

**Genetische Grundlagen der Wirkstoff-Resistenz  
des Parasiten *Leishmania donovani* (Ross, 1903)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

**Julia Eick**

aus Hamburg

Hamburg, 2017

Genehmigt vom Fachbereich der Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

auf Antrag von PD Dr. Joachim Clos

Weiterer Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Julia Kehr

Tag der Disputation: 24. November 2017

Hamburg, den 30. November 2017

Diese Arbeit wurde zwischen Mai 2014 und Mai 2017 in der Arbeitsgruppe und unter 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  
Sektion Molekularbiologie und Immunologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

2. Gutachterin: Prof. Dr. Julia Kehr  
Biozentrum Klein Flottbek  
Abteilung Molekulare Pflanzengenetik  
Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Leishmaniosen	5
1.2. Der Lebenszyklus der Leishmanien	6
1.3. Krankheitsbild der Leishmaniosen	7
1.4. Therapie von Leishmaniosen	8
1.5. Das Genom der Leishmanien	10
1.6. Resistenzmechanismen	11
1.7. Miltefosin-Transporter	16
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Material	19
3.1.1. Organismen und Stämme	19
3.1.2. Verwendete Geräte und Kits	20
3.1.3. Nährmedien und Antibiotika	21
3.1.4. Benutzte Oligonukleotide	22
3.1.5. Benutzte Plasmide	23
3.1.6. Benutzte Antikörper	24
3.1.7. Benutzte Puffer und Lösungen	24
3.2 Methoden	25
3.2.1. Zellkultur	25
3.2.1.1. Kultivierung von Leishmanien	25
3.2.1.2. Kryokonservierung von Leishmanien	25
3.2.1.3. Stocklösungen der Leitstrukturen herstellen	25
3.2.1.4. Wachstumskurven/ Dosis-Wirkungskurven	26
3.2.1.5. Selektion von spontanen Resistenzen in Leishmania Promastigoten	26
3.2.1.6. Isolation von Knochenmarksmakrophagen	27
3.2.1.7. Ex vivo Infektionsstudien	28
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	29
3.2.2.1. Transfektion von Leishmanien	29
3.2.2.2. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	30
3.2.2.3. Isolierung reiner Plasmid-DNA aus Leishmanien	30
3.2.2.4. DNA-Sequenzierung	31
3.2.2.5. Isolierung von Cosmid-DNA aus einer Bakterienkultur	31

3.2.2.6. Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	31
3.2.2.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung	32
3.2.2.8. Cos-Seq und Next Generation Sequencing	32
3.2.2.9. Polymerase Kettenreaktion	34
3.2.2.10. Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.2.11. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
3.2.2.12. Restriktionsverdau von Plasmid DNA	35
3.2.2.13. Ligation	35
3.2.2.14. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (TaqMan qRT-PCR)	36
3.2.2.15. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (SYBR Green qRT-PCR)	37
3.2.3. Proteinbiochemische Methoden	37
3.2.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.3.2. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung	38
3.2.3.3. Western Blot	38
3.2.3.4. Immunoblot	39
3.2.3.5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	39
3.2.4. Datenverarbeitung	40
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1. Analyse der Leitstrukturen	41
4.1.1. Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50)	41
4.1.2. Hitzeschock-Antwort auf die Behandlung mit den Leitstrukturen	43
4.1.3. Wachstumskinetik der biotinylierten Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002	45
4.2. Erworbenen Resistenzen	46
4.2.1. Cosmid-Sequenzierung (Cos-Seq)	46
4.2.2. Next Generation Sequencing	49
4.2.3. In vitro Resistenzbestimmung	52
4.2.4. Test zur Bestimmung möglicher Kreuzresistenzen	55
4.2.5. In vitro Infektiosität der resistenten Leishmanien	56
4.3 Spontane Resistenzen	58
4.3.1. Selektion von spontan resistenten Leishmania Promastigoten	58
4.3.2. In vitro Resistenzbestimmung	59
4.3.3. Test zur Bestimmung möglicher Kreuzresistenzen	62
4.3.4. In vitro Infektiosität der spontan resistenten Leishmanien	63
4.3.5. Next Generation Sequencing	65
4.3.6. Herstellung von LdMT gene add back Mutanten	67

4.3.7. Verifizierung der gene add back Mutanten auf mRNA-Ebene	67
4.3.8. In vitro Funktionsanalyse der gene add back Mutanten	68
<b>5. Diskussion</b>	<b>72</b>
5.1. Analyse der Leitstrukturen	72
5.1.1. Effektivität der Leitstrukturen bei der Behandlung von <i>L. donovani</i> Promastigoten	72
5.1.2. Wirkung der Leitstrukturen auf <i>L. donovani</i> Promastigoten	73
5.1.3. Auswirkung der Biotinylierung der Leitstrukturen	74
5.1.4. Hitzeschock-Antwort der Leishmanien auf die Behandlung mit den Leitstrukturen	74
5.2. Resistente <i>L. donovani</i> Promastigote	76
5.2.1. Miltefosin	76
5.2.1.1. Erfolgreiche in vitro Selektion resistenter Promastigoten unter Miltefosin	76
5.2.1.2. Miltefosin-Resistenz vermittelt in Promastigoten keine Kreuzresistenzen	77
5.2.1.3. Genetische Grundlagen der Miltefosin-Resistenz	78
5.2.1.4. Punktmutationen im LdMT führen zu Miltefosin-resistenten Promastigoten	79
5.2.1.5. LdMT gene add back Mutanten sind wieder sensitiv gegenüber Miltefosin	81
5.2.1.6. Verminderte Infektiosität von Miltefosin-resistenten Leishmanien	81
5.2.1.7. Keine Miltefosin-Resistenz der intrazellulären Amastigoten	83
5.2.2. Miltefosin-Derivate (NMT-A001 und NMT-A002)	83
5.2.2.1. Erfolgreiche in vitro Selektion resistenter Promastigoten unter NMT-A001 und NMT-A002	84
5.2.2.2. NMT-A001- und NMT-A002-Resistenzen vermitteln in Promastigoten keine Kreuzresistenzen gegen andere Wirkstoffklassen	84
5.2.2.3. Punktmutationen im LdMT führen zu NMT-A001- und NMT-A002-Resistenzen	85
5.2.2.4. Ähnlichkeiten der genetischen Grundlage der NMT-A002-Resistenz zur Miltefosin-Resistenz	86
5.2.2.5. Die spontane Resistenz gegen NMT-A001 vermindert die Infektiosität und führt nicht zu resistenten intrazellulären Amastigoten	86
5.2.2.6. Erhalt der in vitro Infektiosität von spontan NMT-A002-resistenten <i>L. don</i> 1SR87	
5.2.2.7. Die erworbene Resistenz gegen NMT-A002 vermindert die Infektiosität der Parasiten	87
5.2.2.8. NMT-A002-Resistenz überträgt sich nicht auf intrazelluläre Amastigote	88
5.2.3. Antimon (SbIII)	89
5.2.3.1. Genetische Grundlagen der SbIII-resistenten <i>L. don</i> BPK091[pcos190]	89
5.2.3.2. Verminderte Infektiosität der SbIII-resistenten <i>L. don</i> BPK091[pcos190] und keine Resistenz als Amastigoten	90
5.2.4. NMT-C0074	91

5.2.4.1. Erfolgreiche in vitro Selektion von NMT-C0074-resistenten Promastigoten	92
5.2.4.2. NMT-C0074-Resistenz vermittelt in Promastigoten keine Kreuzresistenzen	92
5.2.4.3. Genetische Grundlagen der NMT-C0074-Resistenz	93
5.2.4.4. Spontan NMT-C0074-resistente L.don zeigen SNPs in Folat-Transportern	94
5.2.4.5. Erhöhte Infektiosität durch NMT-C0074-Resistenz	95
5.2.4.6. Resistenz gegen NMT-C0074 von L.donBPK091[pcos190] bleibt auch in intrazellulären Amastigoten erhalten	96
5.2.4.7. Spontane Resistenz NMT-C0074 bleibt nicht in intrazellulären Amastigoten erhalten	97
5.2.5. NMT-H0080	98
5.2.5.1. In vitro Selektion von NMT-H0080-resistenten Leishmanien nur unter IC50 möglich	98
5.2.5.2. Genetische Grundlagen der NMT-H0080 Resistenz	99
Fazit	100
<b>6. <u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>101</b>
<b>7. <u>Veröffentlichungen</u></b>	<b>114</b>
<b>8. <u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>115</b>

## Zusammenfassung

Leishmanien sind humanpathogene, parasitische Protozoa und Auslöser verschiedener Krankheitsformen, die kollektiv Leishmaniosen genannt werden. Leishmaniosen sind Armut-assoziierte Erkrankungen und zählen zu den wichtigsten vernachlässigten tropischen Infektionskrankheiten. Der schwerste Krankheitsverlauf, viszerale Leishmaniose, führt unbehandelt zum Tod der Patienten. Die zur Verfügung stehenden Medikamente zeigen starke Nebenwirkungen, wie Teratogenität und Toxizität. Ein weiteres großes Problem bei der Behandlung von Leishmaniosen stellt die wachsende Anzahl therapie-resistenter Leishmaniosen dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse von *Leishmania donovani* im Bezug auf deren Fähigkeit, Resistenzen gegen neue, experimentelle Wirkstoffe zu entwickeln, die im Rahmen des NMTrypl (**New Medicines for Trypanosomatidic Infections**) Projektes hergestellt wurden. Die zur Analyse verwendeten Leitstrukturen gehören zu verschiedenen Wirkstoffklassen. Bei NMT-A001 und NMT-A002 handelt es sich um Miltefosin-Derivate, NMT-C0074 ist ein Pteridin-Reduktase-Inhibitor und NMT-H0080 gehört zur Klasse der Flavonoide. Die erhaltenen resistenten Promastigoten stellen ein gutes Werkzeug dar, um das Potential zur Resistenzbildung schon früh in der Entwicklung neuer Wirkstoffe zu ergründen. Daher erfolgte hier sowohl eine Selektion auf dominante Resistenzmarker, als auch eine Selektion auf spontane Resistenzen in *Leishmania*-Promastigoten.

Bei der Sequenz-Analyse durch *Next-Generation-Sequencing* (NGS) wurden in spontan Miltefosin-resistenten Parasiten Punktmutationen im Miltefosin-Transporter beobachtet. Analog dazu zeigten spontan NMT-C0074-resistente Parasiten Punktmutationen in verschiedenen Pteridin- und Biopterin/Folat-Transportern. Für die Identifizierung dominanter Resistenzmarker wurde nach der funktionellen Komplementation eine Analyse der selektierten Cosmide mit NGS durchgeführt. Die unter NMT-C0074 selektierten Cosmide deuten darauf hin, dass die Parasiten mit einer Bypass-Reaktion den Selektionsdruck umgehen. Die resistenten Promastigoten waren nicht kreuzresistent gegen andere Wirkstoffklassen. Für NMT-H0080 konnte nur eine eingeschränkte Resistenzentwicklung beobachtet werden, was für eine mögliche therapeutische Anwendungen vielversprechend ist. Es wurden Auswirkungen der Resistenz auf die Infektiosität der Parasiten beobachtet, wobei nur die dominant NMT-C0074-resistenten Parasiten ein gesteigertes Überleben/Proliferation und eine Resistenz als intrazelluläre Amastigote zeigten. Diese Beobachtung schränkt die Anwendungsmöglichkeit von NMT-

C0074 ein. Die hier identifizierten Gene geben Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen und molekulare Ziele der hier erstmal getesteten Leitstrukturen.

## Abstract

*Leishmania* spp. are human-pathogenic, protozoan parasites and the causative agents of the various forms of Leishmaniasis in humans. Leishmaniasis is a neglected, poverty-related tropical disease. The most severe form is the visceral leishmaniasis, which has a lethal outcome if left untreated. Available drugs against leishmaniasis show severe side effects such as teratogenicity and toxicity. Moreover, rising numbers of therapy resistant cases contribute to the problems.

The aim of this thesis was the risk assessment of *Leishmania donovani* (*L.don*) to become resistant to anti-parasitic compounds generated by the members of the NMTrypl (**New Medicines for Trypanosomatidic Infections**) consortium, as well as the identification of possible resistance mechanisms. The compounds, which were used for the selection pressure on *L.don*, were from different substance classes: NMT-A001 and NMT-A002 are miltefosine derivatives, NMT-C0074 is a pteridin reductase inhibitor and NMT-H0080 is a flavonoid.

Selection for resistant promastigotes is a useful tool to assess the resistance potential of the parasites against a compound of interest in an early phase of compounds testing. The selection for dominant resistance markers was performed using *L.don* promastigotes bearing random cosmids from a genomic DNA library whereas the selection for spontaneous resistance was performed using wildtype *L.don* promastigotes. Whole genome sequencing analysis of the spontaneous miltefosine-resistant promastigotes revealed single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the miltefosine transporter gene. Treatment of *L.don* promastigotes with NMT-C0074 selected for parasites with SNPs in the pteridin and biopterin/folate transporter genes. To identify dominant resistant markers, parasites selected for functional complementation were subjected to cosmid isolation, which were subsequently sequenced using Next Generation Sequencing. Results from the NMT-C0074-resistant parasites indicate a bypass mechanism, which allows the parasites to deal with the drug pressure. Cross-resistance of NMT-C0074-resistant parasites to parasites selected with other compound classes was not observed. Selection with NMT-H0080 led only to limited resistance which makes this compound promising in terms of therapeutical use.

The parasites' infectivity was affected by the resistance phenotype. However, only NMT-C0074-resistant parasites harboring cosmids showed an increased infectivity, intracellular survival and resistance as intracellular parasites. This result diminishes the therapeutical

usability of NMT-C0074. With these first tests of the new compounds, I could identify potential resistance markers that may be used in clinical testing.

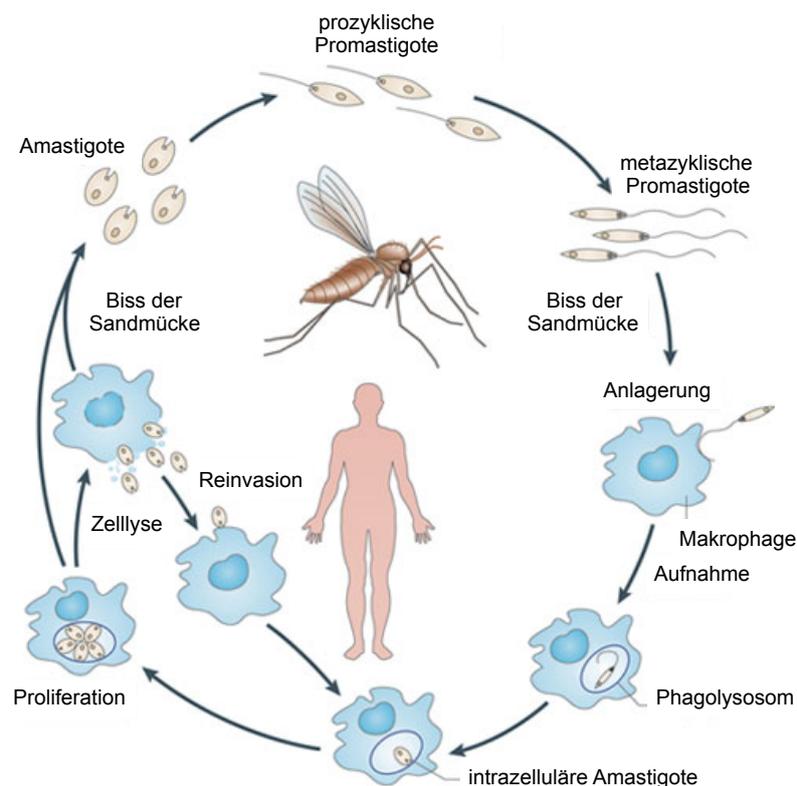
# 1. Einleitung

## 1.1. Leishmaniosen

Leishmaniosen sind parasitäre Infektionserkrankungen, die durch Erreger der Gattung *Leishmania* (*L.*) hervorgerufen werden. Leishmanien wurden 1903 zuerst von W.B. Leishman und C. Donovan unabhängig voneinander beschrieben (Fulton und Joyner, 1949). Es sind über 30 *Leishmania* Spezies bekannt, die in die Untergattungen *Leishmania Leishmania* und *Leishmania Viannia* eingeteilt werden.

Es handelt sich bei Leishmanien um protozoische Parasiten, die zur Ordnung Kinetoplastidae gehören. Kennzeichen der Kinetoplastidae ist der Kinetoplast, ein Organell, das die mitochondriale DNA der Parasiten enthält (Ceccarelli, et al., 2017).

Leishmaniosen sind in 98 Ländern auf 5 Kontinenten endemisch. 2012 wurden bei geschätzten 200.000 bis 390.000 Fällen von viszeraler Leishmaniose (VL) über 20.000



**Abb.1 Biphasischer Lebenszyklus der Leishmanien.** Bei der Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke werden promastigote Leishmanien auf den Wirt übertragen. Im Blut werden sie von Makrophagen aufgenommen, wo sich die Leishmanien im Phagosom der Makrophagen zu Amastigoten umwandeln. Durch die Vermehrung der Amastigoten wird die Wirtszelle zerstört und die Amastigoten werden freigesetzt. Es können neue Makrophagen infiziert werden. Werden bei einer Blutmahlzeit einer Sandmücke Amastigoten mit dem Blut aufgenommen, wandeln sich die Leishmanien im Darm der Sandmücke wieder in prozyklische Promastigoten um. Somit ist der Lebenszyklus der Leishmanien geschlossen und kann von neuem beginnen (modifiziert nach Kaye und Scott, 2011)

Todesfällen gezählt. Für die kutane Leishmaniose (CL) wurden zwischen 700.000 und 1,2 Millionen Fälle geschätzt (Alvar, et al., 2012). Insgesamt leben 350 Millionen Menschen in Regionen in denen die Gefahr einer *Leishmania*-Infektion besteht.

Leishmaniosen gehören zu den wichtigsten vernachlässigten tropischen Infektionskrankheiten. Leishmaniosen sind außerdem Armut-assoziierte Erkrankungen. In den endemischen Gebieten tragen Faktoren wie primitive Behausungen ohne Mückenschutz, Mangelernährung, Ko-Infektionen sowie erschwerter Zugang zu Diagnose und Behandlung von Leishmaniosen zu der hohen Anzahl erkrankter Personen bei (Alvar, et al., 2006).

