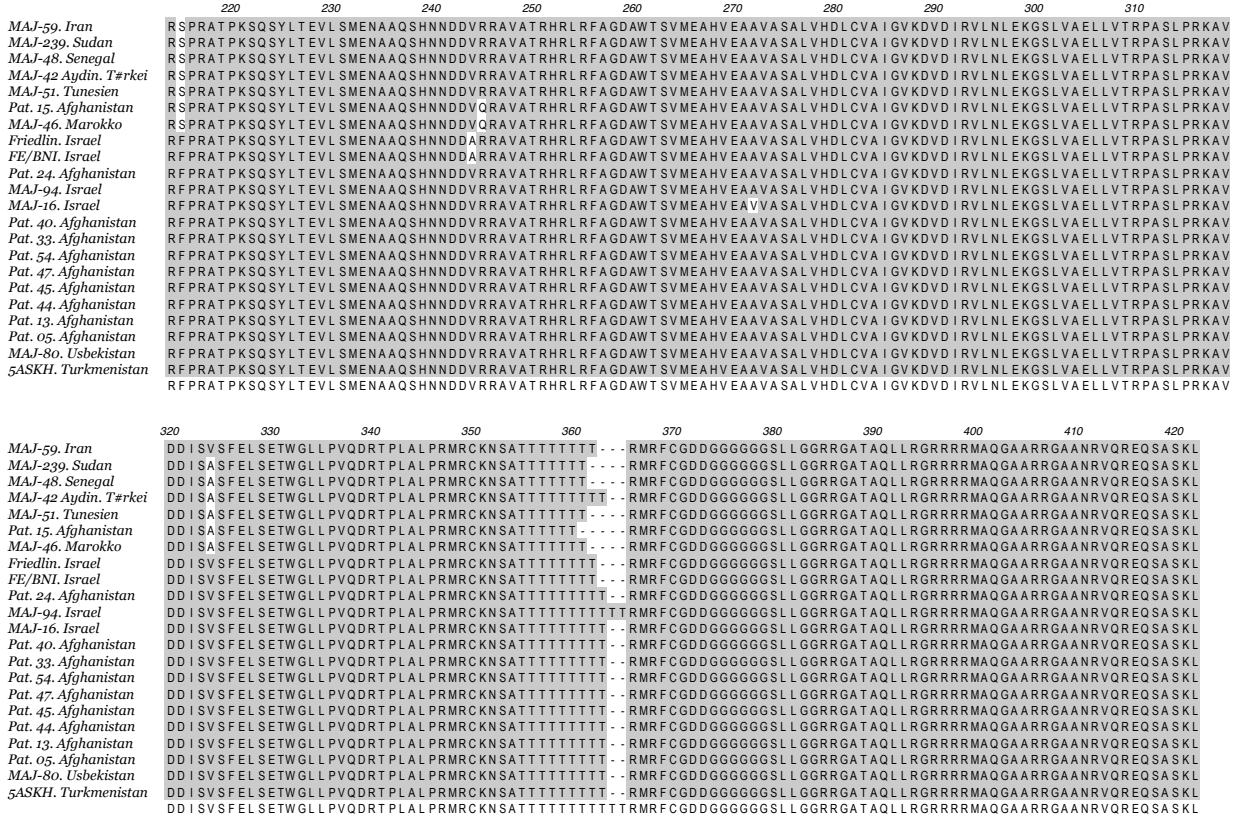


Abb. 3.29: Der P46-Sequenzabgleich.

Für den Abgleich der P46-Amsinosäure-Sequenzen aus 22 L.mj-Isolaten wurde der MUSCLE Algorithmus (MacVector ®) benutzt. Mit der Konsensus-Sequenz (unten) übereinstimmende Positionen sind grau unterlegt. Abweichende Aminosäuren haben einen weißen Hintergrund. Positionen der Aminosäuren sind jeweils oben angegeben.

Es gibt in P46 keine gravierenden Sequenzunterschiede zwischen den unterschiedlichen *L. major*-Isolaten. Die von der Konsensus-Sequenz abweichenden Aminosäuren sind auf weißem Hintergrund gezeigt.

Trotz geringer Sequenzunterschiede zwischen den P46-Proteinen ergaben phylogenetische Analysen eine evolutionäre Aufspaltung der Sequenzvarianten, die ideal mit dem Ursprung der *L. major*-Isolate korrelieren (Abb. 3.30 B).

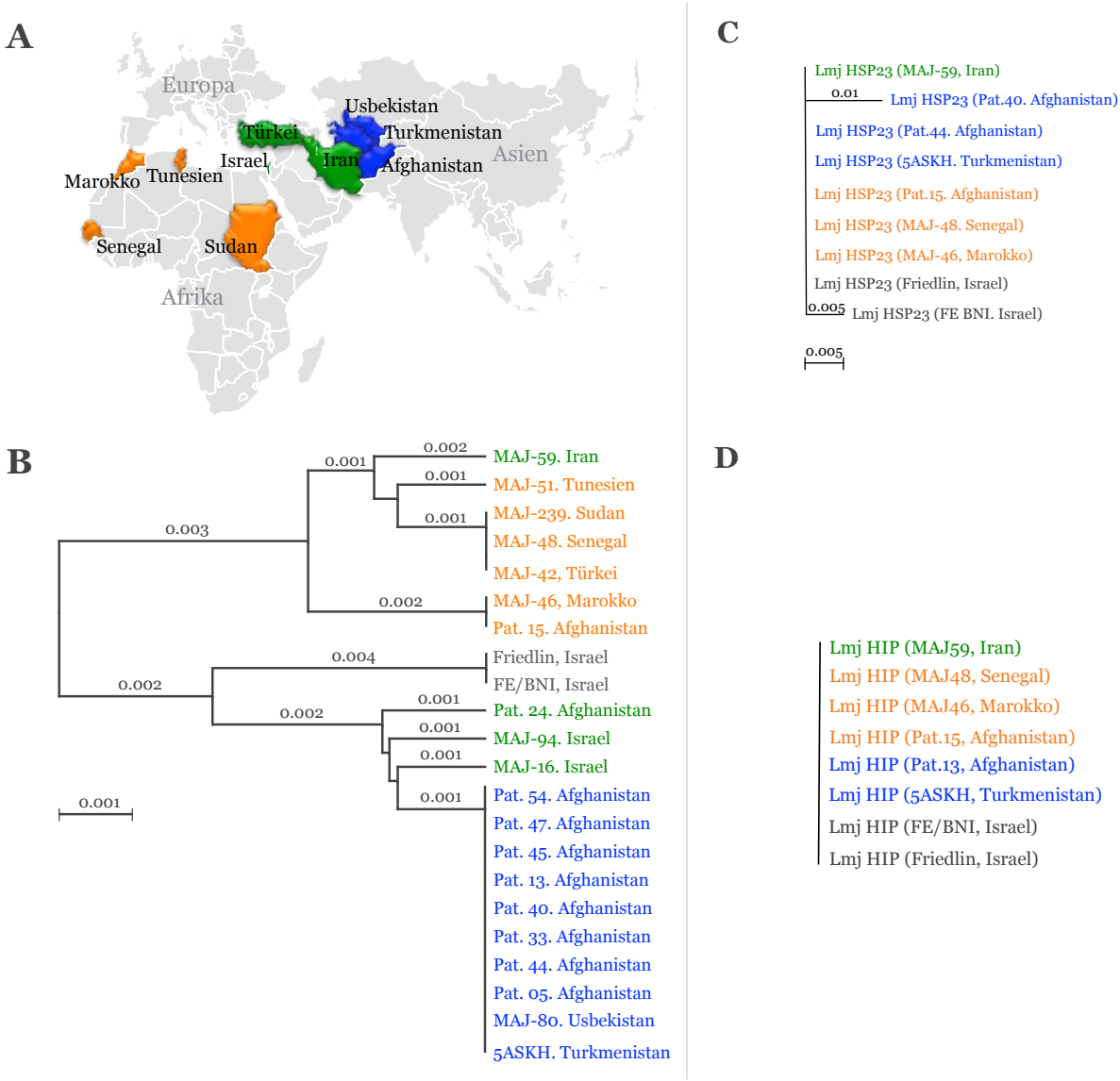


Abb. 3.30: Alte-Welt-Karte (**A**) und phylogenetische Bäume von P46 (**B**), Hsp23 (**C**) und HIP (**D**).