Die Übertragung von Leishmanien erfolgt durch weibliche Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia*. In der alten Welt (Europa, Asien, Afrika) werden Leishmanien durch *Phlebotomus* übertragen; in der neuen Welt (Amerika) durch *Lutzomyia*. Die Übertragung der Leishmanien auf den Säugetierwirt erfolgt während der Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke. Die übertragene *Leishmania*-Spezies richtet sich dabei nach der Spezies der übertragenden Sandmücken. Leishmaniosen können sowohl zoonotisch (Tiere als Reservoir, Tier-zu-Mensch) oder anthroponotisch (Mensch-zu-Mensch) übertragen werden (Sacks, 2001)

## 1.2. Der Lebenszyklus der Leishmanien

Der Lebenszyklus von Leishmanien ist biphasisch (Abb.1). Als Promastigote leben Leishmanien im Darm der Sandmücke. Promastigote besitzen ein Flagellum und haben einen langen, schmalen Zellkörper. Während der Blutmahlzeit einer infizierten Sandmücke werden die Parasiten in den Säugetierwirt übertragen, wo sie meist zuerst von neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden, die später von Makrophagen aufgenommen werden (Laskay, et al., 2003, Peters, et al., 2008, van Zandbergen, et al., 2004). Die Umwandlung der Leishmanien von der promastigoten in die amastigote Form erfolgt in der parasitophoren Vakuole (PV) innerhalb der Makrophagen. Diese Stadienumwandlung wird wesentlich durch die Änderung des Milieus ( $< \text{pH } 5,5$ ) und der Umgebungstemperatur ( $32\text{-}42^\circ\text{C}$ ) ausgelöst. Amastigote Leishmanien haben einen rundlichen Zellkörper, sind kleiner als die promastigote Form und besitzt nur ein rudimentäres Flagellum. Durch die Vermehrung der Amastigoten kommt es durch bislang unbekannte Mechanismen zur Zerstörung der Wirtszelle und zur Freisetzung der Amastigoten. Amastigote und infizierte Monozyten können bei einer Blutmahlzeit von

Sandmücken aufgenommen werden. Freigesetzte Amastigote wandeln sich im Mückendarm zur Promastigote um und können sich mit Hilfe des Oberflächenmoleküls Lipophosphoglykan (LPG) an das Darmepithel der Sandmücken anheften. Nach exponentiellem Wachstum wandeln sich die prozyklischen Promastigoten in infektiöse, metazyklische Promastigote um und können bei der nächsten Blutmahlzeit mit dem Speichel der Sandmücke auf einen Säugerwirt übertragen werden. Der Lebenszyklus der Parasiten ist damit geschlossen und kann erneut beginnen (Dostalova und Volf, 2012).

Zwar kann der Lebenszyklus des Parasiten im Labor durch die Änderungen der Temperatur und eine Veränderung des pH-Wertes des Mediums nachgestellt werden. Dabei erfolgt die Umwandlung von der Promastigoten zu einer axenischen Amastigoten-ähnlichen Form. Die *in vitro* Stadienumwandlung bietet eine gute Möglichkeit für zellbiologische und biochemischen Untersuchungen, jedoch sind axenische und echte, intrazelluläre Amastigote nicht gleichzusetzen und bspw. für Wirkstoffuntersuchungen ungeeignet.

### 1.3. Krankheitsbild der Leishmaniosen

Es gibt drei verschiedene Ausprägungen der Leishmaniose, kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniose. Das Krankheitsbild variiert je nach infizierender *Leishmania*-Spezies.

Die kutane Leishmaniose (cutaneous leishmaniasis, CL) wird durch eine Vielzahl von *Leishmania*-Arten der Alten und Neuen Welt verursacht. Die CL wird in der alten Welt von *L. major*, *L. aethiopica* oder *L. tropica* ausgelöst; in der neuen Welt von *L. braziliensis* und Leishmanien des *L. mexicana*-Komplexes. Im Jahr 2012 wurden 1,2 Millionen Fälle von CL gezählt, was die CL zur häufigsten Erkrankungsform macht. Zwei Drittel der Fälle treten in Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, Iran und Syrien auf. Es werden aber auch Fälle aus dem Mittelmeerraum berichtet. Bei der kutanen Leishmaniose kommt es zu geschlossenen oder ulzerierenden Hautläsionen, die nach mehreren Monaten zumeist spontan abheilen, dabei aber Narben zurück lassen. Eine ausgeheilte CL bringt der betroffenen Person eine lebenslange Immunität gegenüber der *Leishmania*-Spezies, die die CL ausgelöst hat. Bedingt durch die Erregerpersistenz im Narbengewebe sind diese Personen aber als potentielle Reservoir der Krankheit anzusehen (Murray, et al., 2005). Die Größe der Läsionen kann zwischen 1-10 cm variieren. Die Läsionen treten meist an Händen, Füßen oder im Gesicht der Patienten auf, da diese Stellen unbedeckt und somit

für Sandmücken leicht zugänglich sind. Bei ca. 1/3 der Fälle werden Rückfälle beobachtet (Torres-Guerrero, et al., 2017).

Die mukokutane Leishmaniose (mucocutaneous leishmaniasis, MCL) ist eine sekundäre Symptomatik, die nach einer CL, verursacht durch die Spezies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, und *L. panamensis*, auftreten kann. Der größte Teil der Infektionen tritt dabei in Bolivien, Brasilien und Peru auf. Die MCL kann Jahre nach der primären CL auftreten. Es kommt zu Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes, wobei die Schleimhaut zerstört wird. Entstellende Zerstörungen von Nase und Lippen können die Folgen sein. Die Erkrankung kann durch Sekundär-Infektionen tödlich sein und erfordert zwingend eine Behandlung.

Die viszerale Leishmaniose (visceral leishmaniasis, VL), auch kala-azar genannt, ist der schwerste Krankheitsverlauf. Sie wird durch die Parasiten *L. donovani* und *L. infantum*, verursacht. Zu den Symptomen der viszeralen Leishmaniose zählen Fieber, Müdigkeit, Anorexie, Gewichtsverlust und starke Vergrößerung von Milz und Leber (Hepato/Splenomegalie). Unbehandelt führt diese Form der Krankheit in den meisten Fällen zum Tod der Patienten. In einigen Fällen der VL kommt es nach Ausheilen zur Entwicklung einer post-kala-azar-dermalen-Leishmaniose (PKDL). Dabei treten Hautausschläge im Bereich des Mundes auf, die sich auf andere Körperteile ausbreiten. Dieser Krankheitsverlauf tritt nur bei Infektionen auf, die durch *L. donovani* ausgelöst wurden. Die PKDL kann Monate oder Jahre nach der VL auftreten. Die Behandlung der PKDL dauert zwischen 2-4 Monaten. Die Patienten stellen in dieser Zeit ein Reservoir der Parasiten dar. (Zijlstra, et al., 2003).

Ko-Infektionen mit *Leishmania* und HIV sind beschrieben, wobei beide Erreger synergetisch wirken. Eine bestehende *Leishmania*-Infektion geht mit einer verstärkten Replikation des HI-Virus einher und eine vorangegangene anti-virale Therapie ermöglicht auch ein besseres Ansprechen auf die anti-*Leishmania* Therapie (Berhe, et al., 1999). VL ist eine häufige, opportunistische Komplikation bei HIV-positiven Patienten.

#### **1.4. Therapie von Leishmaniosen**

Es gibt zur Zeit keine wirksamen Impfungen oder prophylaktischen Wirkstoffe gegen Leishmaniosen.

Seit über 70 Jahren werden pentavalente **Antimon(Sb)**-Verbindungen wie Natrium-Stibogluconat (Pentostam®) oder Meglumine-Antimoniat (Glucantime®) zur Behandlung von Leishmaniosen verwendet. Wirksamer Bestandteil dieser Medikamente ist fünfwertiges Antimon ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ), das zu dreiwertigem Antimon ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) umgewandelt werden muss, um leishmanizid zu wirken (Frezard, et al., 2001).  $\text{Sb}^{\text{V}}$  hat keine Wirkung auf Promastigote, da diese  $\text{Sb}^{\text{V}}$  nicht zu  $\text{Sb}^{\text{III}}$  reduzieren können (Ephros, et al., 1997). Wie die Umwandlung von  $\text{Sb}^{\text{V}}$  zu  $\text{Sb}^{\text{III}}$  in Amastigoten und Makrophagen verläuft, ist bislang nicht genau geklärt. Es sind jedoch gewisse Zielstrukturen für  $\text{Sb}^{\text{III}}$  im Parasiten beschrieben.  $\text{Sb}^{\text{III}}$  interagiert mit dem Thiolmetabolismus der Parasiten.  $\text{Sb}^{\text{III}}$  bildet Komplexe mit Trypanothion und Glutathion und es kommt zur verstärkten Sekretion dieser Komplexe aus den Parasiten. Ein weiterer Mechanismus ist die Inhibierung der Trypanothion-Reduktase, wodurch es zur Akkumulation der Disulfidform von Trypanothion in den Parasiten kommt, was das Redoxpotential der Parasiten stört. (Wyllie, et al., 2004).

$\text{Sb}^{\text{III}}$  wird auf Grund seiner toxischen Nebenwirkungen nicht direkt verabreicht. Auch die Therapie mit  $\text{Sb}^{\text{V}}$ -Verbindungen führt zu starken Nebenwirkungen, wie z.B. Fieber, Übelkeit, Gelenk-/ Muskelschmerzen und Kardio-/Nephrotoxizität. Das größte Problem bei der Behandlung mit Antimon-Verbindungen ist jedoch das Auftreten Therapie-resistenter Fälle, vor allem im Staat Bihar (Indien). Zwischen 1980 und 1997 wurde ein Anstieg der Therapie-resistenten Fälle auf bis zu 65% beschrieben. Hier müssen alternative Wirkstoffe zur Behandlung eingesetzt werden (Sundar, 2001).

**Miltefosin** wurde ursprünglich für die Therapie von Mammakarzinomen getestet. Miltefosin ist ein Alkylphosphocholine, das anti-parasitäre Wirksamkeit zeigt (Croft, et al., 1987). Im Maus-Modell konnte die Wirksamkeit von Miltefosin gegen viszerale Leishmaniose gezeigt werden (Kuhlencord, et al., 1992). Miltefosin wurde als erstes orales Medikament erfolgreich in der Behandlung von Leishmaniosen eingesetzt (Sundar, et al., 1999). Ein wichtiger Vorteil bei der Behandlung mit Miltefosin ist, dass für die Behandlung kein stationärer Krankenhausaufenthalt nötig ist. Es wird eine Behandlungsdauer von 28 Tagen empfohlen, wobei beobachtet wurde, dass Miltefosin im Körper eine lange Halbwertszeit aufweist. Auch bei der Behandlung mit Miltefosin sind Nebenwirkungen beschrieben, wie z.B. gastrointestinale Beschwerden. Ein besonders großes Problem stellt die Teratogenität von Miltefosin dar. Miltefosin darf daher bei Frauen im gebärfähigen Alter nur bei gleichzeitiger Empfängnisverhütung eingesetzt werden, was den Nutzen von Miltefosin stark einschränkt (Sundar, et al., 2002).

**Amphotericin B** ist ein Antimykotikum und dient hauptsächlich zur Therapie von systemischen Pilzinfektionen. Es wird aber auch erfolgreich zur Therapie von Leishmaniosen eingesetzt. Auch hier werden Nebenwirkungen beobachtet, wie z.B. Fieber, Schüttelfrost, Thrombophlebitis sowie Myokarditis und Nephrotoxizität. Die Behandlung erfordert einen stationären Aufenthalt im Krankenhaus und dauert in der Regel 15-20 Tage (Sundar und Chakravarty, 2010). Durch die Entwicklung einer liposomalen Form konnten die Nebenwirkungen deutlich reduziert werden (Davidson, et al., 1996). Allerdings verursacht die Behandlung mit liposomalem Amphotericin B deutlich höhere Therapiekosten. Amphotericin B ist auch gegen promastigote Leishmanien wirksam, wo es mit Ergosterol in der Plasmamembran interagiert und somit die Permeabilität der Membran stört, was zum Zelltod führt (Roberts, et al., 2003, Saha, et al., 1986).

**Paromomycin** ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das aus dem Bakterium *Streptomyces rimosu* isoliert wurde. Seit 2006 wird Paramomycin zur Behandlung von viszeraler Leishmaniose eingesetzt. In promastigoten Leishmanien wirkt Paramomycin auf die RNA Synthese und die Membran-Permeabilität (Maarouf, et al., 1997). Die Verabreichung erfolgt durch intramuskuläre Injektionen für eine Dauer von 21 Tagen. Die Therapiekosten bei der Behandlung mit Paramomycin ist geringer als für andere Medikamente.

## 1.5. Das Genom der Leishmanien

Das Genom der Leishmanien ist ~32 Mb groß und kodiert für ca 8200 Gene (Ivens, et al., 2005, Peacock, et al., 2007). *Leishmania*-Spezies der Alten Welt (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*) besitzen ein Genom aus 36 Chromosomen, die zwischen 0,35 -3 Mb groß sind (Wincker, et al., 1996). Für *Leishmania*-Spezies der Neuen Welt wie *L. mexicana* wurde ein Genom mit 35 Chromosomen und für *L. braziliensis* ein Genom mit 34 Chromosomen beschrieben (Britto, et al., 1998). Nur wenige Gene sind spezifisch für bestimmte *Leishmania*-Spezies; die hohe Heterogenität der Genome ist auf veränderte Anzahlen verschiedener Genkopien zurückzuführen. Es wurden ebenfalls variable Chromosomenzahlen (Aneuploidie) beobachtet (Rogers, et al., 2011). Diese genomische Variabilität der einzelnen Parasiten innerhalb einer Population wird auch als Mosaik-Aneuploidie bezeichnet (Iourov, et al., 2008). Sterkers *et al.* zeigten, dass Aneuploidie alle Chromosomen einer *Leishmania*-Population betrifft. Jedes Chromosom der analysierten *L. major* Population wurde in mindestens zwei Ploidiegraden (haploid, diploid oder triploid)

nachgewiesen (Sterkers, et al., 2011). Diese genetische Besonderheit sorgt dafür, dass sich die Parasiten schnell an veränderte Lebensbedingungen anpassen können (Mannaert, et al., 2012). So konnten veränderte Genkopienanzahlen ebenso wie Aneuploidie auch beim Auftreten von Resistenzen beobachtet werden (Laffitte, et al., 2016).

## 1.6. Resistenzmechanismen

Der Entstehung von Therapie-resistenten Leishmanien liegen verschiedene biochemischen und molekularen Mechanismen zu Grunde. Es handelt sich in den meisten Fällen um ein multifaktorielles Ereignis. Dabei muss unterschieden werden, ob die beobachteten Resistenzmechanismen in *in vitro* erzeugten resistenten Parasiten auftreten, oder ob die Parasiten aus Therapie-resistenten Patientenisolaten gewonnen wurden. Ein Überblick über die am meisten beobachteten Resistenzmechanismen soll im Folgenden gegeben werden.

### **Resistenzmechanismen von *in vitro* erzeugten Antimon-resistenten Leishmanien**

- Die intrazelluläre Akkumulation von Antimon ( $Sb^{III}$ ) in Leishmanien ist für die anti-parasitische Wirkung notwendig. Antimon-resistente Leishmanien zeigen jedoch oft einen erhöhten Export von toxischen Stoffen aus der Zelle, um eine Akkumulation von Antimon zu verhindern (Dey, et al., 1994). Antimon wird in der Zelle von den beiden bedeutendsten zellulären antioxidativen Thiolen, Glutathion oder Trypanothion, in einem Komplex gebunden und dann über Transporter aus der Zelle transportiert. MRPA ist ein solcher Transporter, der zur Familie der ABC-Transporter gehört. Die erhöhte Expression von MRPA führt zur Antimon-Resistenz der Parasiten (El Fadili, et al., 2005). Ein weiterer ABC-Transporter zum Export von Antimon aus der Zelle ist PRP1 (Coelho, et al., 2003).
- Auch eine verminderte Aufnahme von Antimon führt zur Resistenz (Callahan, et al., 1994). Antimon ( $Sb^{III}$ ) wird von Leishmanien über ein Aquaglyceroporin (AQP1) aufgenommen (Gourbal, et al., 2004) und eine verringerte AQP1-mRNA Menge konnte für verschiedene auf Antimon-Resistenz selektierte *Leishmania*-Spezies gezeigt werden (Marquis, et al., 2005). In Antimon-resistenten Leishmanien fehlte z.T. der telomere Bereich des Chromosom 31, der unter anderem auch das AQP1-Gen trägt (Mukherjee, et al., 2013).

- Die Selektion Antimon-resistenter Leishmanien zeigte, dass dem Hitzeschock-Protein 70 (HSP70) eine Funktion bei der Resistenz zukommt. Vermutlich spielt HSP70 eine Rolle bei der frühen Stress-Antwort der Parasiten auf die Behandlung mit Antimon, bis sich spezifischere Resistenzmechanismen ausbilden (Brochu, et al., 2004).

### **Resistenzmechanismen von Antimon-resistenten Leishmanien aus Patientenisolaten**

Neben den zahlreichen *in vitro* erzeugte Antimon-resistente Leishmanien werden immer häufiger Infektionen mit Antimon-resistente Leishmanien beobachtet (Sundar, 2001). Die Analyse der Parasiten, die aus Patienten isoliert wurden, die nicht auf eine Antimon Therapie ansprechen ist von besonderer Bedeutung, da somit deutlich wird, welche Resistenzmechanismen sich im Feld durchsetzen können. Der Vergleich der aus Patienten isolierten Antimon-resistenten Parasiten mit *in vitro* erzeugten resistente Parasiten zeigte viele bereits bekannte Resistenzmechanismen.

- Wie auch bei den *in vitro* erzeugten Antimon-resistenten Leishmanien wurde bei der Analyse von Parasiten aus Patientenisolaten eine verminderte Expression des AQP1-Gens gezeigt, was eine verminderte Aufnahme von Antimon zur Folge haben dürfte (Decuypere, et al., 2005).
- Ebenso konnte eine verstärkte Aktivität von Efflux-Pumpen in Antimon-resistenten Parasiten aus Feldisolaten gezeigt werden. Der erhöhte Export von Antimon aus der Zelle verhindert die Akkumulation von Antimon (Mandal, et al., 2009).
- Die verringerte Expression der MAPK1 (*mitogen activated protein kinase 1*) könnte in *L. donovani* aus Patientenisolaten gezeigt werden (Ashutosh, et al., 2012). Einen Hinweis auf den Resistenzmechanismus geben hier *in vitro* erzeugte Genaustauschmutanten. Bei einer verminderten Expression von MAPK1 wurde eine erhöhte Aktivität der Efflux-Pumpen gezeigt (Garg und Goyal, 2015).
- Die intrazellulären Thiol-Mengen waren in Parasiten aus Antimon-resistenten Patientenisolaten erhöht, was ebenso eine höhere Toleranz gegenüber Antimon vermittelt (Mittal, et al., 2007).
- Es wurde gleichfalls eine Überexpression von MRPA beobachtet, wodurch verstärkt Sb<sup>III</sup>/Thiol-Konjugate aus den Zellen transportiert werden und eine Akkumulation von Antimon in den Parasiten verhindert werden kann (Singh, et al., 2014).

- Für Antimon-resistente *L. donovani* aus Patientenisolaten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Menge des HSP83 (Hitzeschock-Protein 83) vorlag. Durch aufrechterhalten des Membranpotenzials verhindert HSP83 hier den programmierten Zelltod. Ein weiteres Protein steht mit der Antimon-Resistenz in Zusammenhang: So konnte gezeigt werden, dass geringere Mengen des *small kinetoplast calpain-related protein* (SKCRP14.1) vorhanden waren. SKCRP14.1 fördert den durch Antimon-bedingten Zelltod. Interessanterweise waren Parasiten mit einer Überexpression von SKCRP14.1 ebenfalls toleranter gegen Miltefosin (Vergnes, et al., 2007).