(**A**) Auf der Karte sind die Ursprungsländer der 22 L.mj-Isolate, die für die gDNA-Isolierung benutzt wurden, farblich unterlegt.
Nach dem *Alignment* der P46-Sequenzvarianten wurde die sogenannte *uncorrected distance* zur Erstellung des phylogenetischen Baumes (MacVector, Inc.) für P46 verwendet (**B**). Die X-Achse stellt die Unterschiede zwischen den Sequenzen dar. Angegeben ist der Name des L.mj-Isolates sowie der Name des Ursprungslandes. Die farbliche Kennzeichnung bezieht sich auf den Farbkode der Karte (A): blau für Zentralasien , grün für den Nahen Osten, orange für Afrika und grau für die Laborstämme. Phylogenetische Bäume für die Hsp23 - (**C**) und die HIP- (**D**) Sequenzen wurden nach den selben Kriterien erstellt. Der Farbkode entspricht dem in B.
Hsp23 = *Heat shock protein* 23, HIP= *Hsc70-interacting protein.*

Die P46-Sequenzen der beiden ursprünglich aus Israel stammenden Laborstämme L.mj FE/BNI und L.mj Friedlin bilden eine abgegrenzte Gruppe innerhalb des P46-Baumes.

Auch mit anderen *L. major*-Isolaten aus Israel besteht wie mit anderen P46-Sequenzen keine größere Ähnlichkeit, was auf alternative Entwicklung des Parasiten deutet.

Die phylogenetische Analysen von Hsp23- und HIP-Sequenzen aus den *L. major*-Isolaten zeigen dagegen keinerlei herkunftsabhängige Sequenzunterschiede. Bei beiden Proteinen handelt es sich um kleine, nicht essentielle Proteine ähnlich dem P46-Protein.

Für die P46-Variabilität deutet die geografisch korrelierende Verteilung der verglichenen P46-Sequenzen in Verbindung mit der Sequenzgleichheit von HIP und Hsp20 eher auf Selektion als auf Gendrift hin.

Ob die P46-Sequenz Einfluss auf die Virulenzwirkung des Proteins nimmt, sollte mit nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

Die P46-Gensequenzen von L.mj 5ASKH, L.mj FE/BNI und L.mj MAJ-48 wurden jeweils in einen Expressionsvektor integriert und L.mj 5ASKH WT damit transfiziert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Parasiten zu gleichen Teilen gemischt und für die Infektion von BALB/c und C57BL/6 Mäusen sowie für die Inokulation von Kulturmedium verwendet (Abb. 3.31).

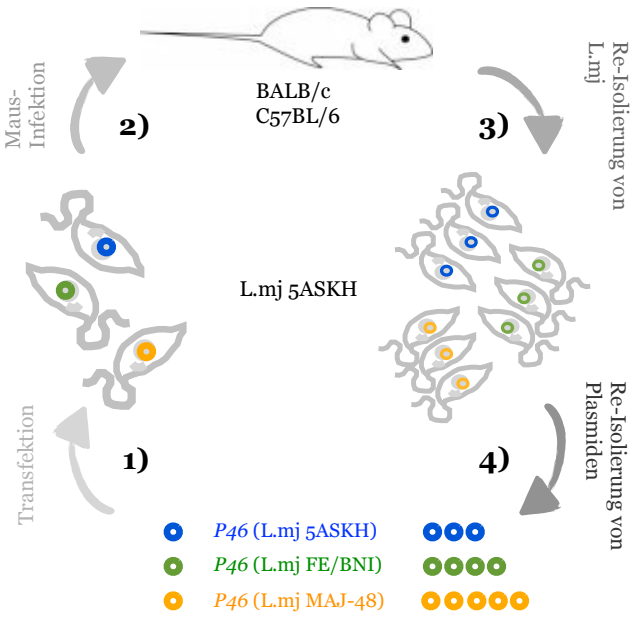


Abb. 3.31: Schaubild für den Versuchsaufbau.

Die P46-Gensequenzen von L.mj 5ASKH, L.mj FE/BNI und L.mj MAJ-48 wurden je in einen Expressionsvektor kloniert und zur Transfektion von L.mj WT verwendet (**1**). Die transfizierten Parasiten wurden zu gleichen Anteilen durch BALB/c und C57BL/6 Mäuse passagiert (**2**). Anschließend wurden die Parasiten aus den Hinterpfoten der Mäuse re-isoliert (**3**). Aus den wieder angezüchteten Parasiten wurden die Plasmide aufgereinigt (**4**).

Die Infektion der Mäuse wurde nach 60 Tagen abgebrochen und die Parasiten aus den Füßen der Mäuse re-isoliert (Abb. 3.31, 3). Anschließend konnten die *P46*-tragenden Plasmide aus den isolierten Leishmanien sowie der *in vitro* Kultur gewonnen werden (Abb. 3.31, 4).

Um zu überprüfen, welche P46-Sequenz sich in der Maus bzw. der *in vitro* Kultur durchgesetzt hat, wurde ein Teil von P46 aus den gewonnenen Plasmiden amplifiziert (Abb. 3.32 A). Dazu wurden die Plasmide zunächst in *E.coli* angereichert. Für die Plasmidpräparation wurden je 50 Bakterienkolonien verwendet. Nach der Amplifikation der P46-Fragmente aus den *E.coli*-Plasmidpräparationen wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und nach ihrer Größe ausgewertet (Abb. 3.32 B).

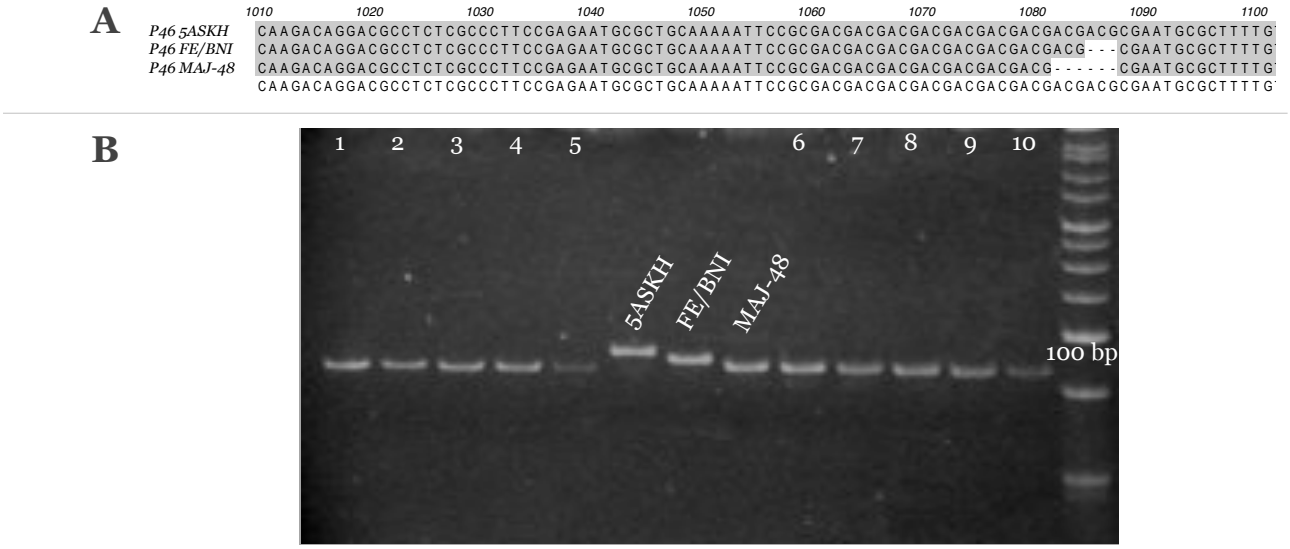


Abb. 3.32: P46-Sequenzabgleich für die drei L.mj Isolate 5ASKH, FE/BNI, MAJ-48 (**A**) sowie die Produkte einer Längenpolymorphismus-PCR (**B**).

Dargestellt ist ein ca. 80 bp langes P46-Fragment, das aus den re-isolierten Plasmiden amplifiziert wird. Die drei P46-Sequenzen unterscheiden sich hier in 3-6 Basenpaaren (**A**). Für die P46-Amplifikation wurden Plasmidpreparationen aus je 50 Bakterienkolonien sowie aus den ursprünglichen Plasmiden verwendet (Positivkontrolle). Die Amplifikate wurden auf Polyacrylamidgele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (**B**). Die Amplifikate wurden anhand der Längen der Positivkontrollen dem jeweiligen L.mj-Isolat zugeordnet. Die DNA-Leiter ist rechts aufgetragen mit Kennzeichnung der 100 bp-Bande.

Der Anteil der jeweiligen P46-Sequenz wurde für jede Maus sowie die *in vitro* Kultur aus mindestens 50 Bakterienkolonien bestimmt und graphisch zusammengefasst (Abb. 3.33).