### **In vitro erzeugte Miltefosin-Resistenzen**

Da Miltefosin ursprünglich für die Behandlung von Mammakarzinomen getestet wurde, sind in der Literatur die Auswirkungen auf humane Krebs-Zelllinien ebenso beschrieben, wie die Entstehung von Miltefosin-resistenten Krebs-Zelllinien. Es konnten durch die konstante Kultivierung der Zellen mit schrittweise ansteigenden Konzentrationen von Miltefosin resistente Zelllinien erzeugt werden.

### **Auswirkungen der Miltefosin Behandlung auf humanen Krebs-Zellen**

- Viele Wirkstoffe wirken durch DNA-Schädigungen hemmend auf die schnelle Proliferation der Krebs-Zellen. Bei Miltefosin wird die Wirkung durch die lipid-ähnlichen Molekülstruktur erreicht. Hauptsächlich bewirkt Miltefosin in humanen Krebszellen die Inhibierung der Phosphatidylcholin-Synthese, die Inhibierung des Proliferations-fördernden MAP-Kinase/ERK Signalweges, ebenso wie die Inhibierung des Akt-Signalweges und Aktivierung des Stress-induzierten Apoptose Signalwegs (JNK-Signalweg) (van Blitterswijk und Verheij, 2008) (Jimenez-Lopez, et al., 2010).

### **Miltefosin-Resistenz in humanen Krebs-Zelllinien**

- *In vitro* erzeugte Miltefosin-resistente humane Krebs-Zelllinien zeigen eine verringerte Aufnahme (Berkovic, et al., 1996) und einen schnelleren Abbau von Miltefosin (Fleer, et al., 1996).

- Miltefosin wird in Miltefosin-sensitiven Zellen nicht abgebaut, da es mit Lipid-abhängigen Signalkaskaden wie PI3K-Akt und Raf-Erk1/2 interagiert, die das Überleben der Zellen vermitteln (van Blitterswijk und Verheij, 2013).
- Wenn dennoch intrazellulär erhöhte Mengen von nicht-umgesetztem Miltefosin in resistenten Zellen nachzuweisen waren, wurden keine nachteiligen Effekte für diese Zellen beobachtet. Die resistenten Zellen tolerierten höhere Mengen an intrazellulärem Miltefosin (Berkovic et al., 1996, Fleer et al., 1996).
- Ebenso konnte eine erhöhte Expression des *multidrug resistance* Gens 1 (MDR1) in Miltefosin-resistente humanen Krebs-Zellen gezeigt werden. Das Genprodukt des MDR1 ist ein P-Glykoprotein, das zu den ABC-Transportern gehört. Durch die Überexpression dieses Transporters kann es zur Resistenz kommen, da der Transporter für den ATP-abhängigen Transport von Stoffen aus der Zelle verantwortlich ist. Es konnte die Bindung von Miltefosin an die Transmembran-Domäne des P-Glykoproteins gezeigt werden (Rybczynska, et al., 2001).
- Zusammen mit der erhöhten Expression von MDR1 wurde in Miltefosin-resistente Zellen eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 beobachtet. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass auch Bcl-2 eine Funktion bei der Resistenz gegen Miltefosin zukommt (Fu, et al., 1999).
- Die Synthese von Phosphatidylcholin ist in Miltefosin-resistenten Zelllinien vermindert. Phosphatidylcholine sind wichtige Bestandteile der Plasmamembran und veränderte Mengen wirken sich negativ auf den Erhalt der Membranfluidität aus (Berkovic, et al., 2002).

#### Auswirkungen der Miltefosin Behandlung auf Leishmanien

- Miltefosin induziert in Leishmanien Apoptose (Khademvatan, et al., 2011). Bei der Behandlung mit Miltefosin werden Apoptose-Anzeichen wie DNA-Kondensationen und DNA-Fragmentierungen beobachtet (Verma und Dey, 2004). Durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt es zur Freisetzung von *ROS* (*reactive oxygen species*), die ebenfalls Apoptose induzieren können (Paris, et al., 2004).

- Die Zusammensetzung der Plasmamembran wird durch Miltefosin beeinflusst. Es kommt zu einer Phospholipid-Asymmetrie (Weingartner, et al., 2010).
- Phosphatidylcholine sind Hauptbestandteil von *Leishmania*-Membranen, wobei die Phosphatidylcholine-Synthese auf den Import von Cholin angewiesen ist. Miltefosin blockiert die Aufnahme von Cholin über den Cholin-Transport in die Leishmanien und hemmt somit die Proliferation der Parasiten (Zufferey und Mamoun, 2002).

### Miltefosin-Resistenz in Leishmanien

Resistenzmechanismen, die in humanen Krebszellen beobachtet wurden, konnten zum Teil auch für *in vitro* selektierte Miltefosin-resistente Leishmanien gezeigt werden.

- Auch in Leishmanien konnte ein Mitwirken der MDR-Proteine in der Miltefosin-Resistenz gezeigt werden. Die verstärkte Expression des P-Glykoproteins-ähnlichen Transporters (LtrMDR1) in *multidrug resistant L. tropica* führte zur Resistenz gegen Miltefosin. Ebenso führt die verringerte Expression des Transporters zur Sensitivität gegen Miltefosin (Perez-Victoria, et al., 2001). Die Überexpression von LtrMDR1 führt zum verstärkten Transport von Miltefosin aus der Zelle heraus und verhindert somit die Akkumulation von Miltefosin in den Leishmanien (Perez-Victoria, et al., 2006b).
- Veränderte Lipid-Zusammensetzungen der Plasmamembran konnten für Miltefosin-resistente *L. donovani* Promastigote gezeigt werden. Resistente Parasiten hatten eine verminderte Anzahl an ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran, was zu einer geringeren Membran-Fluidität führt. Diese verringerte Membran-Fluidität führt dazu, dass Miltefosin schlechter mit der externen Phospholipidschicht der Membran interagieren kann und nicht mehr über die Membran transportiert wird (Rakotomanga, et al., 2005).
- Ein verminderter Import durch mutierte und defekte Transporter (LdMT) verhindert den Transport von Miltefosin in die Parasiten, was eine verminderte Akkumulation von Miltefosin bedingt (Papadopoulou und Ouellette, 1993) (Perez-Victoria, et al., 2003a). Für mehr Details siehe Abschnitt (1.7) zum Miltefosin-Transporter (LdMT).

### Resistenzmechanismen von Miltefosin-resistenten Leishmanien aus Patientenisolaten

Es werden oftmals Misserfolge bei der Miltefosin-Behandlung von Leishmaniosen berichtet, jedoch sind viele dieser Fälle auf eine nicht korrekte Anwendung des Wirkstoffes

zurückzuführen und nicht durch eine Infektion mit Miltefosin-resistenten Leishmanien bedingt. Miltefosin kann oral eingenommen werden und erfordert daher keinen Krankenhaus-Aufenthalt, wodurch aber auch eine Kontrolle der korrekten und durchgehenden Einnahme von Miltefosin fehlt. Durch falsche Einnahme bedingte suboptimale Konzentrationen von Miltefosin im Patienten können die Entstehung resistenter Parasiten fördern (Sundar und Murray, 2005).

- Zu den Resistenzmechanismen, der aus Patientenisolaten gewonnenen Leishmanien zählen ebenfalls SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im LdMT und somit ein verminderter Import von Miltefosin (Cojean, et al., 2012, Srivastava, et al., 2017).
- Eine verminderte Akkumulation von Miltefosin in Leishmanien, die aus Patientenisolaten gewonnenen wurden konnte ebenso gezeigt werden wie eine verminderte Induktion von ROS (*reactive oxygen species*) (Deep, et al., 2017).

### 1.7. Miltefosin-Transporter

Eine besondere Rolle bei der Miltefosin-Resistenz von *L. donovani* kommt dem Miltefosin Transporter (LdMT) zu. Der Transporter gehört zur Klasse der P<sub>4</sub>-Typ ATPasen. Diese Phospholipid-Pumpen sorgen durch einen einseitigen Transport für eine asymmetrische Lipidverteilung in zellulären Membranen (Panatala, et al., 2015).

In Leishmanien ist der genaue Transportmechanismus von Miltefosin über die Membran noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass der Transport über die Plasmamembran durch die Flippase-Aktivität des Transporters erreicht wird. Aus anderen Organismen ist bekannt, dass P<sub>4</sub>-Typ ATPasen in den zentralen Transmembrandomänen Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten besitzen, was vermutlich dem Transport von amphipathischen Phospholipiden dient (Tang, et al., 1996). Die Transmembrandomäne M4 spielt eine zentrale Rolle bei dem Transport von Phospholipiden, da vermutlich durch die Konformationsänderung der ATPase ein Pumpeneffekt entsteht und somit die Lipide befördert werden (Panatala et al., 2015).

In Leishmanien ist der LdMT an der Plasmamembran lokalisiert und für den einwärtsgerichteten Transport von Phospholipiden und auch Phospholipid-Analoga wie Miltefosin über die Membran verantwortlich (Perez-Victoria, et al., 2003a). Für den Transport von Miltefosin wird außerdem die beta-Untereinheit LdRos3 zur Bildung eines funktionellen Komplexes benötigt. Sowohl das Fehlen des LdMT als auch von LdROS3 sorgen für einen

Miltefosin-resistenten Phänotyp der Parasiten und führen zu einer zytosolischen Lokalisation von LdMT und LdRos3 (Perez-Victoria, et al., 2006a).

Für andere *Leishmania*-Spezies konnten Unterschiede in der Sensitivität gegen Miltefosin beobachtet werden (Yardley, et al., 2005). *L. braziliensis* zeigte natürlicherweise eine verringerte Sensitivität gegenüber Miltefosin, was auf eine verringerte Expression der beta-Untereinheit LbRos3 und eine daraus resultierende verminderte Akkumulation von Miltefosin in den Parasiten zurück zu führen war (Sanchez-Canete, et al., 2009).

Miltefosin hat im Körper der Patienten eine lange Halbwertszeit von 150-200 h, so dass auch nach Ende der Miltefosin-Behandlung meßbare Konzentrationen des Wirkstoffes vorhanden sind. Der langsame Abbau von Miltefosin könnte die Entstehung von Resistenzen begünstigen (Bryceson, 2001). Durch den Kontakt der Parasiten mit einer nicht-letalen Dosis des Wirkstoffes, z.B. bei einer wiederholten Infektion könnte es zur Anpassung kommen. Der Vorgang ähnelt der *in vitro* Selektion, wo die Parasiten ebenfalls mit nicht-letalen Dosen des Wirkstoffes behandelt werden um eine resistente *Leishmania*-Population zu selektieren.

Verschiedene Punktmutationen im LdMT-Gen konnten sowohl für *in vitro* selektierte Miltefosin-resistente Leishmanien gezeigt werden, als auch in Parasiten die aus nicht auf die Miltefosin-Behandlung ansprechenden Patientenisolaten gewonnen wurden (Cojean et al., 2012, Perez-Victoria et al., 2003a, Srivastava et al., 2017). Mutationen im LdMT führen zu einem Miltefosin-resistenten Phänotyp und zu einer verringerten Akkumulation von Miltefosin im Zellinneren. Durch Einbringen einer funktionellen, episomalen Genkopie des Transporters, konnte die Sensitivität gegenüber Miltefosin wieder hergestellt werden. Die Überexpression des LdMT kann auch in nicht-Miltefosin sensitiven Spezies wie *L. tarentolae* zu deutlich gesteigerten Aufnahme von Miltefosin führen (Perez-Victoria et al., 2003a) (Perez-Victoria, et al., 2003b). Es konnten lebensfähige LdMT-Nullmutanten erzeugt werden, was darauf schließen lässt, dass LdMT kein essentielles Gen ist (Perez-Victoria et al., 2006a). Die Infektiosität der LdMT-Nullmutanten war in *in vitro* Infektionsexperimenten nicht beeinträchtigt (Weingartner et al., 2010).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Zur Behandlung von Leishmaniosen gibt es nur eine geringe Anzahl an Medikamenten, deren Verwendung durch massive Nebenwirkungen eingegrenzt wird. Die gleichzeitig wachsende Anzahl der Therapie-resistenten Leishmaniosen verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer anti-*Leishmania* Wirkstoffe. Daher sollte schon früh bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe Tests zum Resistenz-Potential mit einbezogen werden.

Im Rahmen des NMTrypl (**New Medicines for Trypanosomatidic Infections**) Projektes wurden neue Wirkstoffe hergestellt und auf ihre Wirksamkeit geprüft. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Analyse von *Leishmania donovani* im Bezug auf deren Fähigkeit, Resistenzen gegen diese experimentellen Wirkstoffe zu entwickeln. Dafür sollten resistente *L. donovani* Promastigote selektiert werden, wobei zwei verschiedene Ansätze verfolgt wurden. Zum einen sollte eine Selektion auf dominante Resistenzmarker erfolgen, wofür eine Cosmid-Genbank tragende *Leishmania*-Population verwendet wurde. Zum anderen sollte die Selektion auf spontane Resistenz in einer *L. donovani* Wildtyp-Population erfolgen. Wachstumsversuche sollten zeigen ob Kreuzresistenzen gegen die anderen hier getesteten Wirkstoffe und gegen etablierte Wirkstoffe bestanden. Die Sequenzierung der selektierten Cosmide aus den resistenten Cosmid-Genbank tragenden *Leishmania*-Populationen sollte dominante Resistenzmarker identifizieren. Eine Gesamt-Genom Sequenzierung der spontan resistenten *L. donovani* sollte die genetischen Veränderungen der resistenten Parasiten zeigen. Weiterhin soll die *in vitro* Infektiosität der resistenten Parasiten getestet werden und die Erhaltung der Resistenz als intrazellulären Amastigote geprüft werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Organismen und Stämme

###### Leishmanien

Die in dieser Arbeit verwendeten *Leishmania* Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1: Bezeichnung, Verwendung und Eigenschaften der verwendeten Leishmania Stämme

Bezeichnung	Identifikationsnummer	Herkunft	Verwendungszweck	Resistenzen	Literatur
<i>Leishmania donovani</i> 1SR	MHOM/SD/00/1SR	Sudan	Selektion von spontanen Resistenzen	-	-
<i>Leishmania donovani</i> BPK091	MHOM/NP/02/BPK091/0	Nepal	Selektion von erworbenen Resistenzen	-	Vanaerschot <i>et al.</i> 2011
<i>Leishmania donovani</i> BPK190	MHOM/NP/—/BPK190/0 cl3	Nepal	Selektion von erworbenen Resistenzen	Sb <sup>V</sup> -resistent	Vanaerschot <i>et al.</i> 2011

###### Versuchstiere

Für die Isolierung primärer pluripotenter Stammzellen wurden 6-8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse aus der institutsinternen (BNITM) Zucht eingesetzt.

###### Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2: Bezeichnung, Verwendung und Hersteller der verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
DH5 $\alpha$ , <i>E. coli</i>	Klonieren und Vermehrung von Plasmiden	New England Bio-labs (Beverly, U.S.A.)
XL-1 Blue, <i>E. coli</i>	Klonieren und Vermehrung von Plasmiden	Sarstedt (Agilent Technologies), Waldbronn

### 3.1.2. Verwendete Geräte und Kits

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank (25°C)	WTC Binder, Tuttlingen
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170S (37°C)	Eppendorf, Hamburg
CASY Cellcounter	Roche, Mannheim
Elektroporationsküvetten (0,1 cm)	VWR, Radnor, U.S.A.
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Evos XL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific, Waltham, U.S.A.
GenePulser	Bio-Rad, München
MiSeq	Illumina, San Diego, U.S.A.
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Hecht, Sondheim
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, U.S.A.
Quickseal tubes	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A
Rollschüttler: CAT RM5	neoLab, Heidelberg
Rotorgene 6000	Corbett, Sydney, Australien
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hannover
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fischer Scientific, Waltham, U.S.A.
Ultrazentrifuge Optima XE-90	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen

Tabelle 4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
iProof PCR-Kit	Bio-Rad, München
ISOLATE II Genomic DNA Kit	Bioline, London, UK
MiSeq Reagent kit v3	Illumina, San Diego, U.S.A.
Nextera XT index kit	Illumina, San Diego, U.S.A.
Nextera XT library kit	Illumina, San Diego, U.S.A.
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren

### 3.1.3. Nährmedien und Antibiotika

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Zellen	Bezeichnung	Zusammensetzung
Leishmanien	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 µM 6-Biopterin
Leishmanien	Einfriermedium	30% M199+ 50% inaktiviertes (30 min. bei 56°C) FCS 20% DMSO
Bakterien	LB-Medium	2% LB-Broth
Bakterien	LB-Platten	2% LB-Broth 1,5% LB-Agar 20% DMSO
Makrophagen	DMEM+	DMEM 10 % inaktiviertes (30 min. bei 56°C) FCS 5% Pferdeserum 1x Penicillin/ Streptomycin Lösung 1x GlutaMAX 10-30% Überstand von Ladmac Zellen

Tabelle 6: Liste der verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg/ mL	100 µg/ mL
Genitacin (G418)	50 mg/ mL	50 µg/ mL
Penecillin/ Streptomycin	10.000 U/ mL Penecillin 10 mg/ mL Streptomycin	10 U/ mL Penecillin 0,1 mg/ mL Streptomycin

Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
Dulebecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, U.S.A.	Ausdifferenzierung und Kultivierung von Makrophagen
RPMI-1640 (entwickelt am Roswell Park Memorial Institut)	SIGMA-Aldrich, Deutschland	Kultivierung von Ladmac Zellen
Medium 199 mit Earle´s Salzen	SIGMA-Aldrich, Deutschland	Kultivierung von Leishmanien
Minimum Essential Medium (MEM), serumfreies Medium	SIGMA-Aldrich, Deutschland	Kultivierung von Ladmac Zellen

### 3.1.4. Benutzte Oligonukleotide

Tabelle 8: Bezeichnung der verwendete Oligonukleotide, die 5'-3' Sequenz und der Verwendungszweck. Alle Oligonukleotide werden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendungszweck
LdMT-5'-KpnI	GGAGGT <u>ACCAT</u> GCCCAACCAACCGCCGTG	Amplifikation des <i>L. donovani</i> 1SR Miltefosine-Transporters
LdMT-3'-BglII	GGAGAGAT <u>CTT</u> CACAGCTTTCCACCGTTTTG	Amplifikation des <i>L. donovani</i> 1SR Miltefosine-Transporters
M13-24R	CGGATAACAATTTTACACAGG	pUC19-Sequenzierung
M13-24F	CCAGGGTTTTCCAGTCACG	pUC19-Sequenzierung
LdMT-2447rev	CCTCCCGGATCATGGACAC	Sequenzierung des pCL2N-LdMT und pCL3S-LdMT Konstruktes
LdMT-804fwd	GTGGGGCATGGTTGCCTAC	Sequenzierung des pCL2N-LdMT und pCL3S-LdMT Konstruktes
pIR-p-fwd2	GGCTCTGCGTTTCACTTGC	Sequenzierung des pCL2N-LdMT und pCL3S-LdMT Konstruktes
pIR-p-rev	GCGAACTGGTCGTAGAAATC	Sequenzierung des pCL2N-LdMT und pCL3S-LdMT Konstruktes
RT-Aktin F1	TGGCACCATACCTCTACAACGAG	real time RT Quantifizierung von Aktin
RT-Aktin B2	CGTCATCTTCTCACGGTTCTGC	real time RT Quantifizierung von Aktin
LdMT_endogen_fwd	GGCATAACAATCTTACAGCTTTCCA	real time RT Quantifizierung von Aktin
LdMT_endogen_rev (2)	GGTGGTGGTTCGTA	real time RT Quantifizierung von Aktin

Tabelle 9: Bezeichnung der Primer und Sonden der Taqman qPCR sowie die 5'-3'-Sequenz und der Verwendungszweck

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendungszweck
Mouse_Acb-F	CTGGAGAAGAGCTATGAG	Nachweis der gDNA von beta Aktin der Maus
Mouse_Acb-R2	CTTACCCAAGAAGGAAGGCTG	Nachweis der gDNA von beta Aktin der Maus
Mouse_Acb-Probe	<b>Cy5-CATCACTATTGGCAACGAGCGG-BHQ3</b>	
Leish_AC-F2	CAGAACCGTGAGAAGATG	Nachweis der gDNA des Leishmania Aktins
Leish_AC-R	ACAGCCTGAATACCAATG	Nachweis der gDNA des Leishmania Aktins
Leish_AC-Probe	<b>FAM-CCTGGCTGGCCGGGA CCTGAC-BHQ1</b>	

### 3.1.5. Benutzte Plasmide

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
7,5 M Ammoniumacetat	54 g NH <sub>4</sub> -Acetat ad 100 mL H <sub>2</sub> O, autoklavieren
AP Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>
APS	10 % in ddH <sub>2</sub> O
Blockierlösung (Immunoblot)	5 % Milchpulver in 1xTBS, 0,1 % Tween-20
Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)	2 % w/v BSA in PBS, 0,1 % Triton X-100
Blotpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glyzin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	1 g/L Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES, pH 7,5, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6 mM Glukose
2x Laemmli	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 20 % Glyzerol
Permeabilisierungslösung	50 mM NH <sub>4</sub> Cl, PBS (pH 7,4), 0,1 % Triton X-100
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
5% Sammelgel	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1, 40 %), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
1x TAE	1mM EDTA (pH 8.0), 40 mM Tris-Acetat
10% Trenngel	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1, 40 %), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
1x PBS	2,68 mM KCL, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
TE-RNaseA	10 mM Tris, 1mM EDTA (pH 8.0), 20 µg/ml RNaseA
6x DNA-Ladepuffer	85% Formamid, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1 mg/ml Bromphenolblau, 1 mg/ml Xylenxya- nol
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS
1x PBS	0,137 M NaCl, 10,14 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,68 mM KCl, 1,76 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,4)
Waschpuffer (Immunoblot)	1xTBS, 0,02 % Tween-20

Tabelle 10: Verwendete Plasmide und deren Eigenschaften

Bezeichnung	Eigenschaft
pUC19	Das Plasmid hat eine Größe von 2868 bp und trägt ein Ampicillin Resistenzgen, als Selektionsmarker. pUC19 ist ein <i>high copy number</i> Plasmid mit einer hohen Replikationsrate.
pUC19-LdMT	Das Plasmid wurde in dieser Arbeit hergestellt. In das Plasmid pUC19 wurde das Miltefosin-Transportergen von <i>L. donovani</i> 1SR eingefügt. Das entstandene Plasmid hat eine Größe von 5977 bp.
pCL2N	Das Plasmid ist 7647 bp groß und besitzt ein Ampicillin Resistenzgen, sowie ein Neomycin Resistenzgen.
pCL2N-LdMT	Das Plasmid ist 10953 bp groß und enthält das Miltefosin-Transportergen zusätzlich zu den Eigenschaften des pCL2N-Plasmids.
pCL3S	Das Plasmid ist 7362 bp groß, mit einer Nurseothricin-Resistenz.
pCL3S-LdMT	Das Plasmid ist 10668 bp groß und enthält das Miltefosin-Transportergen zusätzlich zu den Eigenschaften des pCL3S-Plasmids.

### 3.1.6. Benutzte Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper, Verdünnungen und Herkunft

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
anti-Hsp100 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Hsp90 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Hsp70 IgY (pk, aus Huhn)	1:2000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Cpn 60.2 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Hsp23 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-p23 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Hsp20 IgY (pk, aus Huhn)	1:1000	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Cpn 10 IgY (pk, aus Huhn)	1:500	AG Clos, BNITM, Hamburg
anti-Huhn IgY AP-konjugiert	1:5.000	Dianova, Hamburg

### 3.1.7. Benutzte Puffer und Lösungen

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1. Zellkultur**

#### **3.2.1.1. Kultivierung von Leishmanien**

Leishmanien wachsen in Labor als Suspensionszellen in flüssigem Medium (M199+) bei 25°C und einem neutralen pH-Wert von 7,4. Dies entspricht den Bedingungen, welche Promastigote im Darm der weiblichen Sandmücke vorfinden. Für optimale Wachstumsbedingungen sollten die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bleiben, dafür werden die Kulturen zweimal wöchentlich verdünnt. Die Zelldichte wird mittels *CASY Cellcounter & Analyzer* bestimmt und auf  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen/ mL zum Beginn von Wachstumskurven (o.ä.) eingestellt.

#### **3.2.1.2. Kryokonservierung von Leishmanien**

Für die Langzeitlagerung von *Leishmania*-Kulturen werden diese in der Gasphase von flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür werden  $1 \times 10^8$  Parasiten aus einer logarithmischen Kultur sedimentiert, in 1 Vol M199+ Medium gemischt mit 1 Vol Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium enthält 20%DMSO, welches die Kristallbildung beim Einfrieren verhindert. Für ein langsames Abkühlen werden die Kulturen über Nacht bei -70°C gelagert und dann in die Kryolagerung überführt.

Für das Auftauen von Leishmanien werden die Proben etwa 1 min im 37°C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension dann in eine Zellkulturflasche mit 9 mL M199+ Medium und ggf. dem entsprechendem Antibiotikum überführt.

#### **3.2.1.3. Stocklösungen der Leitstrukturen herstellen**

Die Leitstrukturen werden in DMSO gelöst, so dass eine 10 mM Lösung entsteht. Dazu wird das Gefäß nach DMSO Zugabe zunächst auf dem Vortexer gemischt, dann für 10 min im Ultraschallbad behandelt und in Anschluss für 15 min auf dem Rollenschüttler geschüttelt. Die Lagerung der Leitstrukturen erfolgt im Kühlschrank.

### 3.2.1.4. Wachstumskurven/ Dosis-Wirkungskurven

Um Wirkstoff-Kandidaten auf ihre anti-parasitäre Wirkung zu testen, wird die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) bestimmt. Dazu werden  $1 \times 10^5$  Leishmanien/  $mL^{-1}$  eingesät und verschiedene Konzentrationen der zu testenden Leitstruktur/Substanz dazugegeben. Die Dosis-Wirkungskurven werden in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen oder in 24 well Platten durchgeführt. Wobei in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen 5 mL M199+ Medium vorgelegt werden. In die Vertiefungen der 24 well Platte werden jeweils 2 mL M199+ Medium gegeben. Nach 72 h wird die Zellzahl mit Hilfe des *CASY Cellcounter & Analyzer* bestimmt. Als unbehandelte Kontrolle dient eine Probe, welche nur mit DMSO behandelt wird. Die Ergebnisse werden mit dem Programm Prism dargestellt und daraus die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) ermittelt.

### 3.2.1.5. Selektion von spontanen Resistenzen in *Leishmania* Promastigoten

Für die Selektion von spontanen Resistenzen gegen verschiedene anti-parasitäre Leitstrukturen werden die Parasiten über einen längeren Zeitraum mit einer konstanten Konzentrationen der Leitstrukturen kultiviert. Für die Selektion von *L. donovani* 1SR werden Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 verwendet. Die Leishmanien werden mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  eingesät und zum M199+ Medium wurde die entsprechende  $IC_{50}$  der jeweiligen Leitstruktur zugegeben. Die Zellkonzentration werden nach 72 h mit Hilfe des *CASY Cellcounter & Analyzer* bestimmt und die Kultur in frischem M199+ Medium mit  $IC_{50}$  der Leitstruktur wieder auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  eingestellt. Diese Vorgehensweise wird so lange wiederholt, bis das Wachstum der Leishmanien Kulturen mit den Leitstrukturen dem Wachstum der unbehandelten Kontrolle gleicht, oder sogar übersteigt. An diesem Punkt werde die Konzentration der Leitstrukturen noch einmal auf  $IC_{75}$  erhöht und die Kulturen werden so lange weiter kultiviert, bis auch hier das Wachstum mit der Kontrolle gleichauf oder sogar stärker ist.

Tabelle 12: IC50 Konzentrationen zur Selektion von spontan resistenten *L. donovani* 1SR

Bezeichnung	IC <sub>50</sub>
Miltefosin	35µM
NMT-A001	9 µM
NMT-A002	1,9 µM
NMT-C0074	1,8 µM
NMT-H0080	7,5 µM

Für die Selektion auf dominante Resistenzmarker in *L.don*BPK091[pcos190] werden Miltefosine, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 und SbIII verwendet.

Tabelle 13: IC50 Konzentrationen zur Selektion von dominante Resistenzmerkmalen in *L.don*BPK091[pcos190]

Bezeichnung	IC <sub>50</sub>
Miltefosin	35µM
NMT-A002	1,9 µM
NMT-C0074	1,8 µM
NMT-H0080	7,5 µM
Antimon (Sb <sup>III</sup> )	112 µM

### 3.2.1.6. Isolation von Knochenmarksmakrophagen

Die Generierung von murinen Makrophagen erfolgt durch die Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen mittels der Zugabe von M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*). Der Faktor wird dem Medium zugeben, in welchem die isolierten Stammzellen kultiviert werden.

Für die Kultivierung der Makrophagen werden Femur und Tibia einer weiblichen, 6-8 Wochen alten C57Bl/6-Maus isoliert. Die präparierten Knochen werden mit 70% Isopropanol desinfiziert. Die Knochenenden werden entfernt und das Knochenmark wird mit Hilfe einer 20 mL Spritze herausgespült. Zum spülen der Knochen wird vorgewärmtes komplementiertes DMEM+ Medium verwendet. Die Zellsuspension wird in einer Petrischale aufgefangen und dann in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 min Inkubation auf Eis haben sich Knochensplitter am Boden abgesetzt und die Zellsuspension wird in ein 50 mL Falcon überführt. Die Zellsuspension wird bei 1250 x g, 10 min, 4°C sedimentiert und dann in 5 mL DMEM+ aufgenommen, die Zellen werden in eine T175 Zellkulturflasche

mit 35 mL DMEM<sup>+</sup> überführt. Die Inkubation erfolgt für 9 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wobei alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums durch DMEM<sup>+</sup> ersetzt wird.

Nach der Ausdifferenzierung werden die Makropagen aus den Zellkulturflaschen gelöst und in die benötigten Zellkulturplatten überführt.

Dazu werden die ausdifferenzierten Makrophagen zwei mal mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit 8 mL Trypsin-EDTA Lösung überschichtet. Nach 5-10 min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wird die Trypsinlösung durch Zugabe von 2 Vol DMEM<sup>+</sup> inaktiviert. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers aus der Flasche gelöst und in ein 50 mL Falcon überführt. Nach der Sedimentation bei 1250 xg, 10 min, 4°C werden die Zellen in 3-5 mL DMEM<sup>+</sup> aufgenommen und die Zellzahl wird bestimmt. Dazu werden 50 µL der Zellsuspension abgenommen und mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung versetzt, die gefärbte Zellsuspension wird in eine Neubauer Zählkammer (0,1 mm x 0,1 mm) überführt und die Makrophagen-Zahl/ mL wird bestimmt. Die *in vitro* Infektionsexperimente werden in 12 well Mikrotiterplatten durchgeführt. Es werden 2 x 10<sup>5</sup> Makrophagen pro well in 2 mL DMEM<sup>+</sup> ausgesät. Damit die Makrophagen wieder adhären können, werden die Platten für weitere 48 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.2.1.7. Ex vivo Infektionsstudien**

Für die *ex vivo* Infektionsstudie werden murine Makrophagen verwendet. Diese werden mit Leishmanien infiziert und die relative Parasitenlast mittels Taqman qPCR bestimmt (Bifeld, et al., 2016).

Die Kultivierung der Makrophagen erfolgt in 12 well Zellkulturplatten, mit jeweils 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well. Es wird mit einem Infektionsverhältnis von 1:20 (Makrophage: Leishmanien) infiziert. Dazu werden die Leishmanien am *CASY Cellcounter & Analyzer* gezählt. Die benötigte Menge an Parasiten wird sedimentiert und in vorgewärmten DMEM<sup>+</sup> aufgenommen. 500 µL Zellsuspension wird dann zu den Makrophagen gegeben und diese dann für 4 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und 2 mL DMEM<sup>+</sup> pro well zugegeben. Die Zeitpunkte der gDNA Isolation variieren je nach Experimente. Soll die Infektiosität der Parasiten bestimmt werden, wird bei einer Hälfte der Proben die gDNA 30 min nach Ende der Infektion isoliert und die zweite Hälfte der Proben wird 48 h nach Beginn der Infektion bearbeitet. Die gDNA Isolation erfolgt mit dem ISOLATE II Genomic DNA Kit der Firma Bioline nach den Angaben des Herstellers. Für den Test von Leitstrukturen auf ihre anti-parasitäre Wirkung

werden die Makrophagen ebenfalls für 4 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> infiziert. 24 h nach der Infektion wird frisches DMEM<sup>+</sup> zu den Makrophagen gegeben, welches die zu testenden Leitstrukturen enthält. Nach weiteren 48 h wird das Experiment beendet und die gDNA isoliert.

### **3.2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1. Transfektion von Leishmanien**

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen transienter Transfektion und stabiler Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird die eingebrachte zirkuläre DNA (Plasmid-DNA) episomal exprimiert. Bei der stabilen Transfektion hingegen wird die eingebrachte DNA, durch homologer Rekombination, in das Genom integriert.

Für das Einbringen von Plasmid-DNA oder linearer DNA-Fragmente in Leishmanien, wird die Methode der Elektroporation verwendet. Bei dieser Methode wird durch Anlegen einer elektrischen Spannung die Membran permeabilisiert, womit die DNA in die Zellen gelangen kann.

Es werden  $5 \times 10^7$  Leishmanien bei 4°C, 1250 x g, 10 min sedimentiert. Die Parasiten werden zweimal mit 20 mL kaltem PBS und anschließend mit 20 mL kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Leishmanien werden im 500 µL Elektroporationspuffer aufgenommen, so dass eine Suspension mit  $1 \times 10^8$  Zellen pro mL entsteht. 20 µg DNA wird in die gekühlte Elektroporationsküvetten vorgelegt, dann werden 400 µL der Zellsuspension zugegeben und elektroporiert (1,5 kV, 200 Ω Kapazität 25 µFD, Zeitkonstante 0,9-0,5, dreimaliges Pulsen). Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne DNA verwendet. Nach der Elektroporation werden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und in eine zuvor vorbereitete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 10 mL M199<sup>+</sup> Medium überführt. Nach 24 h Inkubation bei 25°C wird das Selektionsantibiotikum zugegeben, je nach eingebrachtem Plasmid kann das Selektionsantibiotikum variieren. Die Transfektion wird für 10-14 Tage bei 25°C inkubiert und ist beendet wenn die Parasiten der Probe absterben, welche keine DNA enthält.

### 3.2.2.2. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Die Isolation von Plasmid DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse (Sambrook, 2001). Für die Analyse eines Konstruktes wird zunächst eine geringe Menge DNA aus einer Bakterienkultur gewonnen. Dafür werden über Nacht 2 mL LB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum und einer transformierten Bakterienkolonie bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 16000 x g, 4°C, 3 min sedimentiert. Das Pellet wird in 100 µL Lsg. 1 aufgenommen, mit 200 µL Lsg. 2 versetzt und durch invertieren gemischt. Anschließend werden 150 µL der Lsg.3 zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Bei der Lyse entstandene Zelltrümmer werden bei 16000 x g, 4°C, 12 min sedimentiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 1 mL EtOH zugegeben und für 30 min bei 16000 x g, 20°C sedimentiert. Das Pellet wird mit 500 µL 70%igem EtOH gewaschen und bei 16000 x g, 20°C, 10 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet trocken gelassen, in 40 µL TE-RNaseA aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA kann nun für einen enzymatischen Restriktionsverdau verwendet werden,

### 3.2.2.3. Isolierung reiner Plasmid-DNA aus Leishmanien

Für die Isolierung von reiner Plasmid DNA werden über Nacht 200 mL *Cycle-Grow* LB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum und einer transformierten Bakterienkolonie bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden bei 5000 xg, 4°C, 20 min sedimentiert und in 5 mL Lsg.1 aufgenommen. Es werden 10 mL Lsg. 2 zugeben, invertiert und für 10 min bei RT auf dem Rollenschüttler inkubiert. Die Präzipitation der Proteine erfolgt durch Zugabe von 7,5 mL der SDS-haltigen Lsg.3. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wird die Probe sedimentiert (5000 x g, 4°C, 30 min) und der Nukleinsäure haltige Überstand über einen Faltenfilter filtriert. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 0,7 Vol% Isopropanol, invertieren und anschließender Sedimentation (3220 x g, 4°C, 30 min). Das erhaltene Pellet wird mit 10 mL 70%igem EtOH gewaschen und erneut bei 3220 x g, 4°C, für 30 min sedimentiert. Das Pellet wird in 4 mL TE-Puffer resuspendiert und mit 4,9 g Cäsiumchlorid, sowie 150 µL Ethidiumbromid (10 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Nachdem sich das Cäsiumchlorid vollständig gelöst hat, wird die Lösung mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Quick-Seal-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter) überführt und luftblasenfrei verschweißt. Es folgt eine Ultrazentrifugation bei 70 000 rpm, 25°C für 8 h., wobei ein CsCl-Gradient

entsteht in dem sich gDNA-, Plasmid-DNA- und RNA-Banden voneinander unterscheiden lassen. Die Bande der gDNA wird mit einer Spritze aus dem Quick-Seal-Ultrazentrifugenröhrchen isoliert. Die DNA wird zweimal mit je 1 Vol.% Ammonium-Acetat gesättigtem Isopropanol gewaschen. Bei diesem Vorgang entstehen zwei Phasen, wobei das Ethidiumbromid sich in der organischen Phase löst und abgenommen werden kann. Der Lösung werden dann 2 Vol. ddH<sub>2</sub>O, 0,1 Vol. 7,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2,5 Vol. 96% Ethanol zugegeben und die DNA gefällt (3220 x g, 4°C, 30 min). Das Pellet wird dann in 200-500 µL TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 8°C resuspendiert. Die DNA Konzentration wird mittels Photometer bestimmt und die Sequenz des Konstruktes durch Sequenzierung überprüft.