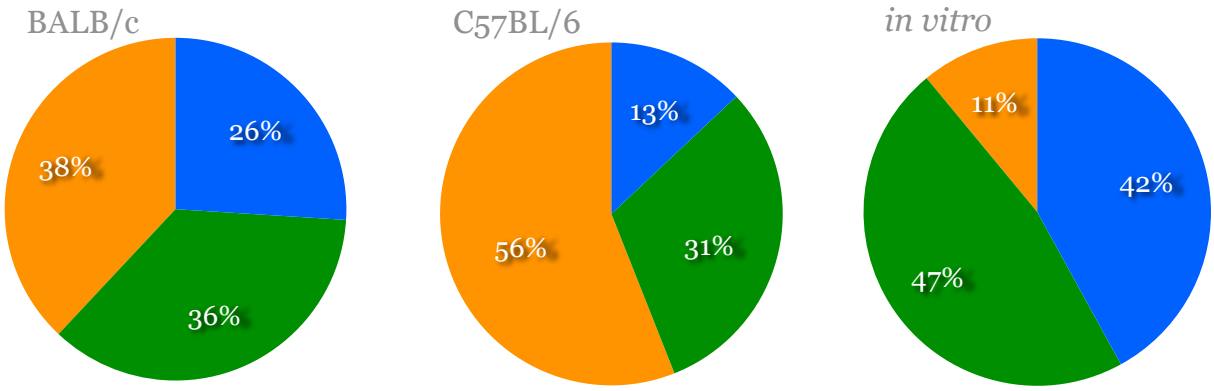


Abb. 3.33: Selektion der P46-Sequenz *in vivo* und *in vitro*.

Die P46-Varianten wurden anhand der PCR-Produkt-Längenpolymorphismen (Abb. 3.32 B) den L.mj-Isolaten zugeordnet. Die Kreisdiagramme zeigen den prozentualen Anteil der P46-Varianten 5ASKH (blau), FE/BNI (grün) sowie MAJ-48 (orange) nach der P46-Selektion in BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen sowie *in vitro*.

Jede der drei Selektionen ergibt eine andere Verteilung für die unterschiedlichen P46-Sequenzen. In der BALB/c Maus ist die Verteilung ausgewogen und jede P46-Variante prozentual nahezu gleich vertreten. P46 5ASKH nimmt den geringsten Anteil ein. Anders sieht die Verteilung dagegen in der C57BL/6 Maus aus. Hier dominiert die P46-Sequenz des afrikanischen *L. major*-Isolates aus Senegal. Die P46-Sequenz von L.mj 5ASKH nimmt auch hier den geringsten Anteil ein. In der *in vitro* Kultur sind die P46-Sequenzen von L.mj 5ASKH und L.mj FE/BNI zu gleichen Teilen vertreten, während die P46-Sequenz von dem afrikanischen Isolat hier einen geringen Prozentsatz einnimmt.

Lange sind die BALB/c Mäuse und C57BL/6 Mäuse aufgrund ihrer Dichotomie gegenüber der *Leishmania*-Infektion beschrieben worden. Die BALB/c Maus ist infektionssensitiv, während die C57BL/6 Maus Resistenz gegen die Parasiten aufweist. Die Selektion der P46-Sequenz in beiden Mäusen fällt unterschiedlich aus. Während in der BALB/c Maus nur gering zwischen den P46-Sequenzen unterschieden wird, weist die Selektion in der resistenten C57BL/6 Maus eine Präferenz für die P46-Sequenz aus dem afrikanischen Feld-Isolat auf. *In vitro* liegt der Sachverhalt anders, die in der resistenten Maus starke P46-Sequenz ist zugunsten der Laborstämme FE/BNI und 5ASKH benachteiligt.

Anknüpfend an die *in vivo*-Selektion der P46-Sequenzen sollte auch auf eine mögliche Selektion durch *ex vivo* Makrophagen getestet werden. Dazu wurden BMMs mit den P46-

Transgene tragenden Parasiten infiziert und die Parasitenlast mikroskopisch ausgewertet (Abb. 3.34).

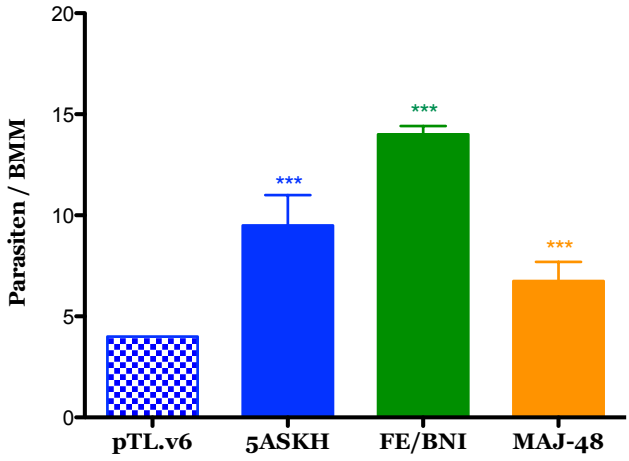


Abb. 3.34: Infektion von *ex vivo* BMMs.

Knochenmarksmakrophagen wurden im Verhältnis 1:10 mit L.mj [**pTL.v6**], L.mj *P46* (**5ASKH**), L.mj *P46* (**FE/BNI**), L.mj *P46* (**MAJ-48**) infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert. Nachfolgend wurde die Parasitenanzahl in je 50 Makrophagen bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n=4; *** = $p \leq 0{,}001$.

In der *ex vivo* Selektion ist die Verteilung der P46-Varianten mit der *in vitro* Selektion vergleichbar (Abb. 3.33). Die Expression der P46-Varianten aus L.mj MAJ-48 führt zur geringsten Parasitenlast bei der BMM-Infektion. Die P46-FE/BNI exprimierenden Parasiten führen dagegen zur stärksten Parasitenlast in dem *ex vivo* Infektions-Experiment.

Da die Parasitenlast sowie die Präferenz einer P46-Sequenz durch den jeweiligen Expressionslevel des Transgens begründet sein könnte, wurde der Expressionslevel der P46-Varianten überprüft (Abb. 3.35). Dazu wurde RNA aus L.mj 5ASKH Promastigoten, die mit dem jeweiligen P46-Transgen sowie mit dem leeren Vektor transfiziert waren, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um auch den Expressionslevel der P46-Transgene in Amastigoten zu überprüfen wurde RNA aus Parasiten-infizierten BMMs isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNAs wurden anschließend für die qRT-PCR Analyse eingesetzt.

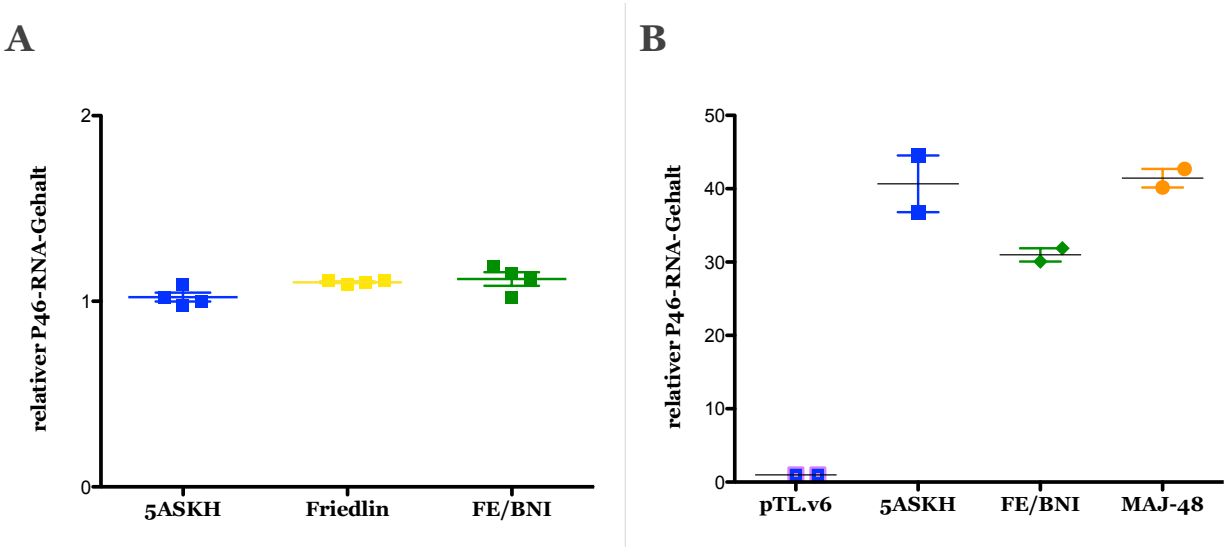


Abb. 3.35: Der relative P46-RNA-Gehalt in Promastigoten (**A**) und Amastigoten (**B**).