#### **3.2.2.4. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der klonierten DNA Konstrukte stellt sicher, dass es in Vergleich zu dem Referenzgenom keine Veränderungen oder Verschiebungen in der Basenabfolge gibt. Die Sequenzierung erfolgt nach der Sanger Methode und wird von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Je Konstrukt wird 1 µg Plasmid-DNA und 1,4 µM des jeweiligen *forward* bzw. *reverse* Primers in einem Endvolumen von 14 µL gemischt. Die Analyse der Daten erfolgt mit der Software MacVector, Version 15.1.1.

#### **3.2.2.5. Isolierung von Cosmid-DNA aus einer Bakterienkultur**

Für die Isolation von Cosmid-DNA aus *E.coli* XL one blue wird das NucleoBond Xtra Maxi Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die isolierten Cosmide werden dann mittels *Next-Generation sequencing* analysiert.

#### **3.2.2.6. Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren**

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine Methode zur Isolierung von Nukleinsäuren, hier wird die Methode verwendet um die Cosmiden aus den selektierten Leishmanien zu isolieren.

Der Nukleinsäure-haltigen Lösung wird 0,1 Vol 4,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 1 Vol Phenollösung (Tris stabilisiert, pH 8,0) zugegeben und für 5 min bei RT invertiert. Es wird 1 Vol

Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) zugegeben und erneut 5 min bei RT invertiert. Die Lösung wird für 5 min, RT, bei 3200 x g sedimentiert und die entstandene untere (organische) Phase wird abgenommen. Es wird 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) zugegeben und nach 5 min invertieren wird die Lösung sedimentiert (5min, RT, 3200 x g). Nach der Phasentrennung wird die obere Phase entfernt ohne die Interphase zu stören, ggf. wird etwas der oberen Phase stehen gelassen. Es werden 2,5 Vol EtOH zugeben, invertiert und 50 min, RT, 3200 x g zentrifugiert. Das EtOH wird abgenommen und das Pellet bei RT trocknen gelassen. Das Pellet wird in 400 µL TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 8°C gelagert. Es werden 0,1 Vol 7,5 M NH<sub>4</sub>Acetat und 2,5 Vol EtOH zugegeben, invertiert und 30 min, RT, 3200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet, bevor es in 40 µL TE-Puffer restpendiert wird. Die DNA kann nun für weitere Versuche verwendet werden, hier zuerst ein Restriktionsverdau gefolgt von der Transformation in *E. coli* XL one blue Zellen.

### 3.2.2.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer wird die Absorption einer Basenpaarung der Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit ( $OD_{260} = 1$ ) 50 µg mL<sup>-1</sup> dsDNA (doppel-strängige DNA) oder 40 µg mL<sup>-1</sup> RNA. Die Absorption von Proteinen wird bei 280 nm bestimmt. Die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wird durch die Bildung des 260/280-Quotient bestimmt, wobei reine DNA einen Quotienten von 1,8 aufweist und reine RNA einen Quotienten von 2.

### 3.2.2.8. Cos-Seq und Next Generation Sequencing

Für die Identifizierung von Resistenzgenen in *Leishmania*-Promastigoten wird neuerdings die Cos-Seq (*Cosmid-Sequencing*) Methode verwendet. Die Methode der funktionellen Komplementation mit Cosmid-Genbanken wird dabei mit darauf folgender *deep sequencing* Analyse durch *Next Generation Sequencing* (NGS) verbunden (Choudhury, et al., 2008, Nuhs, et al., 2014, Tejera Nevado, et al., 2016). Bei der Methode des NGS handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Sequenzierung, wodurch schneller größere Datensätze analysiert werden können.

Die *Leishmania*-Akzeptor Population wird mit der Cosmid-Genbank transfiziert und die entstandenen Mischpopulation mit dem zu testenden Wirkstoff behandelt. Die selektierten Cosmide können durch alkalische Lyse isoliert und für die NGS-Analyse vorbereitet werden. Dazu wird die DNA unspezifisch fragmentiert und mit Adapter-Sequenzen versehen, wodurch eine DNA *library* entsteht. Diese markierten DNA Moleküle werden durch PCR amplifiziert. Die komplementären Oligonukleotide der Adapter-Sequenzen sind kovalent an einen Glasobjektträger (FlowCell) gebunden, so dass sich die markierten DNA Fragmente anlagern können. Die Fragmente werden amplifiziert (Brücken-Amplifikation), wobei in der *flow cell cluster* der amplifizierten DNA Fragmenten entstehen (klonale Amplifikation). Die Sequenzierung erfolgt dann mittels Einbaus fluoreszenzmarkierter Nukleotide und reversibler Terminatoren. In jedem Sequenzierungs-Zyklus sind alle vier, unterschiedlich Fluoreszenz-markierten Nukleotide vorhanden, jedoch wird nur das jeweils komplementäre Nukleotid integriert. Das dabei entstehende Fluoreszenz Signal wird dokumentiert und die Basenabfolge wird ermittelt. Dann wird der reversibel assoziierte Terminator entfernt, so dass ein weiterer Sequenzierungs-Zyklus beginnen kann. Die ermittelten Basenabfolgen können dann mit dem Referenzgenom abgeglichen werden und mögliche Sequenzabweichungen erkannt werden (Metzker, 2010, van Dijk, et al., 2014).

Vor der Herstellung der DNA *library* wird die DNA Konzentration der Proben mittels dem Qubit (3.0)-System von Invitrogen ermittelt und die Proben auf eine Konzentration von 0,2 ng/ $\mu$ L verdünnt. Die DNA *library* wird dann mit dem *Nextera XT library prep* Kit FC-131-1024 (Illumina) erstellt. Für die Fragmentieren und das anbringen der Adapter-Sequenzen wird 1 ng DNA eingesetzt. Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte mit dem *Agencourt AMPure XP* Kit von Beckman Coulter. Die Qualität der DNA wird mit dem Bioanalyzer (Agilent) überprüft, dazu wird das *high sensitivity DNA analysis Kit* (Agilent) verwendet. Mit dieser Methode wird auch die durchschnittliche Länge der Fragmente gemessen. Die verschiedenen DNA *libraries* werden auf 4 nM eingestellt und gemischt. Die Denaturierung der DNA erfolgt durch Zugabe von 0,2 N NaOH auf eine Endkonzentration von 20 pM. Die finale Konzentration von 10 pM wird durch die Zugabe der Referenz *library* (PhyX) erreicht. Eine erneute Denaturierung der DNA mit NaOH hilft bei dem GC reichen Genom der Leishmanien eine gute *cluster* Bildung zu gewährleisten. Dafür wird die DNA für 2 min bei 95°C erhitzt, das Reaktionsgefäß 2-4 x invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nun kann die gesamte Probe auf die *cartridge* aus dem MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina) aufgetragen werden. Der Sequenzierungslauf erfolgt mit dem MiSeq System von Illumina.

### 3.2.2.9. Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (engl. **polymerase chain reaction, PCR**) werden bestimmte DNA Fragmente mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert. Die Denaturierung der Ausgangs-DNA erfolgt durch Erhitzen, im nächsten Schritt lagern sich die Primer an die zugehörigen spezifischen Sequenzen an. Während der Elongation wird an der DNA von Startpunkt des Primers aus, der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Die Synthese des neuen DNA Stranges aus einzelnen Nukleotiden erfolgt durch die thermostabile Taq Polymerase. Dieser Vorgang wird 30 mal wiederholt. So erfolgt eine exponentielle Vermehrung der gewünschte DNA Sequenz mit jedem Zyklus. Es erfolgt noch eine terminale Elongationsphase, bei welcher unvollständig synthetisierte DNA-Stränge vervollständigt werden können. Das verwendete PCR Programm wird individuell an die verwendeten Primer und die Ausgangs DNA angepasst. Die Temperatur des Annealing Schrittes richtet sich dabei nach dem GC-Gehalt der Primer.

1.	Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
2.	Denaturierung	98 °C	1 min	29 Wiederholungen der Schritte 2.-4.
3.	Annealing	68 °C	30 sec	
4.	Elongation	72 °C	1 min 45 sec	
5.	finale Elongation	72 °C	5 min	

### 3.2.2.10. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Methode der Gelelektrophorese werden DNA Fragmente ihrer Größe nach auf einem Agarosegel aufgetrennt. Grundlage dieser Methode ist die Mobilität geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Je höher der Prozentsatz an Agarose im Gel, desto besser lassen sich kleine DNA Fragmente auftrennen und umgekehrt. Die negativ geladenen DNA Fragmente wandern je nach ihrer Größe weiter im Gel, je kürzer das Fragment, desto weiter die Laufstrecke auf dem Gel.

Es wurde 1% w/v Agarose in TAE-Puffer durch Kochen vollständig gelöst und nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA, sodass diese später auf dem Gel mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden kann. Die Stärke des elektrischen Feldes richtet sich nach der Größe des Agarosegels, 10 V/cm für eine Dauer von 1-2 h. Das Gel wird fotografisch

dokumentiert und bei Bedarf werden die entsprechenden Banden für eine spätere Weiterverwendung aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

### **3.2.2.11. Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Nach der elektrophetischen Auftrennung der DNA Fragmente kann die DNA aus dem Agarosegel aufgereinigt werden. Dazu wird die Bande des Fragmentes auf dem UV-Lichttisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgt dann mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up der Firma Macherey-Nagel, nach dem angegebenen Protokoll. Die isolierte und gereinigte DNA wird dann für weitere Experimente verwendet.

### **3.2.2.12. Restriktionsverdau von Plasmid DNA**

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an einer spezifischen 4-8 Basenpaare langen palindromischen Sequenzen. Dabei entstehen je nach verwendetem Enzym überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*).

Das Öffnen der Plasmid DNA mit Restriktionsenzymen dient entweder der Analyse des vorliegenden Produktes oder der Vorbereitung für die spätere Weiterverarbeitung. Um z.B. zu prüfen ob die eingebrachte Sequenz richtig integriert wurde, wird das Plasmid mit einem ausgewählten Restriktionsenzym geschnitten und das entstehende Bandenmuster auf dem Agarosegel mit der zu erwartenden Fragmentgröße abgeglichen. Für einen analytischen Restriktionsverdau werden 1 µg DNA eingesetzt, für einen präparativen Restriktionsverdau werden 10 µg DNA verwendet. Die Reaktion erfolgt für 1 h bei 37°C. Bei einem präparativen Restriktionsverdau wird erst nach 1 h die zweite Hälfte der gesamten Enzymmenge (60 Units) zugegeben und für 1 h erneut inkubiert. Bei einem analytischen Restriktionsverdau werden 2 Units des Restriktionsenzym verwendet.

### **3.2.2.13. Ligation**

Bei der Ligation werden zwei DNA Stände durch eine enzymatische Reaktion kovalent miteinander verbunden. Die T4 Ligase verbindet die beiden DNA Stränge durch Bildung einer Phosphodiesterbindung unter dem Verbrauch von ATP. Die Technik wird verwendet um z.B. ein zuvor amplifiziertes PCR Produkt in einen Vektor einzubringen. Die Ligationsreaktion findet in einem Endvolumen von 10 µL statt. Es wird ein Verhältnis von

Insert:Vektor von 3:1 gewählt. Die Reaktion erfolgt bei überhängenden DNA-Enden über Nacht bei 4°C oder für die Verknüpfung von glatten DNA-Enden für 3 h bei RT. Es wird eine Kontrolle ohne Insert bearbeitet, um zu prüfen, ob der Vektor in Abwesenheit des Insert religiert.

### 3.2.2.14. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (TaqMan qRT-PCR)

Bei der TaqMan PCR wird die Amplifikation eines Gens (*gen of interest*, GOI) mittels fluoreszenzmarkierten Sonden über den zeitlichen Verlauf der Reaktion aufgezeichnet und zu einem Referenzen-Gen, hier  $\beta$ -Aktin ins Verhältnis gesetzt. Es werden für das GOI und Referenz-Gen sequenzspezifische Oligonukleotide (Sonden) verwendet, welche an einem Ende einen Fluoreszenz Farbstoff tragen und am anderen Ende einem Quencher. Durch die Wahl verschiedener Fluorochrome könne verschiedene Sonden differenziert werden. Auf Grund der räumliche Nähe von Flurochrom und Quencher findet keine Emission des Floureszenzsignales statt. Nach der Amplifikation des DNA Strangs kommt es jedoch zum Abbau der Sonde durch die Exonuclease Aktivität der Taq-Polymerase und das Fluoreszenzsignal wird freigesetzt. Somit ist die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Amplifikation des GOI, sowie des Referenz-Gens. Für die Analyse kann nun das GOI im Verhältnis zum Referenz-Gen ausgewertet werden.

Als GOI wurde hier das  $\beta$ -Aktin Gen von Leishmanien verwendet, die Sonde ist mit dem CY5 Farbstoff markiert. Die Anregungswellenlänge von CY5 ist bei 649 nm und die Emissionswellenlänge bei 670 nm. Als Referenz-Gen dient das murine  $\beta$ -Aktin Gen, die Sonde ist mit dem FAM Farbstoff markiert. Für FAM liegt die Anregungswellenlänge bei 494 nm und die Emissionswellenlänge bei 518 nm.

Für die Auswertung werden die CT-Werte (*cycle threshold*) aus der exponentiellen Amplifikationsphase verglichen. Die CT-Werte des Leishmanien-Aktins werden gegen die Maus-Aktin CT-Werte normalisiert ( $\Delta$ CT-Methode). Als Kontrolle werden die CT-Werte der DMSO-selektierten Parasiten zu Grunde gelegt. Die Quantifizierung der relativen Parasitenlast erfolgt nun durch vergleichen der Differenz von Probe und Kontrolle ( $\Delta\Delta$ CT =  $\Delta$ CT<sub>Probe</sub> -  $\Delta$ CT<sub>Kontrolle</sub>).

### **3.2.2.15. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (SYBR Green qRT-PCR)**

Für die Quantifizierung eines spezifischen Genproduktes wird die *SYBR Green* qRT-PCR verwendet. Bei dieser Methode wird während der Entstehung des PCR Produktes der fluoreszierender Farbstoff *SYBR Green* in das PCR Produkt eingelagert. Der Fluoreszenz Farbstoff *SYBR Green* hat Anregungswellenlänge bei 494 nm und die Emissionswellenlänge bei 521 nm. Bei dieser Methode werden auch unspezifisch amplifizierte DNA Moleküle mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Somit kann bei dieser Methode nur ein Gen quantifiziert werden, ein Nachteil gegenüber der TaqMan qRT-PCR. Um auch hier das GOI und das  $\beta$ -Aktin Gen quantifizieren zu können, werden zwei separate Proben analysiert. Später kann dann das Referenz Gen zu dem GOI in Verhältnis gesetzt werden. Diese Methode wird zur Quantifizierung der RNA, wie etwa für die Verifizierung von Gen *knock-outs*, verwendet.

## **3.2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der Methode der SDS-PAGE werden Proteine mittels eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Separation erfolgt unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen, um die sekundär Struktur der Proteine zu zerstören. Die geladenen Proteine der Proteinseitenketten werden durch die Zugabe von SDS geschützt, so dass auf Grund der entstandenen negativ Gesamtladung die Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Bei der Proben Herstellung für die SDS-PAGE wird zunächst die Zellzahl mittels des *CASY Cellcounter & Analyzer* bestimmt, die gewünschte Anzahl Parasiten entnommen und bei 4°C, 1250 xg, 10 min sedimentiert. Die Parasiten werden mit 10 mL 1xPBS gewaschen und erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird je nach gewünschter Konzentration in 1xPBS resuspendiert und mit 1x Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Denaturierung der Probe erfolgte für 10 min bei 95°C und wurde im Anschluss direkt elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurde in einem vertikalen Gel-Gießstand zunächst ein 10 %iges Trenngel gegossen. Dafür wurden zwischen zwei Glasplatten zwei Abstandhalter gesetzt und in den Gießstand eingespannt. Während der Polymerisation wird das Trenngel mit Ethanol überschichtet, welches jedoch vor dem Gießen des 5 %igen Sammelgels wieder entfernt wird. Das Sammelgel wird auf das feste Trenngel gegossen und der Probenkamm sofort in das Sammelgel eingesetzt, welches nun polymerisiert. Das Gel wird nun in eine Gelkammer eingesetzt und vollständig mit 10x SDS-Laufpuffer überschichtet. Der Probenkamm wird entfernt und die zuvor hergestellten Proben werden in die Probentaschen geladen. Des Weiteren wird ein Größenstandard geladen für einen späteren Größenvergleich der aufgetrennten Proteine. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 15 V/cm. Es erfolgte weiterhin eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau oder der Transfer auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).

### **3.2.3.2. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung**

Das Anfärben der Proteine erfolgte mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250. Dieser Farbstoff färbt unspezifisch alle Proteine an. Dies geschieht durch Anlagerung an die basischen Seitenketten der Aminosäuren. Das Gel wird aus der Gelkammer entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel wird über Nacht in Coomassie Färbelösung gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes, wird das Gel für mehrere Stunden in Coomassie Entfärbelösung inkubiert, welche dabei mehrfach ausgewechselt wird. Sobald Proteinbanden auf dem Gel zu erkennen sind, erfolgt die Digitalisierung des Gels und das Gel wird zur Lagerung zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

### **3.2.3.3. Western Blot**

Für die Analysen mittels Western Blot wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei die Proteine anhand ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Dann erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Transfer aus dem Gel auf eine aktivierte PVDF Membran, wo die Proteine auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran binden. Es wurde das *semi-dry* Blotverfahren angewendet. Dazu wurde zuerst ein mit Blotpuffer getränktes Whatman Filterpapier in die Kathodenplatte der Blotkammer gelegt. Darauf wurde das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und von der zuvor in Methanol aktivierten Membran überdeckt. Den Abschluss bildete wieder ein in Blotpuffer getränktes Whatman Filterpapier. Die Anodenplatte wurde Luftblasen frei aufgelegt und somit die Blotkammer geschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte für einen Zeitraum von einer

Stunde mit einer Stromstärke von  $1\text{mA}/\text{cm}^2$ . Die Membran wurde direkt für den immunologischen Nachweis der Proteine verwendet.

#### **3.2.3.4. Immunoblot**

Die mittels Western Blot immobilisierten Proteine können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran für mindestens 1h in Blockierlösung inkubiert. Der primär Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt und die Membran darin für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Im folgenden wird die Membran drei mal mit Waschpuffer gewaschen und der sekundär Antikörper, verdünnt in Blockierlösung zugegeben. Der Blot wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen und dann für 10 min in AP-Puffer inkubiert. Der Sekundär Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase konjugiert, so dass durch Zugabe der Substrate ein Farbniederschlag entsteht. Der kolorimetrische Nachweis der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyolphosphat (BCIP) als chromogenes Substrat mit 4- Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Durch die Alkalische Phosphatase wird dabei die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP katalysiert und die Umwandlung in Indoxylderivat findet statt. Dieses wird durch NBT oxidiert und zum blauen Farbniederschlag Indigo dimerisiert. Die Farbreaktion wurde durch spülen der Membran mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  beendet und nach trocknen der Membran wurde diese digitalisiert.

#### **3.2.3.5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden bestimmte Zellstrukturen oder Organellen spezifisch angefärbt. Die Methode dient zur visuellen Kontrolle der Auswirkung der Leitstrukturen auf die Parasiten. Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Färbung des Nukleus und des Kinetoplasten genutzt. Für die Färbung des Mitochondriums wird der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos verwendet.