Für die Bestimmung des relativen *P46*-RNA-Gehaltes wurde aus den Promastigoten (**A**) L.mj 5ASKH, L.mj Friedlin, L.mj FE/BNI und aus Makrophagen (**B**) infiziert mit: L.mj [**pTL.v6**], L.mj *P46* (**5ASKH**), L.mj *P46* (**FE/BNI**), L.mj *P46* (**MAJ-48**), die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als *template* in die qRT-PCR eingesetzt unter Verwendung P46-spezifischer Starter. Durch Normalisierung des P46-RNA-Gehaltes gegen den *Leishmania*-Aktin-RNA-Gehalt konnte der relative *P46*-Expressionslevel in den Promastigoten (n=4) (**A**) und den Amastigoten (n=2) (**B**) bestimmt werden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (t-Test).

Da von dem Feld-Isolat MAJ-48 nur die gDNA zur Verfügung stand, wurde für die *P46*-Expressionsbestimmung zusätzlich der Laborstamm L.mj Friedlin genommen. Der *P46*-Expressionslevel in den promastigoten Wildtyp-Zellen von L.mj 5ASKH, FE/BNI und Friedlin unterscheidet sich kaum (Abb. 3.35 A). Die transfizierten L.mj 5ASKH Parasiten weisen allgemein hohe Expressionslevel von *P46* auf. Das P46-Transgen aus L.mj FE/BNI wird im Vergleich zu den anderen Transgenen geringfügig weniger exprimiert (Abb. 3.35 B). Trotz der vergleichbaren Expression der unterschiedlichen P46-Transgene gibt es Unterschiede in der Selektion der P46-Sequenz durch Mäuse oder BMMs.

Es wurde eine geografisch abhängige Verteilung der unterschiedlichen P46-Sequenzen gezeigt, welche durch den Vergleich mit zwei anderen Proteinsequenzen nicht auf Gendrift zu basieren scheint (Abb. 3.30). In dieser Verteilung bilden die P46-Sequenzen von L.mj FE/BNI und L.mj Friedlin eine abgegrenzte Gruppe trotz Ursprungsverwandten (Abb. 3.30 B), was vermutlich auf ihre lange Laborgeschichte zurückzuführen ist. Bei der Infektion von Mäusen werden P46-Sequenzen selektiert. Die P46-Variante aus einem Feld-Isolat

setzt sich bei der Infektion einer gegen Leishmanien resistenten Maus durch (Abb. 3.33), während sich die P46-Sequenz des alten laboradaptierten Stamms L.mj FE/BNI *in vitro* und in *ex vivo* Infektionen von BMMs gegen die anderen durchsetzt (Abb. 3.33; Abb. 3.34). Die P46-Sequenz des im Vergleich zu L.mj FE/BNI neuen Laborstamms L.mj 5ASKH scheint von den drei verglichenen Sequenzen die geringste Virulenz zu vermitteln, was nicht auf einen niedrigen Expressionslevel von *P46* zurückzuführen ist (Abb. 3.35 A&B).

P46 ist ein kleines, nicht essentielles Protein in *L. major*. Der geringe Expressionslevel des P46-Genlokus‘ führte zu einigen Nachweisschwierigkeiten. Trotzdem gelang es P46 in der Beladung von Exosomen nachzuweisen (Abb. 3.16) und im Zytosol von infizierten Makrophagen wiederzufinden (Abb. 3.19), wo es seine Funktion auszuüben scheint. Der funktionelle Teil des Proteins konnte auf den mittleren N-Terminus des Proteins eingegrenzt werden (Abb. 3.22), was auch durch den immer noch funktionsfähigen P46-homologen ORF in *L. infantum* untermauert wird (Abb. 3.24). P46 scheint seine Funktion im Zusammenspiel mit dem Immunsystem des Wirtes zu entfalten, da *in vivo* und *ex vivo* jeweils andere P46-Varianten bevorzugt werden (Abb. 3.9 zu 3.11; Abb. 3.33; 3.34). Schließlich wurde gezeigt, dass es Sequenzvarianten in den P46-Proteinen aus unterschiedlichen *L. major*-Isolaten gibt. Anhand dieser Unterschiede wurden phylogenetische Studien erstellt, welche eine geografisch korrelierende Aufspaltung der untersuchten P46-Varianten zeigten (Abb. 3.30 B). Diese trat in den untersuchten Kontrollen nicht auf (Abb. 3.30 C&D). Neben der Phylogenie der P46-Varianten konnte *in vivo*, *in vitro* und *ex vivo* eine Selektion für bestimmte P46-Sequenzen gezeigt werden (Abb. 3.33; 3.34).

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass L.mj 5ASKH zwar auf P46 verzichten kann, was aber mit einem Verlust an Virulenz einhergeht, dessen Auswirkungen im Feld nicht abzuschätzen sind.

4. Diskussion

Der Ausgang einer *Leishmania*-Infektion hängt sowohl von der *Leishmania*-Spezies als auch vom genetischen Hintergrund des Wirtes ab. Leishmanien verfügen über viele Faktoren, die unter anderem für ihre Virulenz entscheidend sind. Neben den obligat vorkommenden Virulenzfaktoren wie den Glykokonjugaten und der Metallo-Peptidase GP63 mit Spezies-spezifischer Funktion (Turco et al., 2001) gibt es auch solche, die Spezies-spezifisch vorkommen (Reiling et al., 2010).

4.1 Epidemiologie

Umfassende Studien in diesem Feld zeigen ein breites Spektrum an Funktionen einzelner Virulenzfaktoren. Trotz zahlreicher Studien ist jedoch das für eine vollständige Infektiosität nötige Zusammenspiel einzelner Faktoren oft unklar. Die Spezifität für Reservoirwirte in bestimmten Endemiegebieten kann auch intra-spezifische Variationen innerhalb der Virulenzfaktoren hervorbringen. So sind *L. major*-Isolate aus Zentralasien nicht infektiös für die L.mj- Reservoirwirte aus dem Mittleren Osten oder Afrika und *vice versa*. Diese Ergebnisse sprechen daher für eine spezifische Anpassung des Parasiten an die Wirte in dem jeweiligen Endemiegebiet. Dennoch ist *L. major* trotz seiner weiten Verbreitung epidemiologisch weitestgehend uniform (Al-Jawabreh et al., 2008; Elfari et al., 2005; Le Blancq et al., 1986).

Meine Ergebnisse sind mit diesen Befunden im Einklang. P46 scheint eine Rolle bei dieser Anpassung an die Wirte zu spielen. Die Phylogenie von P46 aus 22 *L. major*-Isolaten (Tab. 3.1) zeigte eine Korrelation zwischen der geographischen Herkunft des *L. major*-Isolates und der P46-Sequenz (Abb. 3.30 B). Eine solche Korrelation konnte nicht für die Phylogenie von L.mj Hsp23 oder L.mj HIP beobachtet werden (Abb. 3.30 C&D), was gegen eine Gendrift im P46-Genlokus spricht. Die Phylogenie von P46 zeigt eine ähnliche Aufteilung wie die in der Studie von Al-Jawabreh *et al*. (2008) erstellte *L. major*-Phylogenie mit drei geographischen Hauptgruppen: Afrika, Mittlerer Osten und Zentralasien. Allerdings bilden die beiden P46-Varianten der Laborstämme MHOM/81/IL/FE/BNI (FE/BNI) und MHOM/IL/1980/Friedlin (Friedlin) eine vom geographischen Ursprung unabhängige Gruppe (Abb.

3.30 B). Beide Isolate wurden seit über 20 Jahren in Labormäusen passagiert und somit adaptiert. Mareike Chrobak konnte in ihrer Promotionsarbeit (2010) zeigen, dass *L. major* FE/BNI eine messbare Virulenz in den resistenten C57BL/6-Mäusen aufwies, und zwar im Gegensatz zum *L. major*-Isolat MHOM/72/SU/5ASKH (5ASKH), das erst durch Überexpression von P46 eine Pathologie hervorrufen konnte.

Tatsächlich konnte ich bestätigen, dass P46-Varianten einem Wirts-abhängigen Selektionsdruck unterworfen sind. L.mj 5ASKH wurde jeweils mit P46-Transgenen aus Israel (FE/BNI), Turkmenistan (5ASKH) und Senegal (MAJ-48) transfiziert und die rekombinanten Parasiten zu gleichen Anteilen für eine Passage in den Labormausstämmen BALB/c und der C57BL/6 oder für eine *ex vivo* Infektion verwendet. In der resistenten C57BL/6 Maus, die als bestes Modell für *Leishmania*-Infektionen beim Menschen gilt (Ritter et al., 2004), setzte sich die P46-Variante aus Senegal durch (Abb. 3.33). In der BALB/c-Maus besteht dagegen kein Selektionsdruck für eine P46-Variante, da die Maus suszeptibel gegenüber *L. major*-Infektionen ist.

Interessanterweise gehört der natürliche Reservoirwirt *Arvicanthis niloticus* aus Senegal (Desjeux, 1992; Le Blancq et al., 1986) wie die Labormausstämme zur Unterfamilie der *Murinae*. Im Mittleren Osten und Zentralasien werden Nager der Unterfamilie *Gerbillinae* als Reservoirwirte genutzt (Desjeux, 1992; Pratlong et al., 2009). In der Abbildung 4.1 sind die Hauptreservoirwirte der 22 getesteten *L. major*-Isolate zusammengefasst. Ihr Vorkommen korreliert mit den Sequenzgruppen aus der P46-Phylogenie (Abb. 3.30).

Abb. 4.1: Verbreitung der Reservoirwirte von den 22 getesteten *L. major*-Isolaten.

Dargestellt ist die Karte der Alten Welt. Die Ursprungsländer der 22 untersuchten L.mj-Isolate sind farblich hervorgehoben und benannt. Die Bilder der Hauptreservoirwirte für die jeweiligen Regionen sind mit dem wissenschaftlichen Namen versehen und farblich umrandet. Farbkode entspricht dem aus Abb. 3.30.

In vitro ist die MAJ-48 Variante von P46 weniger effizient (Abb. 3.33). Hier zeigen die beiden laboradaptierten Varianten von L.mj FE/BNI und L.mj 5ASKH einen größeren Effekt. Diese Selektion in Promastigoten zeigt, dass P46 eventuell einen generellen Effekt auf die Anpassung an gegebene Umwelteinflüsse hat.

In *ex vivo* Infektionsstudien zeigt die P46-Variante von FE/BNI die höchste virulenzsteigernde Wirkung, dicht gefolgt von der Variante aus 5ASKH (Abb. 3.34). Die P46-Varianten aus den beiden Labor-adaptierten *L. major*-Stämmen scheinen auch in diesem Labor-etablierten Infektionssystem einen selektiven Vorteil zu vermitteln.

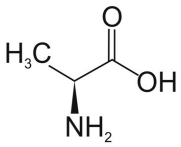
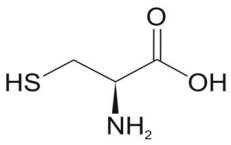
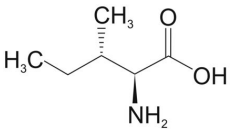
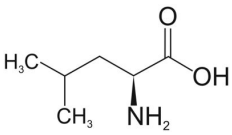
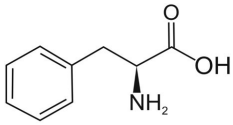
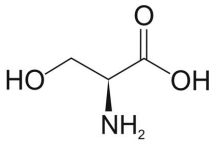
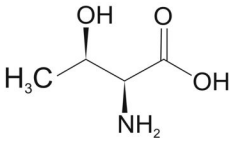
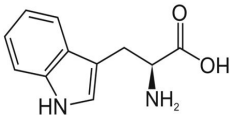
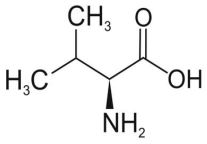
In *in vitro*-Kulturen weisen L.mj FE/BNI und L.mj 5ASKH eine vergleichbare Expression von *P46* auf (Abb. 3.35 A). Die Expression der P46-Transgene in Amastigoten ist ähnlich, mit verminderter Expression der P46-Variante aus FE/BNI (Abb. 3.35 B). Die geringere Expression hat jedoch keinen Effekt auf die Infektiosität der rekombinanten Parasiten *in*

vivo (Abb. 3.33) oder *ex vivo* (Abb. 3.34). Für die Selektionseffekte ist daher nicht der Expressionslevel von P46 entscheidend, sondern die Aminosäuresequenz des Proteins.

4.2 Die Primärstruktur von P46

Die Primärstruktur eines Proteins ist entscheidend für seine räumliche Faltung (Tertiärstruktur) und Funktion. Lipophile Aminosäuren (AS) befinden sich eher im Inneren des Proteins, abgewandt von der wässrigen Umgebung, während hydrophile Aminosäuren meist außen liegen. Kleine AS begünstigen eine gleichmäßige Sekundärstruktur, während große AS für einen Strukturumbruch sorgen können. Jede AS erhält spezifische Eigenschaften durch ihren Rest. Reaktive Reste wie die Amino-, Hydroxyl- oder Thiolgruppen begünstigen Bindungen mit anderen Molekülen und sind häufig in katalytischen Zentren von Enzymen zu finden. Cystein verfügt über die einzige Thiolgruppe im Repertoir kanonischer Aminosäuren. Durch die Fähigkeit der Thiolgruppen, Disulfidbrückenbindungen miteinander auszubilden, sind sie strukturbestimmend für viele Oberflächenproteine oder deren Domänen. Die drei näher untersuchten P46-Varianten unterscheiden sich in sechs AS und der Anzahl der Threonine in der C-terminalen Region: p.W17L, p.L99I, p.C108W, p.F215S, p.A244V, p.V324A, p.361T, p.362T (Tab. 4.1). Die Substitution der großen AS Tryptophan (W) oder Phenylalanin (F) gegen die kleinen AS Leucin (L) oder Serin (S) sowie eine variierende Anzahl von Threoninen (T) können die Proteinstruktur von P46 verändern. Funktionelle Konsequenzen können sich vor allem durch die Substitution der kleinen, polaren AS Cystein (C) gegen die große, unpolare AS Tryptophan (W) an Position 108 sowie der kleinen, polaren AS Serin (S) gegen die große, unpolare AS Phenylalanin an Position 215 ergeben.

Tab. 4.1: Zusammenstellung von Strukturformeln und Eigenschaften von 9 Aminosäuren.

Alanin (A)	Cystein (C)	Isoleucin (I)	Leucin (L)	Phenylalanin (F)
				
unpolar, hydrophob	polar, hydrophil	unpolar, hydrophob	unpolar, hydrophob	unpolar, hydrophob
Serin (S)	**Threonin (T)**	**Tryptophan (W)**	**Valin (V)**	
				
polar, hydrophil	polar, hydrophil	unpolar, hydrophob	unpolar, hydrophob	

Dass diese Positionen in einem für P46 funktionell wichtigen Bereich liegen, zeigen die Experimente mit P46-Deletionsmutanten. Nur die Parasiten, die den kompletten N-Terminus des P46 exprimierten, zeigten eine im Vergleich zu P46-Nullmutanten erhöhte Virulenz *in vitro* (Abb. 3.23). Bestätigend verringerte die N-terminale Fusion des Fluorochroms mCherry an P46 die virulenzsteigernde Wirkung des Proteins *ex vivo* (Abb. 3.21). Der C-Terminus scheint dagegen für die virulenzsteigernde Wirkung des P46 entbehrlich zu sein. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem P46 Ortholog P27 aus *L. infantum*. Die P27-Sequenz überschneidet sich, beginnend im N-Terminus, mit dem mittleren Bereich des P46-Proteins (Reiling et al., 2010). Dennoch weist das verkürzte Protein P27 eine P46-ähnliche Wirkung *ex vivo* auf (Abb. 3.25).

4.3 Auf den Spuren der Virulenz

Um ein Protein als Virulenzfaktor zu deklarieren, sollten die von Falkow (1988) definierten (abgeleitet von R. Kochs Postulaten aus dem 19. Jhd.) *Molecular Koch's* Postulate erfüllt sein, wonach der Organismus beim Verlust des putativen Virulenzfaktors eine verminderte Infektiosität aufweisen muss. Dieser Phänotyp sollte durch die Wiedereinsetzung des Faktors revidiert werden (Falkow, 1988).

Mit Hilfe der neuentwickelten Genaustauschstrategie gelang der Austausch beider P46-Allele durch Antibiotika-Resistenzgene (Abb. 3.1). Der Einsatz expressionsbegünstigender 5‘-3‘ UTRs eines Haushaltsgens (GA3PDH) sicherte eine adäquate Expression der Antibiotika-Resistenzgene. Da die UTR-Sequenzen aus *T. cruzi* stammten, wurde eine mögliche homologe Rekombination mit dem *L. major*-Genom an diesen Stellen vermieden. Der Genaustausch wurde durch PCR- sowie qRT-PCR-Analysen verifiziert (Abb. 3.2; 3.3). Für die Promastigoten-Kultur der Leishmanien war der P46-Genaustausch unerheblich. Der Verlust des Gens führte jedoch sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* zu eingeschränkter Virulenz (Abb. 3.6; 3.11 B) mit verminderter Parasitenlast in den popLKs infizierter Mäuse (Abb. 3.7). Damit wäre das erste Kriterium der *Molecular Koch‘s* Postulate erfüllt. Der P46-Genverlust geht mit einer Virulenzeinbuße einher.