Für die Färbung der Parasiten mit MitoTracker Red wird der Farbstoff in die Parasitenkultur gegeben, wo der Farbstoff die Leishmanien Membran mittels passiver Diffusion überwindet und in aktiven Mitochondrien akkumuliert.

$1 \times 10^5/\text{mL}$  Parasiten werden in einer 24 well Platte für 24 h mit  $\text{IC}_{50}$  der Leitstrukturen inkubiert. Der MitoTracker Red Farbstoff wird mit einer Endkonzentration von 200 nM direkt in das Medium der Parasiten gegen und gut gemischt. Nach 15 min werden die Parasiten sedimentiert ( $4^\circ\text{C}$ ,  $1250 \times g$ , 10 min), in 1x PBS aufgenommen und auf einem

Objektträger ausgestrichen. Der Objektträger wird im Dunkeln getrocknet und die Parasiten im Anschluss für 3 min in eiskaltem Methanol fixiert. Der Objektträger wird einmal für 5 min mit Waschlösung gewaschen und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Nachfolgend werden die Objektträger für 15 min mit Permeabilisierungslösung behandelt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird der Objektträger 1 h mit Blockierlösung inkubiert. Für die Färbung des Nukleus und des Kinetoplasten werden die Parasiten für 30 min mit DAPI, welches in Blockierlösung verdünnt ist, gefärbt. Im Anschluss wird der Objektträger drei mal für jeweils 5 min mit Waschlösung gewaschen. Zur Konservierung der Färbung werden die Objektträger mit einem Tropfen Mowiol überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen. Die Lagerung erfolgte im Dunkel bei 4°C. Das Mikroskopieren der Objektträger erfolgt mit dem EVOS FL Auto *Cell Imaging System*.

### **3.2.4. Datenverarbeitung**

Die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen werden mit der Software MacVector 15.5.1 durchgeführt. Für die Digitalisierung von Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Polyacrylamid-Gelen sowie Immunblots wird ein Flachbettscanner (Epson *Perfection V700 Photo*) verwendet. Alle Graphen werden mit der Software Prism 5.0a erstellt. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgt zum Teil mit der Software Intaglio 3.9.4.

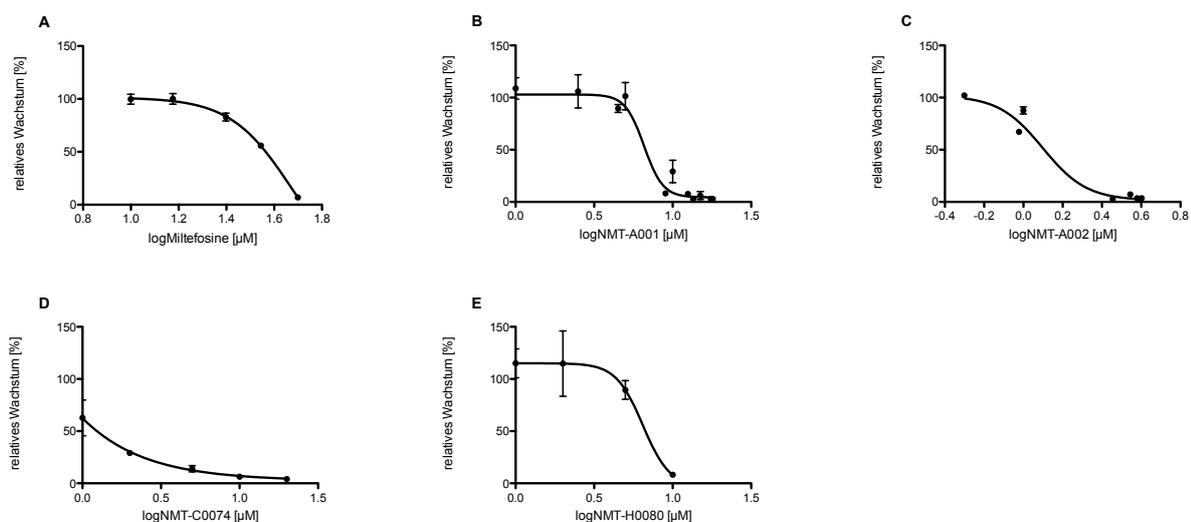
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Analyse der Leitstrukturen

#### 4.1.1. Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>)

Um die Aktivität der Leitstrukturen zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Es wurden *L.don* 1SR Promastigote mit ansteigenden Konzentrationen der Leitstrukturen inkubiert und die Zelldichte nach 72 h bestimmt. Die Zellzahlen wurden als relatives Wachstum ([%] bezogen auf die DMSO-Kontrolle) angegeben. Anhand der gewonnenen Daten wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) bestimmt (Abb.2).

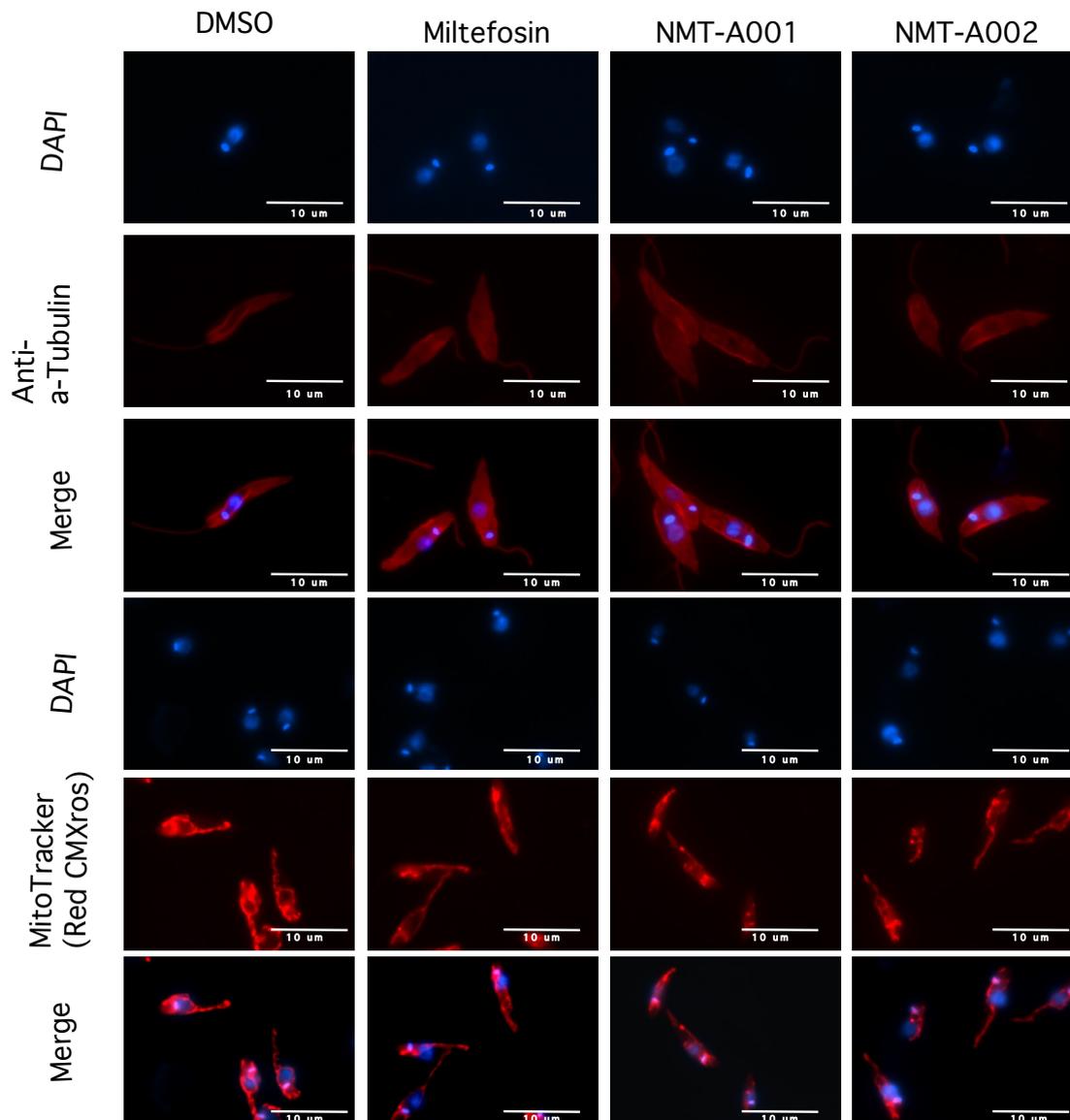
Für Miltefosin ergab sich ein IC<sub>50</sub> von 35  $\mu$ M (A). Für NMT-A001 lag der IC<sub>50</sub> bei 9  $\mu$ M (B); für NMT-A002 bei 1,9  $\mu$ M (C); für NMT-C0074 bei 1,8  $\mu$ M (D) und für NMT-H0080 bei 7,5  $\mu$ M (E). Im Vergleich zu Miltefosin zeigten alle Leitstrukturen eine um eine Größenordnung höhere Aktivität.



**Abb.2 Bestimmung der IC<sub>50</sub> der Leitstrukturen auf *L.don* 1SR.** Es wurden  $1 \times 10^5$  Parasite/mL aus einer logarithmisch wachsenden Kultur mit ansteigenden Konzentrationen der Leitstrukturen eingesät. Nach 72 h wurde die Zelldichte erneut gemessen und daraus das relative Wachstum ([%] bezogen auf DMSO-Kontrolle) abgeleitet. Zur Bestimmung des IC<sub>50</sub> wurden die Konzentrationen der Leitstrukturen logarithmisch gegen das relative Wachstum aufgetragen.

Für eine Bewertung der Toxizität der Leitstrukturen NMT-A001/NMT-A002 wurden die behandelten Leishmanien einer morphologischen Analyse unterzogen. Dazu wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellkern (DAPI), Tubulin (anti- $\alpha$ -Tubulin) und das Mitochondrium (MitoTracker (Red CMXros)) angefärbt. *L.don* 1SR Promastigote wurden für 24 h mit den jeweiligen IC<sub>50</sub> der Leitstrukturen behandelt. Die Färbung des

Mitochondriums erfolgt durch Zugabe des Farbstoffes MitoTracker zu der Parasitenkultur, wobei der Farbstoff durch die Zellmembran diffundiert und im Mitochondrium der Parasiten akkumuliert. Danach wurden die Parasiten auf Objektträgern fixiert und mit DAPI bzw. DAPI/anti- $\alpha$ -Tubulin gefärbt.



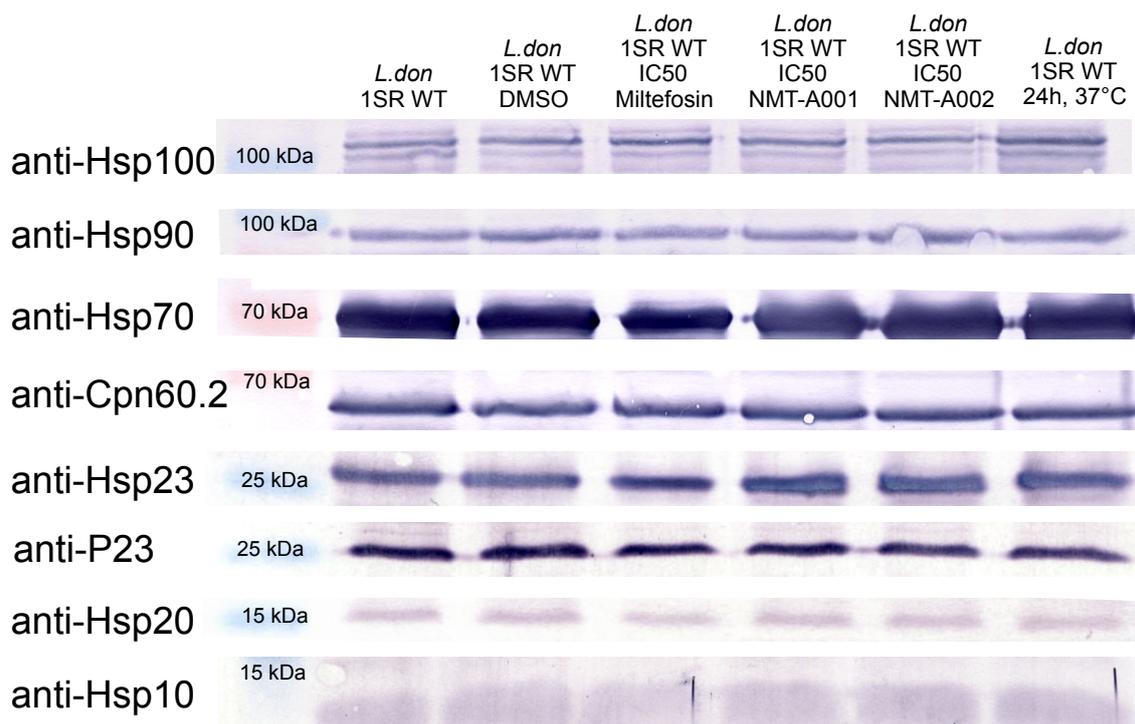
**Abb.3 Immunfluoreszenzanalyse der mit Miltefosin, NMT-A001 und NMT-A002 behandelten *L. don* 1SR.** *L. don* 1SR Promastigote wurden für 24 h mit  $IC_{50}$  von Miltefosin, NMT-A001 und NMT-A002 behandelt. Für die morphologische Analyse wurde der Zellkern (DAPI), Tubulin (anti- $\alpha$ -Tubulin) und das Mitochondrium (MitoTracker (Red CMXros)) gefärbt. Die Aufnahmen wurden am Epifluoreszenzmikroskop (EVOS) angefertigt.

Es waren durch die Behandlung mit den Leitstrukturen Miltefosin, NMT-A001 und NMT-A002 keine morphologischen Veränderungen zu erkennen. Die mit anti- $\alpha$ -Tubulin gefärbten Promastigoten zeigten die gleiche Zellkörperform wie die Parasiten der Negativkontrolle (DMSO). In der Färbung mit MitoTracker (Red CMXros) zeigte sich, dass

die Mitochondrien der Leishmanien nach Behandlung intakt blieben. Es gab bei  $IC_{50}$  daher noch keine Hinweise auf zytotoxische Effekte von NMT-A001 und NMT-A002.

#### 4.1.2. Hitzeschock-Antwort auf die Behandlung mit den Leitstrukturen

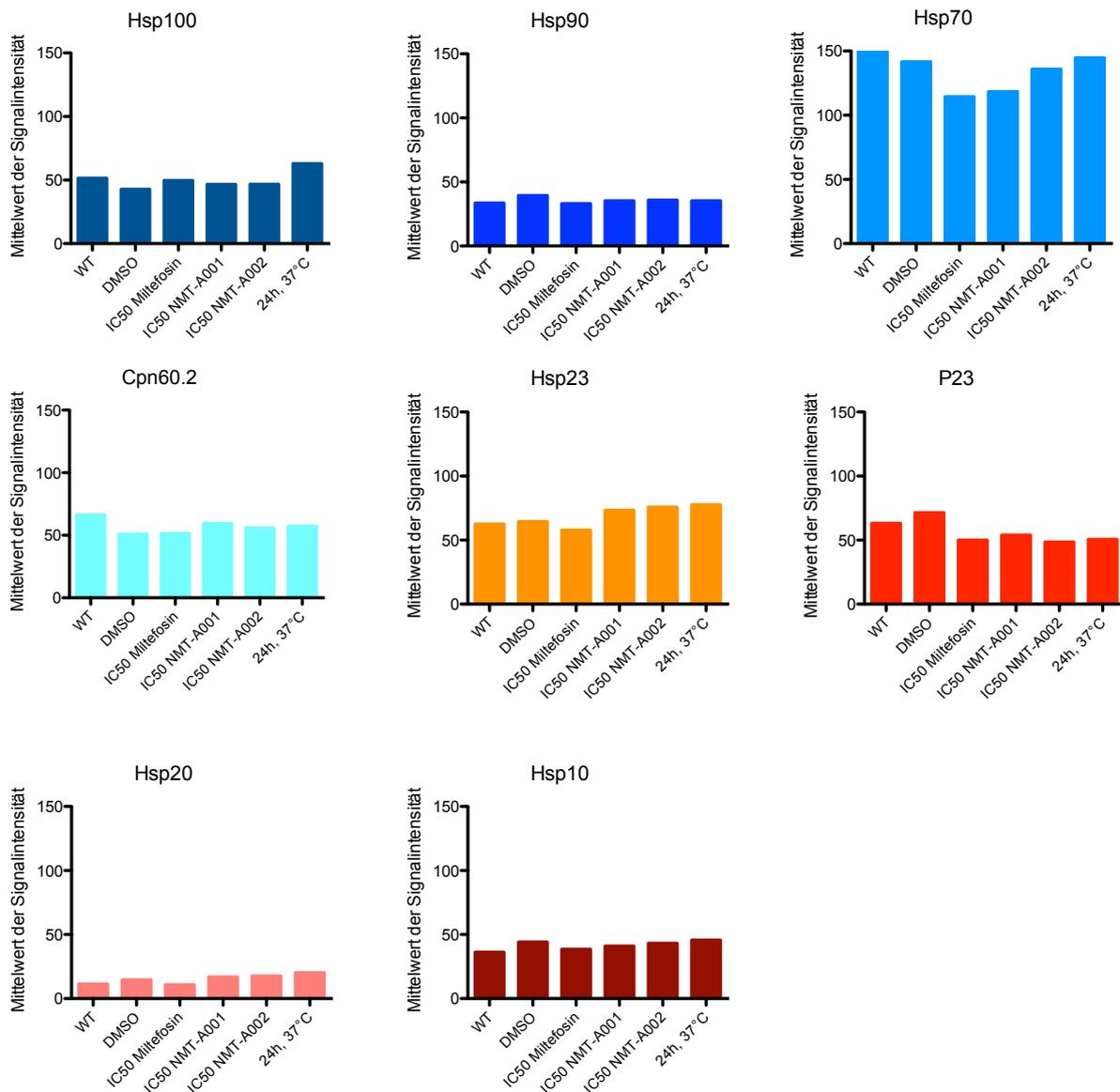
Eine Erhöhung der Abundanz von Hitzeschockproteinen ist eine beschriebene Reaktion auf verschiedene Stressoren bei Leishmanien, wie auch bei fast allen anderen Organismen. Dazu gehören neben Temperaturerhöhungen auch die Behandlung mit Chemikalien/Medikamenten (Vonlaufen et al., 2008). Um Veränderungen der Abundanz verschiedener Hitzeschockproteine zu ermitteln, wurden Western Blots durchgeführt. Die Parasiten wurden für 24 h mit den  $IC_{50}$  für Miltefosin und für die Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 inkubiert, dann wurden Gesamtzellextrakte der Parasiten hergestellt und für eine Westernblotanalyse verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Lysat von Promastigoten, die für 24 h bei 37°C kultiviert wurden (Hitzeschock) (Abb.4).



**Abb.4 Effekt von  $IC_{50}$  Miltefosin, NMT-A001 und NMT-A002 auf die Proteinabundanz der Hitzeschockproteine in *L. don* 1SR.** Die Parasiten wurden für 24 h mit Miltefosin, NMT-A001 und NMT-A002 behandelt. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und für Immunoblots verwendet.

Zur Analyse der Western Blots erfolgte eine Quantifizierung der Banden mit dem Programm ImageJ. Für alle digitalisierten Western Blots wurde die Intensität der Banden

in einem definierten, feststehenden Bereich gemessen und der Mittelwert der Signalintensität in Abb.5 dargestellt.



**Abb.5 Signalintensitäten der Western Blot Banden** Die digitalisierten Western Blots aus Abb 4 wurden für eine Analyse mit ImageJ verwendet. In einem definierten Bereich wurde die Intensität der Banden gemessen und der Mittelwert dargestellt.

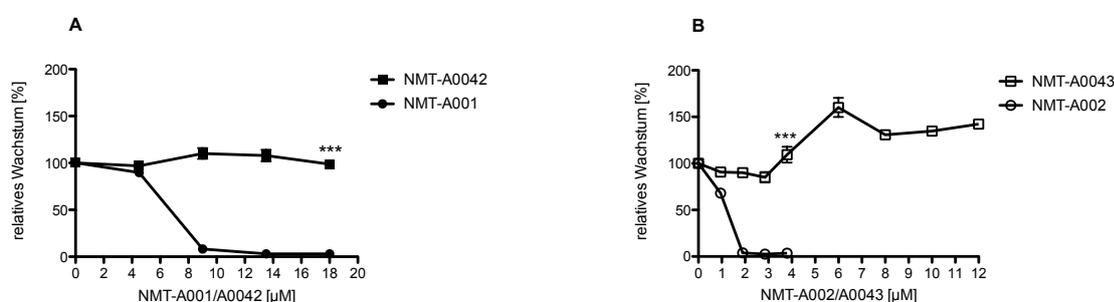
Bei der Positivkontrolle war eine Verstärkung der Bande für Hsp100 zu sehen, die über dem Signal der DMSO-behandelten Probe (Abb.4) lag. Auch bei der Quantifizierung mit ImageJ (Abb.5) wurde für die Positivkontrolle ein höheres Signal für Hsp100 gemessen. Bei der Behandlung mit IC<sub>50</sub> von NMT-A001 und NMT-A002 war eine Verstärkung der Bande für Hsp23 zu sehen. Auch die ImageJ Analyse zeigte für Hsp23 höhere Werte, die im Bereich der Positivkontrolle waren. Hsp23 schützt Leishmanien gegen verschiedenen Stressoren, wie z.B. erhöhte Temperaturen oder Proteinfaltungstress (Hombach et al.,

2014). Die Behandlung mit  $IC_{50}$  der Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 stellt für *Leishmania* Promastigoten eine Form von Stress dar, worauf die Parasiten mit verstärkter Abundanz von HSP23 reagieren.

#### 4.1.3. Wachstumskinetik der biotinylierten Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002

Für die Identifizierung von Interaktionspartnern der Leitstrukturen wurden die Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 biotinyliert. Durch Streptavidin gekoppelte Magnetpartikel können die Leitstrukturen wieder aus *Leishmania* Gesamtzellextrakten isoliert und ihre Bindungspartner ko-präzipitiert werden.

Zuerst wurden die biotinylierten Leitstrukturen auf ihre anti-*Leishmania*-Aktivität überprüft. Dafür wurden Dosis-Wirkungskurven mit den biotinylierten und den unmarkierten Leitstrukturen erstellt. *L. don* 1SR Promastigote wurden mit  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  oder  $IC_{100}$  der Leitstrukturen behandelt. Nach 72 h wurde die Zellzahl bestimmt und das relative Zellwachstum bezogen auf die DMSO-Kontrolle [100%] bestimmt.



#### Abb.6 Effekt der Leitstrukturen NMT-A001, NMT-A002 und deren biotinylierten Derivaten auf das Wachstum von *L. don* 1SR

Es wurden  $1 \times 10^5$  Parasiten/mL aus einer logarithmisch wachsenden Kultur ohne und mit ansteigenden Konzentrationen der Leitstrukturen in M199+ Medium eingesät. Nach 72 h wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahlen wurden als relatives Wachstum [%] dargestellt.  $n=4$ , \*\*\*= $p \leq 0,001$  (*U*-Test).

Für die mit NMT-A001 behandelten Parasiten war bei steigender Konzentration eine Abnahme des relativen Wachstums zu erkennen (Abb.6, A). Für die mit NMT-A0042 (NMT-A001+Biotin) behandelten Parasiten wurde keine Hemmung des Wachstums gemessen. Bei einer Behandlung mit 18  $\mu$ M NMT-A001 zeigten die Parasiten 1,6% relatives Wachstum. Die mit 18  $\mu$ M NMT-A0042 behandelten Parasiten zeigen dagegen ein relatives Wachstum von 96,7% und somit ein signifikant besseres Wachstum als die mit

nicht-biotinylierten Leitstrukturen behandelten Parasiten (\*\*\*)=  $p \leq 0,001$  (*U*-Test)). Bei einer Konzentration von 3,8  $\mu\text{M}$  NMT-A002 war ein relatives Wachstum von 3,6% zu erkennen. Bei der selben Konzentration des biotinylierten Derivats (NMT-A0043) lag das relative Wachstum bei 109,4%. Bei der Behandlung mit NMT-A0043 war das Wachstum signifikant höher (\*\*\*)=  $p \leq 0,001$  (*U*-Test).) als bei der Behandlung mit NMT-A002.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigten, dass die biotinylierten Derivate keine anti-*Leishmania*-Aktivität haben, daher wurden keine weiteren Versuche zur Identifizierung der Bindungspartner durchgeführt.

## 4.2. Erworbenen Resistenzen

### 4.2.1. Cosmid-Sequenzierung (Cos-Seq)

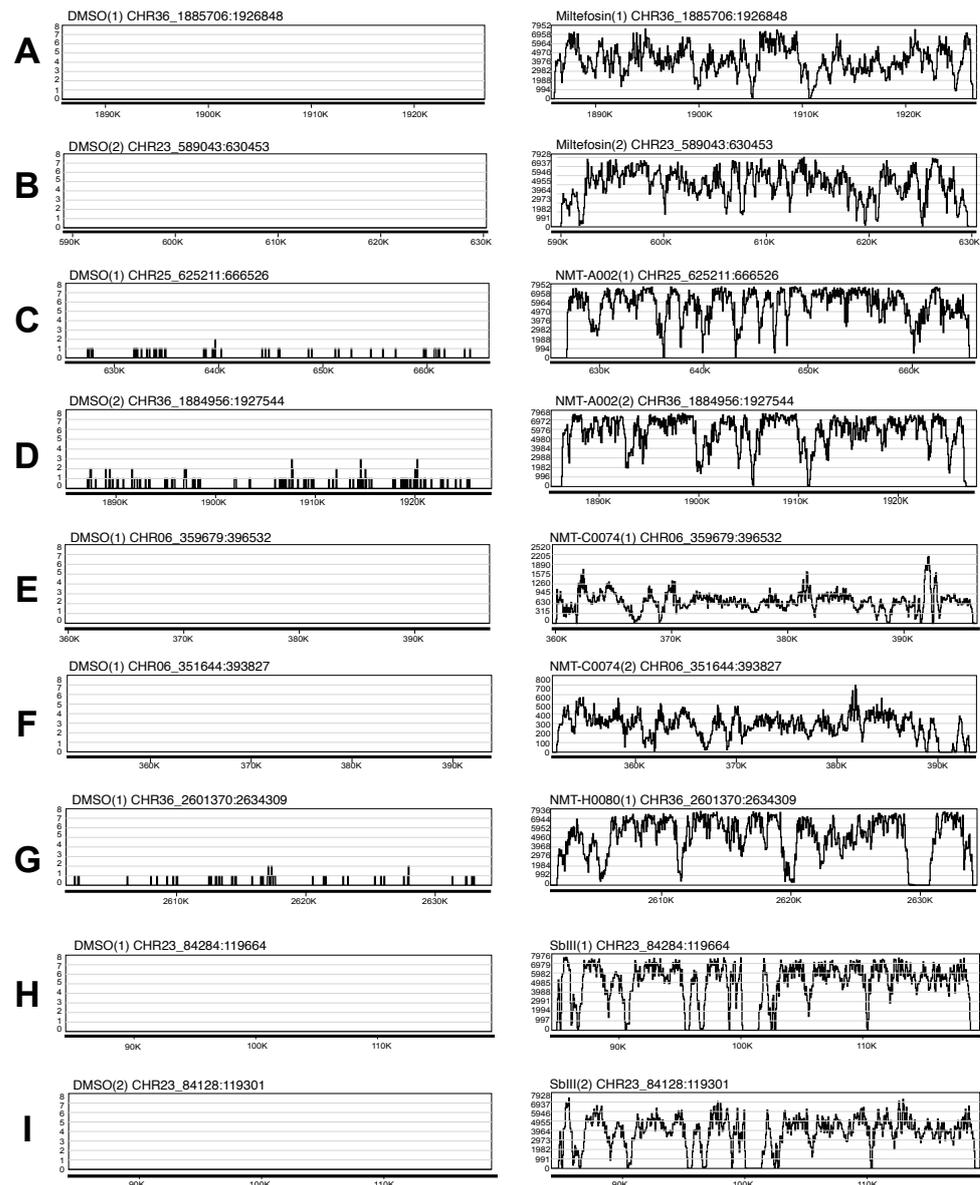
Für die Identifizierung von Resistenzgenen oder Zielstrukturen von chemischen Komponenten werden funktionelle Komplementationsanalysen durchgeführt (Clos und Choudhury, 2006). Die Kombination der Anreicherung von funktionellen Genloci auf bestimmten Cosmiden unter Selektionsdruck in *Leishmania* spp. und der darauffolgenden Sequenzierung der selektierten Genloci durch *Next-Generation-Sequencing* (Gazanion, et al., 2016, Tejera Nevado et al., 2016) erlaubt eine schnelle und sensitive Identifikation von Resistenz-relevanten Genloci. Diese Cosmid-Sequenzierungs-Methode (Cos-Seq) wurde für die folgenden Versuche angewandt.

Für die funktionelle Komplementation wurde die genomische DNA (gDNA) aus *L.donBPK190*, der resistent gegen Antimon<sup>v</sup> ist (Vanaerschot, et al., 2011), zur Herstellung einer Cosmid-Genbank isoliert. Die gDNA wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Fragmente nach Größe aufgereinigt. Die Fragmente wurden in den Expressionsvektor pcosTL (Kelly, et al., 1994) eingebracht. Diese entstandenen Cosmid-Genbank wurde dann in Phagenpartikel eingebracht, welche genutzt wurden um *E.coli* zu transfizieren. Nach der Vervielfältigung in *E.coli* wurden die Cosmide mittels alkalischer Lyse isoliert. Diese Cosmid-Genbank wurde dann in den *Leishmania* Akzeptor-Stamm *L.donBPK091*, der sensitiv gegenüber Antimon<sup>III</sup> ist, eingebracht. Die daraus resultierende Parasitenpopulation *L.donBPK091*[pcos190] wurde mit den Leitstrukturen unter Selektionsdruck gesetzt, sodass nur diejenigen Parasiten überleben, die Cosmide mit resistenzvermittelnden Genloci tragen.

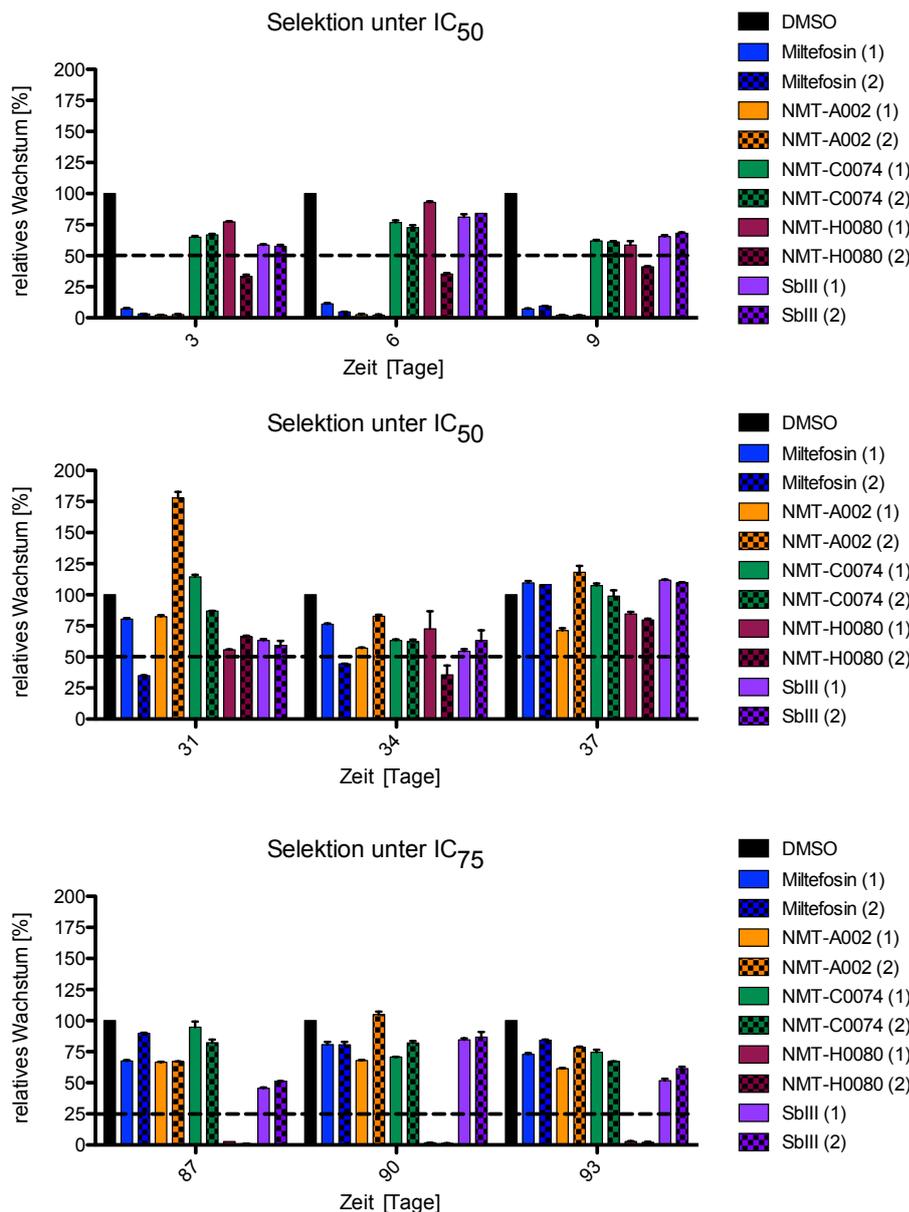
Die initiale Selektion erfolgte bei  $\text{IC}_{50}$  der Leitstrukturen (Abb.7 (A)). Nach erfolgreicher Selektion, gekennzeichnet durch ungehemmtes Wachstum der Parasiten unter  $\text{IC}_{50}$  der

Substanz (Abb.7**(B)**), wurde der Selektionsdruck auf  $IC_{75}$  erhöht (Abb.7 **(C)**). Jede Selektion wurde in je zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

Nach 37 Tagen der Parasitenselektion mit unterschiedlichen Substanzen unter  $IC_{50}$ , wurden alle getesteten Parasiten toleranter gegenüber der jeweiligen Selektionssubstanz und zeigten ein Wachstum ähnlich der DMSO-Kontrolle (Abb.7 **(B)**), sodass der Selektionsdruck der Substanz auf  $IC_{75}$  erhöht wurde. Nach 93 Tagen zeigten fast alle selektierten *Leishmanien* auch bei  $IC_{75}$  ein zur DMSO-Kontrolle vergleichbares Wachstum, ausser unter  $IC_{75}$  von NMT-H0080 (Abb.7 **(C)**). Dies heißt, dass im Genom von *Leishmania donovani* dominante Resistenzgene für Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 und Sb<sup>III</sup> vorliegen, die Resistenzen gegen NMT-H0080 jedoch nur begrenzt wirksam sind.



**Abb.8 Identifikation der selektierten Genloci.** Angereicherte Cosmide wurden aus den selektierten *L.don* BPK091[pcos190] isoliert, in *E.coli* Zellen vervielfacht und für die Herstellung von DNA-Bibliotheken verwendet, die auf dem MiSeq® Gerät (Illumina) sequenziert wurden. Die Sequenzen wurden mit dem *L.don*-Referenzgenom abgeglichen. In den Abbildungen **A** bis **I** ist jeweils die Position eines selektierten Genlocus auf dem zugehörigem Chromosom gegen die Häufigkeit der Sequenz-reads (y-Achse) aufgetragen. Dargestellt sind jeweils die Genloci, die auf Cosmiden mit der höchsten Abundanz in der zugehörigen Probe liegen. In der rechten Spalte sind die Chromosomen-Abschnitte eines jeweils selektierten Genlocus in der resistenten *Leishmanien*-Population gezeigt. Die linke Spalte der Abbildung zeigt die jeweils korrespondierende Chromosomen-Regionen nach der Sequenzierung der Cosmide aus der DMSO-selektierten Kontrolle.



**Abb.7 Selektion von resistenten *L. donovani* BPK091[pcos190] gegen die Leitstrukturen.** *L. donovani* BPK091[pcos190] wurden alle drei Tage mit einer Zellzahl von je  $1 \times 10^5$  Z/mL mit der jeweiligen IC<sub>50</sub> von Miltefosin, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 oder Antimon (Sb<sup>III</sup>) in Medium eingesät. Es wurde mit jeweils zwei biologischen Proben gearbeitet. Die Zellzahl wurde jeweils nach 72 h bestimmt und als relatives Wachstum in [%] bezogen auf die DMSO-Kontrolle dargestellt (A,B). Der Selektionsdruck wurde auf IC<sub>75</sub> erhöht und das Selektionsprozedere wiederholt bis die selektierten Parasiten ein der DMSO-Kontrolle ähnliches Wachstum zeigten (C). n=2

#### 4.2.2. Next Generation Sequencing

Nach erfolgreicher Selektion der Leishmanien mit der jeweiligen Substanz unter IC<sub>75</sub>, wurden die angereicherten Cosmide durch alkalische Lyse und Phenol-Chloroform-Extraktion, analog zur Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Bakterien (Sambrook, J.R., Russell, D. W 2001) aus den Parasiten isoliert. Da die Parasiten-Selektion mit NMT-H0080 unter IC<sub>75</sub> nicht möglich war, wurden Parasiten, die gegen die IC<sub>50</sub> von NMT-H0080 tolerant waren für die Cosmid-Isolierung verwendet.