Der P46-Genaustausch wurde in den P46-Nullmutanten durch episomale P46-Genkopien kompensiert. Die Parasiten wiesen daraufhin eine im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen höhere Infektiosität *ex vivo* auf (Abb. 3.11 B). Eine mit Wildtyp-Leishmanien vergleichbare Virulenz wurde *in vivo* jedoch nicht erreicht, sondern nur das Virulenzniveau der P46-Nullmutanten (Abb. 3.9 A&B). Eine ähnliche Diskrepanz zwischen der Infektiosität *in vivo* und *ex vivo* konnten Reiling *et al.* (2006) nachweisen. Nach klonaler Vereinzelung der aus Mauspassagen wiedergewonnen Leishmanien konnten zwei Klone mit antagonistischen Eigenschaften identifiziert werden. Während ein Klon infektiös *ex vivo*, jedoch nicht *in vivo* war, zeigte der andere Klon eine umgekehrte Infektiosität (Reiling et al., 2006). Eine mögliche Erklärung liegt in der Natur der Infektionsmodelle; den Labormausstämmen und den Knochenmarksmakrophagen. Die Makrophagen sind im Gegensatz zu Mäusen immunologisch ein Mikrosystem. Jegliche auf Zytokin-basierende Mechanismen und Einflüsse durch andere Immunzellen fehlen in diesem System. Infektionen von Makrophagen zeigen, ob ein rekombinanter Parasit intrazellulär überlebens- und proliferationsfähig ist. Ob dieser Parasit den Makrophagen anergisch gegen aktivierende Moleküle oder Zellkontakte macht, muss *in vivo* untersucht werden.

Die durch episomale Genkopien beschriebenen Effekte basieren vermutlich auf der Expressionsrate der Episomen in den Parasiten. Mit P46-Expressionskonstrukten transfizierte P46-Nullmutanten zeigten im Vergleich zu transfizierten Wildtyp-Zellen einen 40-fach höheren P46-RNA-Gehalt (Abb. 3.8). *Leishmania* spp. weisen keine Transkriptionskontrol-

le auf (Gomez et al., 2010). Die einzige Möglichkeit der Parasiten die Expression eines Gens zu erhöhen ist die Amplifikation dieses Gens (Victoir and Dujardin, 2002). So reguliert die Gendosis vermutlich indirekt die Wirkung des Genprodukts. Episomale Überexpression eines *single copy* Gens könnte sich daher nachteilig auf die ursprüngliche Funktion des Genprodukts auswirken. Der Virulenzfaktor Hsp100 wird wie P46 von nur einem Gen kodiert. Der avirulente Phänotyp von Hsp100-Nullmutanten konnte bei episomaler Überexpression des Gens nur teilweise wieder aufgehoben werden, was auf einen negativen Effekt der Überexpression hindeutet (Hübel et al., 1997).

Zu beachten ist zudem, dass die Virulenz kein absoluter Faktor ist und der Verlust mancher Gene einen quantitativen, aber nicht vollständigem Virulenzverlust zur Folge hat (Beverley, 2003), sodass das zweite Kriterium der *Molecular Koch's* Postulate in Leishmanien nicht immer erfüllt werden kann.

Trotz der verminderten Virulenz der P46-Nullmutanten und *P46-/-/+* Mutanten *in vivo* war die Anzahl persistierender Leishmanien in den popLKs infizierter Mäuse mit der von Wildtyp-Leishmanien vergleichbar (Abb. 3.10). Dagegen war die Parasitenlast der P46-Nullmutanten in der ersten Passage deutlich geringer im Vergleich zu *L. major* WT (Abb. 3.7). Die P46-Expression steht möglicherweise unter starkem Selektionsdruck, sodass der Null-Phänotyp *in vivo* instabil ist und es zu kompensatorischen genetischen und epigenetischen Änderungen in den Parasiten kommt. Eine erhöhten Parasitenlast bei gleichbleibender Pathogenität *in vivo* ist die Folge.

Die spontane Anpassung von avirulenten Nullmutanten an genutzte Infektionsmodelle ist bei Leishmanien nicht unüblich und konnte sowohl von Späth *et al.* (2004) bei L.mj *lpg2*$^{-}$ Mutanten als auch von Reiling *et al*. (2006) bei Hsp100-Nullmutanten beobachtet werden. Beide Gene kodieren Virulenzfaktoren. Die durch den Verlust von *Hsp100* avirulenten L.mj erlangten nach sukzessiver Mauspassage ihre Virulenz zum Teil wieder (Reiling et al., 2006). Auch L.mj *lpg2*-Mutanten verursachten nach einiger Zeit wieder Läsionsbildung bei BALB/c-Mäusen, und die aus den Läsionen isolierten Amastigoten waren in *ex vivo* Makrophagen proliferationsfähig (Spath et al., 2004).

4.4 Export von P46

Bekanntermaßen exportieren Pathogene unter anderem immunmodulatorische Faktoren in ihre Umgebung (Torrecilhas et al., 2012). Üblicherweise wird der Export eines Proteins in Eukaryoten durch eine spezielle N-terminale Signalsequenz spezifiziert. Jedoch fehlt solch eine Sequenz bei über 50% der von Leishmanien sezernierten Proteine (Silverman et al., 2008). Erst die Entdeckung von vesikulären Abschnürungen auf Leishmanien lieferte eine Erklärung für den Exportsignal-unabhängigen Proteinexport: Exosomen (Hassani et al., 2011; Silverman et al., 2008). *Leishmania*-Exosomen sind unter anderem mit Virulenzfaktoren wie Hsp70, -90, -100 und GP63 beladen. Die Beladung ist entscheidend für die immunmodulatorische Wirkung der Exosomen. Während die Exosomen von L.don WT immunsupprimierend wirken, fördern die Exosomen von L.don *Hsp100-/-* aufgrund ihrer anomalen Beladung eine anti-leishmaniale Th1-Immunantwort (Silverman et al., 2010b).

P46 wurde im Zytosol von *L. major*-infizierten Makrophagen nachgewiesen, sowohl durch das anti-P46 Serum in fixierten Makrophagen (Reiling et al., 2010) als auch durch die Fusionsproteine P46::mCH und mCH::P46 in lebenden Makrophagen (Abb. 3.20 C&D). Ein von Exosomen abhängiger Export des Proteins konnte durch den Nachweis von P46 in aufgereinigten Exosomen gezeigt werden (Abb. 3.17). Es wird unabhängig von dem Virulenzfaktor Hsp100 in die Exosomen geladen, da auch Hsp100-Nullmutanten P46 in ihren Exosomen aufweisen (Abb. 3.17). Dies erklärt auch, warum P46 durch Komplementations-*Screening* in der Hsp100-Nullmutante als Virulenzfaktor identifiziert werden konnte. Durch seine virulenzsteigernde Wirkung und Unabhängigkeit von Hsp100 konnte es den avirulenten Phänotyp der Hsp100-Nullmutanten kompensieren (Reiling et al., 2010).

Dass die nachgewiesenen Proteine tatsächlich aus Exosomen stammen, wurde anhand des von einer Membran vermittelten Schutzes der Proteine vor einem Trypsin-Abbau gezeigt (Abb. 3.15 A). Zudem konnten die aufgereinigten Exosomen direkt durch RE-Mikroskopie bildlich dargestellt werden (Abb. 3.16). Ähnliche Bilder zeigten Skog *et al.* (2008) von Exosomen an Glioblastoma-Zellen (Skog et al., 2008). Leishmanien können die Freisetzung ihrer Exosomen als Antwort auf die Umgebung modifizieren. Bei erhöhter Temperatur etwa, wie der im Säugetierwirt, wird fast die dreifache Menge an Exosomen freigesetzt (Silverman et al., 2010a). Auch bei Promastigoten-Kulturen von *L. major* induzierte

ein Temperaturanstieg eine vermehrte Freisetzung von Exosomen, die durch den Nachweis der Proteine Hsp90 und Hsp100 bestätigt wurde (Abb. 3.14 A&B).

Zudem konnte für die isolierten Exosomen allgemein eine pro-parasitische Wirkung gezeigt werden. Die Präinkubation der Makrophagen mit isolierten Exosomen vor der Infektion mit L.mj WT förderte höhere Parasitenlasten in den Zellen (Abb. 3.18). Die pro-parasitische Wirkung wurde sogar noch verstärkt, wenn die Exosomen aus einer 37°C-Kultur von L.mj WT isoliert wurden. Das P46 in der Exosomenbeladung scheint jedoch keine große Rolle für die immunmodulatorische Wirkung der Exosomen zu spielen: aus P46-Nullmutanten isolierte Exosomen zeigten im Vergleich zu WT-Exosomen geringere, aber immer noch adäquate pro-parasitische Wirkung (Abb. 3.18).

Fazit

P46 konnte als potenter Virulenzfaktor bestätigt werden. Sein Exosomen-abhängiger Exportweg und die Lokalisation in der Wirtszelle deuten auf Interaktionen mit dem Wirt hin. Seine virulenzsteigernde Wirkung scheint P46 nicht durch die Unterdrückung einer anti-leishmanialen Th1-Immunantwort zu entfalten (Reiling et al., 2010), sondern durch die Begünstigung einer Wirtsanpassung. Der Selektionsdruck im Wirt hat vermutlich zur Ausprägung unterschiedlicher P46-Primärstrukturen geführt. Bestätigend zeigt sich eine dem Vorkommen unterschiedlicher Reservoirwirte entsprechende geographische Verteilung der P46-Varianten. Die Infektionsversuche von Elfari *et al*. (2005) untermauern diese Theorie. Waki *et al.* (2007) vermuten, dass die Persistenz im Makrophagen viel eher die evolutionäre Anpassung der *Leishmania* spp. bestimmt als der Aufenthalt in der Mücke, da der Langzeitwirt der Leishmanien nicht die Sandmücke ist, sondern das Säugetier (Waki et al., 2007). Die Wirts-spezifische Immunantwort und die Unterschiede zwischen *L.major*-Isolaten beeinflussen die klinische Manifestation einer Infektion durch *L. major*. Jedoch ist unklar, was die einzelnen Faktoren einer endemischen Umgebung dazu beitragen können (Al-Jawabreh et al., 2008). P46 könnte der erste beschriebene Faktor sein, der bei der Anpassung an den Reservoirwirt eine Rolle spielt.

Ausblick

Es wäre reizvoll zu sehen wie sich die P46-Sequenzvarianten in natürlichen Reservoirwirten wie *R. opimus*, *P. obesus*, *A. niloticus*, *Meriones spp*. und *Tatera spp*. verhalten. Die Selektionsstudien mit P46-Varianten aus L.mj 5ASKH, L.mj FE/BNI und L.mj MAJ-48 wurden mit Wildtyp-Zellen als Hintergrund durchgeführt. Die Präsens der P46-Allele in den Ursprungszellen könnte die Selektionsstudien durch die Oligomerisierung (Reiling et al., 2010) mit den transgenen Varianten beeinflusst haben. Um die Bedeutung der Sequenzunterschiede für die Wirkung von P46 zu untermauern, müssten die Selektionsstudien mit transfizierten P46-Nullmutanten durchgeführt werden. Dazu müsste allerdings zunächst eine besser dosierte Expression von P46 etabliert werden.

Literaturverzeichnis

Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., and Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major. J Immunol *169*, 898-905.

Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., and Sacks, D.L. (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. Science *324*, 265-268.

Al-Jawabreh, A., Diezmann, S., Muller, M., Wirth, T., Schnur, L.F., Strelkova, M.V., Kovalenko, D.A., Razakov, S.A., Schwenkenbecher, J., Kuhls, K.*, et al.* (2008). Identification of geographically distributed sub-populations of Leishmania (Leishmania) major by microsatellite analysis. BMC Evol Biol *8*, 183.

Alexander, J., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (1998). Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. J Immunol *161*, 6794-6801.

Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., and den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One *7*, e35671.

Antinori, S., Schifanella, L., and Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis *31*, 109-118.

Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., and Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. Infect Immun *58*, 779-787.

Ashford, R.W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International journal for parasitology *30*, 1269-1281.

Awasthi, A., Mathur, R.K., and Saha, B. (2004). Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res *119*, 238-258.

Beverley, S. (2003). Genetic and genomic approaches to the analysis of Leishmania virulence. In Molecular medical parasitology, J.J. Marr, T.W. Nilsen, and R. Komuniecki, eds. (Academic Press), pp. 111-122.

Beverley, S.M., and Turco, S.J. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania [In Process Citation]. Trends Microbiol *6*, 35-40.

Bogdan, C., Gessner, A., and Rollinghoff, M. (1993). Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. Immunobiology *189*, 356-396.

Bogdan, C., and Rollinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol *28*, 121-134.

Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., and Mosser, D.M. (1995). Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. J Immunol *155*, 3102-3111.

Chang, K.P., and McGwire, B.S. (2002). Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence. Kinetoplastid Biol Dis *1*, 1.

Chang, K.P., Reed, S.G., McGwire, B.S., and Soong, L. (2003). Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop *85*, 375-390.

Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., and Chang, K.P. (1989). Surface acid proteinase (gp63) of Leishmania mexicana. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. J Biol Chem *264*, 7483-7489.

Chen, D.Q., Kolli, B.K., Yadava, N., Lu, H.G., Gilman-Sachs, A., Peterson, D.A., and Chang, K.P. (2000). Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in Leishmania amazonensis: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. Infect Immun *68*, 80-86.

Clos, J., and Krobitsch, S. (1999). Heat shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. Am Zool *39*, 848-856.

Corradin, S., Ransijn, A., Corradin, G., Roggero, M.A., Schmitz, A.A., Schneider, P., Mauel, J., and Vergeres, G. (1999). MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the Leishmania major surface protease leishmanolysin (gp63). The Journal of biochemical chemistry *274*, 7.

Cruz, A., and Beverley, S.M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. Nature *348*, 171-173.

Cupolillo, E., Brahim, L.R., Toaldo, C.B., de Oliveira-Neto, M.P., de Brito, M.E., Falqueto, A., de Farias Naiff, M., and Grimaldi, G., Jr. (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol *41*, 3126-3132.

David, C.V., and Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatologic therapy *22*, 491-502.

Denise, H., McNeil, K., Brooks, D.R., Alexander, J., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (2003). Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for Leishmania mexicana virulence in vivo. Infect Immun *71*, 3190-3195.

Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. J Exp Med *185*, 2061-2068.

Desjeux, P. (1992). Human leishmaniases: epidemiology and public health aspects. World Health Stat Q *45*, 267-275.

Dostalova, A., and Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors *5*, 276.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol *72*, 8463-8471.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC bioinformatics *5*, 113.

Elfari, M., Schnur, L.F., Strelkova, M.V., Eisenberger, C.L., Jacobson, R.L., Greenblatt, C.L., Presber, W., and Schonian, G. (2005). Genetic and biological diversity among populations of Leishmania major from Central Asia, the Middle East and Africa. Microbes Infect *7*, 93-103.

Faiman, R., Abbasi, I., Jaffe, C., Motro, Y., Nasereddin, A., Schnur, L.F., Torem, M., Pratlong, F., Dedet, J.P., and Warburg, A. (2013). A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of Leishmania major. PLoS Negl Trop Dis *7*, e2058.

Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev Infect Dis *10 Suppl 2*, S274-276.

Gantt, K.R., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Goldman, T.L., Recker, T.J., Miller, M.A., and Wilson, M.E. (2003). Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. J Immunol *170*, 2613-2620.

Giemsa, G. (1902). Färbemethoden für Malariaparasiten. Zentralbl Bakteriologie *31*, 2.

Giemsa, G. (1905). Bemerkungen zur Färbung der Spirochate pallida (Schaudinn). Deutsche Medizinische Wochenschrift *31*, 2.

Giemsa, G. (1907). Beitrag zur Färbung der Spirochate pallida (Schaudinn) in Ausstrichpräparaten. Deusche Medizinische Wochenschrift *33*, 4.

Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., and Rodriguez, M.A. (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. J Biomed Biotechnol *2010*, 726045.

Gomez, M.A., and Olivier, M. (2010). Proteases and phosphatases during Leishmania-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis. Virulence *1*, 314-318.

Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., and Desjardins, M. (2008). Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. Cell Microbiol *10*, 100-111.

Halle, M., Gomez, M.A., Stuible, M., Shimizu, H., McMaster, W.R., Olivier, M., and Tremblay, M.L. (2009). The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. J Biol Chem *284*, 6893-6908.

Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A., and Olivier, M. (2011). Temperature-induced protein secretion by Leishmania mexicana modulates macrophage signalling and function. PLoS One *6*, e18724.

Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med *169*, 59-72.

Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K.E., Descoteaux, A., and Rasmusson, B. (2003). Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. Biochem Biophys Res Commun *302*, 653-658.

Hübel, A., Krobitsch, S., Horauf, A., and Clos, J. (1997). Leishmania major Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. Mol Cell Biol *17*, 5987-5995.

Ilg, T., Demar, M., and Harbecke, D. (2001). Phosphoglycan repeat-deficient Leishmania mexicana parasites remain infectious to macrophages and mice. J Biol Chem *276*, 4988-4997.

Isnard, A., Shio, M.T., and Olivier, M. (2012). Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front Cell Infect Microbiol *2*, 72.

Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., and McMaster, W.R. (2002). Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. Molecular and biochemical parasitology *120*, 33-40.

Joshi, P.B., Sacks, D.L., Modi, G., and McMaster, W.R. (1998). Targeted gene deletion of Leishmania major genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63) [In Process Citation]. Mol Microbiol *27*, 519-530.

Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol *9*, 604-615.

Kelleher, M., Bacic, A., and Handman, E. (1992). Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from Leishmania major promastigotes. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 6-10.

Kelly, J.M., Das, P., and Tomás, A.M. (1994). An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. Mol Biochem Parasitol *65*, 51-62.

Kima, P.E. (2007). The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. Int J Parasitol *37*, 1087-1096.

Krobitsch, S., and Clos, J. (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. Cell Stress Chaperones *4*, 191-198.

Kulkarni, M.M., McMaster, W.R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D.M., and McGwire, B.S. (2006). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. Mol Microbiol *62*, 1484-1497.

Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? Trends Microbiol *11*, 210-214.

Le Blancq, S.M., Schnur, L.F., and Peters, W. (1986). Leishmania in the Old World: 1. The geographical and hostal distribution of L. major zymodemes. Trans R Soc Trop Med Hyg *80*, 99-112.

Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C., and Rollinghoff, M. (1998). The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. Int Arch Allergy Immunol *115*, 191-202.

Mangoni, M.L., Saugar, J.M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., and Rivas, L. (2005). Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. J Biol Chem *280*, 984-990.

Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, E., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013). Leishmania evades host immunity by inhi-

biting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. Cell Host Microbe *14*, 15-25.

Mathur, R.K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B., and Saha, B. (2004). Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. Nat Med *10*, 540-544.

McGwire, B.S., Chang, K.P., and Engman, D.M. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease gp63. Infect Immun *71*, 1008-1010.

Moore, K.J., and Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis. J Immunol *152*, 2930-2937.

Mottram, J.C., Souza, A.E., Hutchison, J.E., Carter, R., Frame, M.J., and Coombs, G.H. (1996). Evidence from disruption of the lmcpb gene array of Leishmania mexicana that cysteine proteinases are virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 6008-6013.

Mundodi, V., Kucknoor, A.S., and Gedamu, L. (2005). Role of Leishmania (Leishmania) chagasi amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. BMC Mol Biol *6*, 3.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. Lancet *366*, 1561-1577.

Olivier, M., Baimbridge, K.G., and Reiner, N.E. (1992a). Stimulus-response coupling in monocytes infected with Leishmania. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. J Immunol *148*, 1188-1196.

Olivier, M., Brownsey, R.W., and Reiner, N.E. (1992b). Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with Leishmania donovani is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 7481-7485.

Olivier, M., Romero-Gallo, B.J., Matte, C., Blanchette, J., Posner, B.I., Tremblay, M.J., and Faure, R. (1998). Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression. J Biol Chem *273*, 13944-13949.

Ommen, G., Lorenz, S., and Clos, J. (2009). One-step generation of double-allele gene replacement mutants in Leishmania donovani. Int J Parasitol *39*, 541-546.

Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. The Journal of cell biology *101*, 942-948.

Pavli, A., and Maltezou, H.C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. Int J Infect Dis *14*, e1032-1039.

Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science *321*, 970-974.

Pollock, K.G., McNeil, K.S., Mottram, J.C., Lyons, R.E., Brewer, J.M., Scott, P., Coombs, G.H., and Alexander, J. (2003). The Leishmania mexicana cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. J Immunol *170*, 1746-1753.

Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J.A., and Dedet, J.P. (2009). Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. Trop Med Int Health *14*, 1071-1085.

Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, W.Q., Ferguson, M.A., Brimacombe, J.S., and Liew, F.Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 10984-10989.

Puentes, S.M., Sacks, D.L., da Silva, R.P., and Joiner, K.A. (1988). Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. J Exp Med *167*, 887-902.

Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. Molecular biology of the cell *8*, 2631-2645.

Reiling, L., Chrobak, M., Schmetz, C., and Clos, J. (2010). Overexpression of a single *Leishmania major* gene is sufficient to enhance parasite infectivity in vivo and in vitro. Mol Microbiol *76*, **1175-1190**.

Reiling, L., Jacobs, T., Kroemer, M., Gaworski, I., Graefe, S., and Clos, J. (2006). Spontaneous recovery of pathogenicity by Leishmania major hsp100-/- alters the immune response in mice. Infect Immun *74*, 6027-6036.

Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., and Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis *7*, 581-596.

Requena, J.M., Alonso, C., and Soto, M. (2000). Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. Parasitol Today *16*, 246-250.

Ritter, U., Mattner, J., Rocha, J.S., Bogdan, C., and Korner, H. (2004). The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. Microbes Infect *6*, 559-565.

Rogers, M., Kropf, P., Choi, B.S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P., and Muller, I. (2009). Proteophosophoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. PLoS Pathog *5*, e1000555.

Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., and Bates, P.A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature *430*, 463-467.

Rohousová, I., and Volf, P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. Folia Parasitologica *53*, 161-171.

Russell, D.G., and Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of Leishmania promastigotes in attachment to macrophages. J Immunol *136*, 2613-2620.

Sacks, D., and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol *2*, 845-858.

Sacks, D.L. (2001). Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Cell Microbiol *3*, 189-196.

Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 406-411.

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., and Sher, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med *168*, 1675-1684.

Seay, M.B., Heard, P.L., and Chaudhuri, G. (1996). Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of Leishmania mexicana amazonensis promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. Infect Immun *64*, 5129-5137.

Selzer, P.M., Chen, X., Chan, V.J., Cheng, M., Kenyon, G.L., Kuntz, I.D., Sakanari, J.A., Cohen, F.E., and McKerrow, J.H. (1997). Leishmania major: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. Exp Parasitol *87*, 212-221.

Shaw, J. (2007). The leishmaniases--survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz *102*, 541-547.

Silva-Ameida, M., Pereira, B.A.S., Ribeiro-Guimaraes, M.L., and Alves, C.R. (2012). Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals. Parasites&Vectors *5*.

Silverman, J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L.J., and Reiner, N.E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. Genome Biol *9*, R35.

Silverman, J.M., Clos, J., de'Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J., and Reiner, N.E. (2010a). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. J Cell Sci *123*, 842-852.

Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K*., et al.* (2010b). Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. J Immunol *185*, 5011-5022.

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol *10*, 1470-1476.

Spath, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 9258-9263.

Spath, G.F., Lye, L.F., Segawa, H., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2004). Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of Leishmania major able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. Infect Immun *72*, 3622-3627.

Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S., Hahn, W.C., Sharp, P.A*., et al.* (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. Rna *9*, 493-501.

Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nature reviews Immunology *9*, 581-593.

Torrecilhas, A.C., Schumacher, R.I., Alves, M.J., and Colli, W. (2012). Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. Microbes Infect *14*, 1465-1474.

Turco, S.J., Spath, G.F., and Beverley, S.M. (2001). Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species. Trends in parasitology *17*, 223-226.

Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G.C., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Johnson, P.J. (2013). Trichomonas vaginalis exosomes deliver cargo to host cells and mediate hostratioparasite interactions. PLoS pathogens *9*, e1003482.

van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D.*, et al.* (2006). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 13837-13842.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. J Immunol *173*, 6521-6525.

Victoir, K., and Dujardin, J.C. (2002). How to succeed in parasitic life without sex? Asking Leishmania. Trends Parasitol *18*, 81-85.

Waki, K., Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K., Akman, L., Kawazu, S., Lin, C.P., and Chang, K.P. (2007). Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic protists: Leishmania-specific informative sites in hydrophilic loops of trans- endoplasmic reticulum N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. Eukaryot Cell *6*, 198-210.

Wang, H., Ge, Z., Walsh, S.T., and Parthun, M.R. (2012). The human histone chaperone sNASP interacts with linker and core histones through distinct mechanisms. Nucleic Acids Res *40*, 660-669.

Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., and Fehse, B. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. Mol Ther *16*, 698-706.

Yao C, D.J., Wilson ME (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. Molecular and biochemical parasitology *132*, 16.

Yao, C., Donelson, J.E., and Wilson, M.E. (2007). Internal and surface-localized major surface proteases of Leishmania spp. and their differential release from promastigotes. Eukaryot Cell *6*, 1905-1912.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Verfasser, Verlag, Ausgabe und Seite des benutzten Werkes bzw. der benutzten Publikation kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Arbeit bisher nicht einem anderen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe.

_____ Hamburg, den 14. April 2014

E. Bifeld