Tabelle 14: Chromosomenabschnitte der selektierten Cosmide

Chromosom	DMSO_1	DMSO_2	Mil_1	Mil_2	NMT-A002_1	NMT-A002_2	NMT-C0074_1	NMT-C0074_2	NMT-H0080_1	SbIII_1	SbIII_2
1											161225: 199653
2											
3											
4											
5								203946: 240620			
6							360049: 396317	179729: 212675 352060: 390039			
7											
8											105748: 137876 140538: 172761
9											
10											
11											
12											
13								57761: 121240			
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20	129566: 164405	129577: 164405						40403: 81291			57175: 91191
21							487348: 521519	487366: 521512			
22								403113: 439257			
23				590031: 629587						85066: 118910	85066: 118910
24									361906: 396570		
25					626776: 665826						626776: 665818
26	226778: 263122	226791: 263122						360794: 393221			
27											
28	652947: 696031	652949: 696031									
29											
30								531365: 564557			
31	647918: 676648	647914: 676646					647915: 679877	647916: 710153			
32											
33											
34										58273: 93512	58281: 93520
35											
36			1886013: 1926484			1886013: 1926482		1886037: 1926283	2601853: 2633931		

Um Fragmente genomischer *Leishmania*-DNA auszuschließen, wurden elektrokompetente *E.coli* XL1-Blue Zellen mit den aus den Parasiten isolierten Cosmiden transformiert. Die aus *E.coli* reisolierten Cosmide wurden für die Herstellung einer DNA-Bibliothek zur Sequenzierung auf dem MiSeq® Sequenziergerät von Illumina verwendet, wobei die biologischen Replikate als unabhängige Proben behandelt wurden.

Unter Selektion mit den Leitstrukturen wurden spezifische Cosmide bevorzugt, die in der DMSO-Kontrolle nicht vorlagen (Abb.8).

Bei der Selektion mit Miltefosin unter IC<sub>75</sub> wurde in dem jeweiligen biologischen Replikat jeweils ein Locus auf unterschiedlichen Chromosomen (CHR) selektiert; Chromosom 36 in Probe 1 (Abb.8 A) oder Chromosom 23 in Probe 2 (Abb.8 B). Auch bei der Selektion mit NMT-A002 unter IC<sub>75</sub> wurde in der Probe 2 (Abb.8 D) ein Locus auf dem CHR36 selektiert, wobei die Sequenzen den gleichen Chromosomenabschnitt abdecken wie in der Probe 1 nach der Selektion mit Miltefosine. Bei der Probe Nr.1 war dagegen ein Bereich auf CHR25 (Abb.8 C) am häufigsten durch Sequenzen abgedeckt. Durch die Selektion mit NMT-C0074 unter IC<sub>75</sub> wurden in beiden biologischen Proben Cosmide angereichert, die einen Bereich von Chromosom 6 (Abb.8 E+F) abdecken. Die Selektion mit NMT-H0080 führte zur Anreicherung eines Cosmids, der einen Bereich von Chromosom 36 abdeckt (Abb.8 G). Dieser Locus überlappt nicht mit den Genloci, die unter der Selektion mit Miltefosine (Abb.8 A) oder NMT-A0002 (Abb.8 D) gefunden wurden. Bei der Selektion mit Antimon (Sb<sup>III</sup>) unter IC<sub>75</sub> wurde in beiden biologischen Proben zwei Cosmide angereichert, deren Sequenzen Bereiche auf den Chromosomen 23 und 34 (Abb.8 H+I) abdeckt.

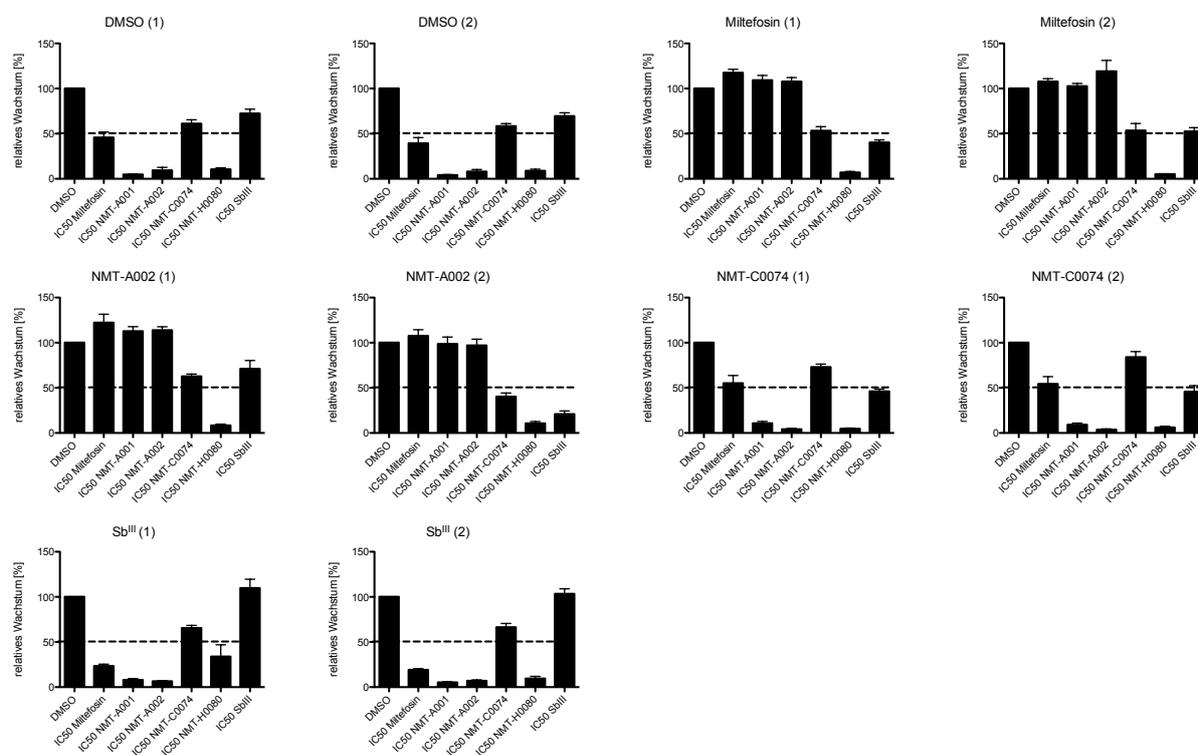
In Tabelle 14 sind alle Chromosomenabschnitte aufgelistet, die durch die Sequenzen der angereicherten Cosmide aus der jeweiligen Probe abgedeckt wurden. Die rot unterlegten Felder zeigen die Cosmide mit der höchsten Abundanz an. Mit abnehmender Abundanz wurden die Felder jeweils orange, grün oder blau gekennzeichnet. Die unter dem Lösungsmittel selektierten Leishmanien (DMSO-Kontrolle) zeigen selektierte Loci in den Bereichen der Chromosomen 20, 26, 28 und 31. Diese Loci sind vermutlich für eine höhere Fitness und generelle Wachstumsvorteile bei der *in vitro*-Kultivierung der Leishmanien verantwortlich. Die Selektion mit Miltefosin oder NMT-A002 ist sehr stringent, da nur jeweils ein Cosmid angereichert wurde in den unterschiedlichen Parasitenkulturen. Dagegen werden bei der Selektion mit NMT-C0074 oder Antimon (Sb<sup>III</sup>) mehrere Cosmide angereichert, die unterschiedliche Chromosomenabschnitte abdecken. Eines der hoch-abundanten Cosmide wurde sowohl in den NMT-C0074 selektierten Parasiten gefunden als auch in der DMSO-Kontrolle. Der Locus auf Chromosom 31 kann daher als NMT-C0074-Resistenzlocus ausgeschlossen werden. Das Cosmid mit der zweit-höchsten

Abundanz deckte jedoch einen für die Selektion mit einem für NMT-C0074 spezifischen Bereich auf Chromosom 6 ab (Abb.8 (E+F)).

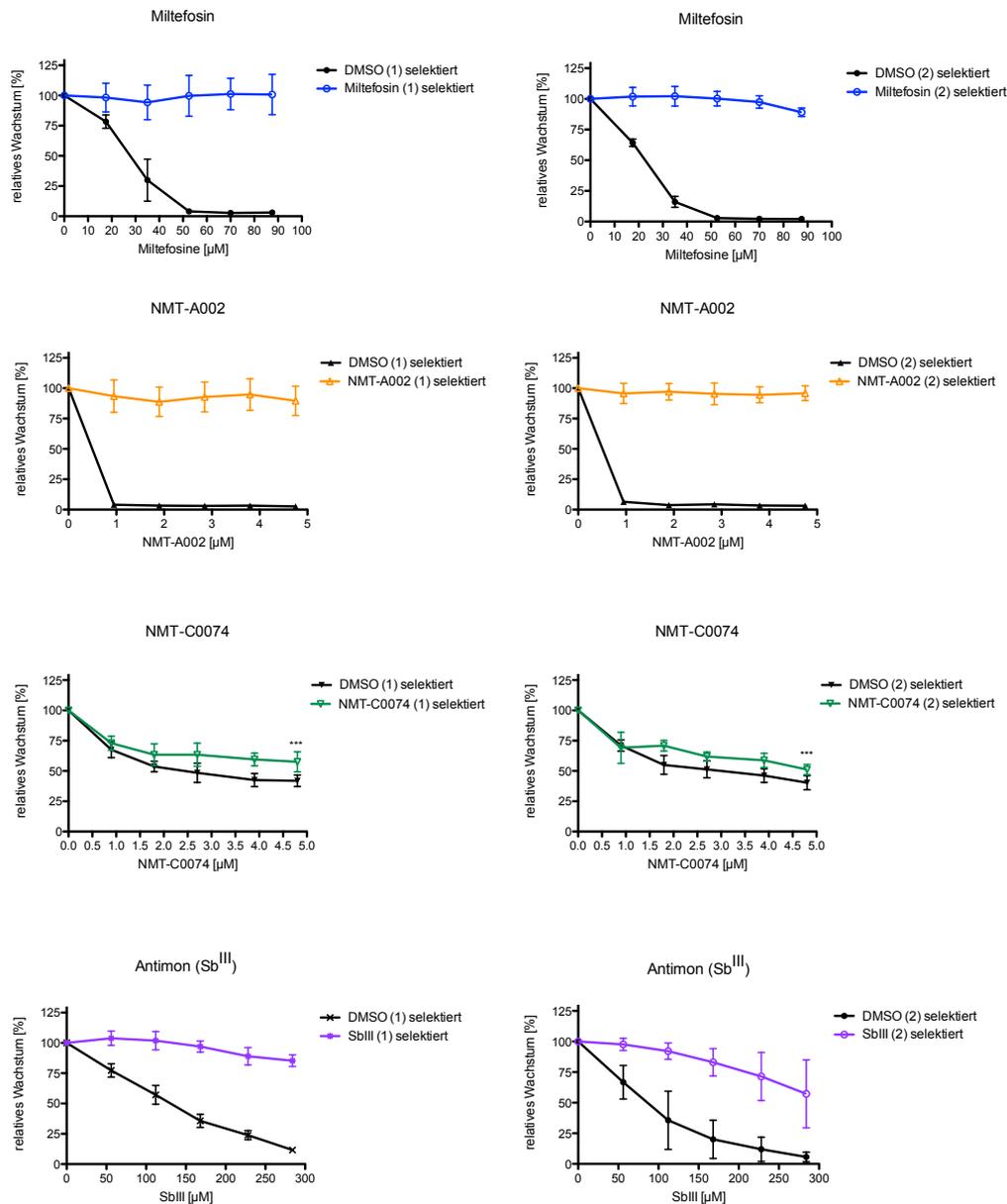
### 4.2.3. *In vitro* Resistenzbestimmung

Zur Bestätigung des Resistenz-Phänotyps der selektierten Leishmanien wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dafür wurden jeweils die unter den Leitstrukturen oder DMSO selektierten-Parasiten mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Leitstruktur eingesät. Die getesteten Konzentrationen entsprachen den  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$ ,  $IC_{100}$  bis  $IC_{125}$ , der jeweiligen Leitstrukturen. Das Parasitenwachstum wurde nach 72 h bestimmt. Dargestellt ist das Wachstum [%] der selektierten Parasiten in Relation zum Wachstum der DMSO-Kontrolle (0  $\mu$ M der Leitstruktur) (Abb.9).

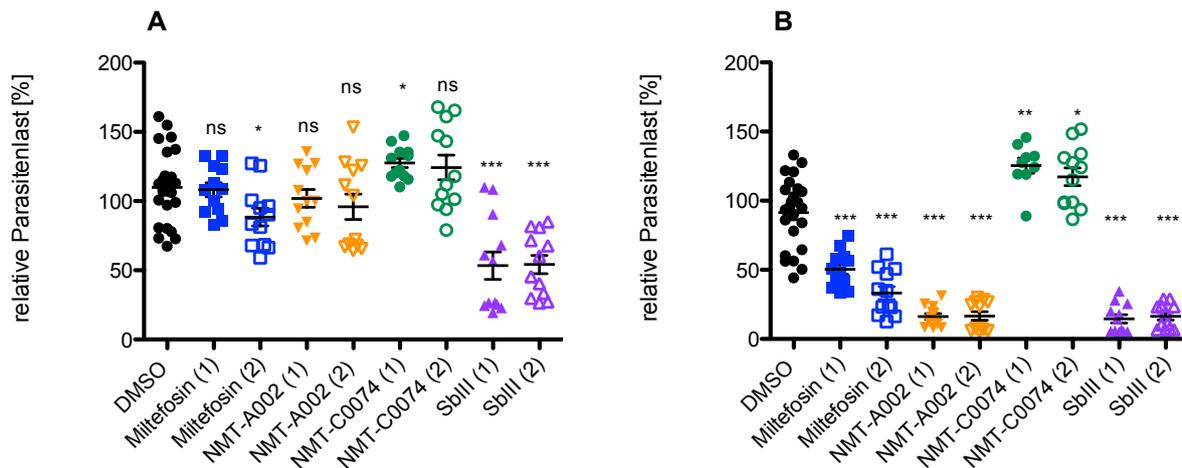
Das Wachstums der DMSO-selektierten Leishmanien wird in Abhängigkeit der Leitstrukturkonzentration gehemmt. Bei den gegen NMT-A001 und -A002 resistenten Leishmanien ist mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Leitstruktur keine Wachstumshemmung zu beobachten. Auch nach der Selektion mit  $Sb^{III}$ , sind die Parasiten tolerant gegen diese Substanz. Nur bei der zweiten biologischen Probe ist eine leichte Wachstumshemmung bei hoher Substanzkonzentration festzustellen. Die Differenz zwischen der Proliferation der NMT-C0074 resistenten und den DMSO-selektierten Leishmanien ist numerisch nicht so groß im Vergleich zu der Differenz bei den anderen resistenten Leishmanien. Dennoch ist die Differenz bei der höchsten NMT-C0074 Konzentration ( $IC_{125}$ ) hoch signifikant für beide biologische Proben.



**Abb.10 Bestimmung des Kreuzresistenz-risikos gegen verschiedene Leitstrukturen durch die Selektion bestimmter Geneloci in *L. don* BPK091[pcos190].** Resistente Promastigoten wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Z/mL mit der jeweiligen IC<sub>50</sub> von Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 und Sb<sup>III</sup> behandelt. Nach 72 h wurde die Zellzahl bestimmt und das relative Wachstum [%] bezogen auf das Wachstum der DMSO-Kontrolle berechnet. Die Überschrift der Diagramme zeigt an, welche resistenten Promastigoten getestet wurden. Die Diagramme der ersten und dritten Spalte stellen jeweils die Ergebnisse für das Wachstum der biologischen Probe 1 dar, die Diagramme der zweiten und vierten Spalte zeigen jeweils die Ergebnisse für die biologische Probe 2. Die gestrichelte Linie verdeutlicht das erwartete Parasitenwachstum unter IC<sub>50</sub>. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.



**Abb.9 Dosis-Wirkungskurven für die selektierten und nicht selektierten *L.don* BPK091[pcos190].** Je  $1 \times 10^5$  Z/mL der promastigoten Leishmanien aus den resistenten oder DMSO-selektierten Kulturen wurden unter  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$ ,  $IC_{100}$  und  $IC_{125}$  kultiviert. Nach 72 h wurden die Parasiten mit Hilfe des Casy® Zählsystems gezählt und die Parasitenproliferation in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (0 µM der Leitstruktur) in [%] dargestellt. Die Diagramme der linken Spalte stellen die Ergebnisse für die Biologische Probe 1 dar, die Diagramme der rechten Spalte zeigen die Ergebnisse für die biologische Probe 2.  $n=4$ , Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. \*\*\*=  $p \leq 0,001$  (*U*-Test).



**Abb.11 *In vitro* Infektion von murinen Makrophagen mit resistenten *L.don* BPK091[pcos190].** Murine Makrophagen wurden mit einer MOI von 1:20 mit resistenten *L.don* BPK091[pcos190] infiziert. Extrazelluläre Parasiten wurden nach 4h mit durch das Waschen der infizierten Zellen mit PBS entfernt. Je nach 4,5 h (A) und nach 48 h (B) wurde die gDNA aus den infizierten Makrophagen isoliert und die Parasitenlast mittels einer auf TaqMan® Sonden basierter *real-time* PCR in einem *multiplex* Ansatz quantifiziert. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der Mittelwert für die DMSO-Kontrolle wurde als 100%ige Parasitenlast bestimmt. In Relation dazu wurden die relativen Parasitenlasten der anderen Proben berechnet. n = 4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$  (U-Test).

#### 4.2.4. Test zur Bestimmung möglicher Kreuzresistenzen

Ob die Cosmide, die unter dem Selektionsdruck der jeweiligen Leitstruktur angereichert wurden, Genloci tragen, welche die Parasiten auch gegen die anderen Leitstrukturen tolerant machen und somit Kreuzresistenz vermitteln, wurde mit dem folgenden Experiment überprüft. Dafür wurden die resistenten Promastigoten mit der  $IC_{50}$  der jeweiligen Leitstrukturen Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 oder Antimon ( $Sb^{III}$ ) kultiviert. Antimon wurde in diesem Experiment getestet, da Antimon-Resistenz in *L. donovani* weit verbreitet ist. Die Zellkonzentration wurde nach 72 h bestimmt und das Wachstum bezogen auf die DMSO-Kontrolle in [%] dargestellt.

Bei der Kontrolle (DMSO-selektierte Promastigote) wurde eine Sensitivität gegen alle getesteten Leitstrukturen beobachtet (Abb.10). Die resistenten Promastigoten zeigen in Anwesenheit der Leitstruktur, unter der sie zuvor selektiert wurden, gleiches Wachstum wie die DMSO-Kontrolle. Für die Promastigoten, die eine Resistenz gegen Miltefosin aufweisen, ist nach der Behandlung mit den Miltefosin-Derivaten NMT-A001 und NMT-A002 ebenfalls ein ungehemmtes Wachstum zu beobachten. Auch die gegen die

Miltefosin-Derivate resistenten Promastigote konnten unter Miltefosin oder dem jeweils anderen Miltefosin-Derivat ungehemmt wachsen. Die Resistenz gegen Miltefosin oder eines der Miltefosin-Derivate vermittelt also eine Kreuzresistenz für jede dieser Substanzen. Die Selektion mit NMT-C0074, NMT-H0080 oder Antimon führte zu keiner Kreuzresistenz gegen Miltefosin, die Miltefosin-Derivate oder die jeweils anderen getesteten Leitstrukturen.

Die resistenten Promastigoten hatten keinen generellen Wachstumsvorteil bei der Behandlung mit den anderen Leitstrukturen, da die Behandlung der Parasiten mit den Leitstrukturen aus den anderen Wirkstoffklassen weiterhin zur Hemmung der Parasitenproliferation führte.

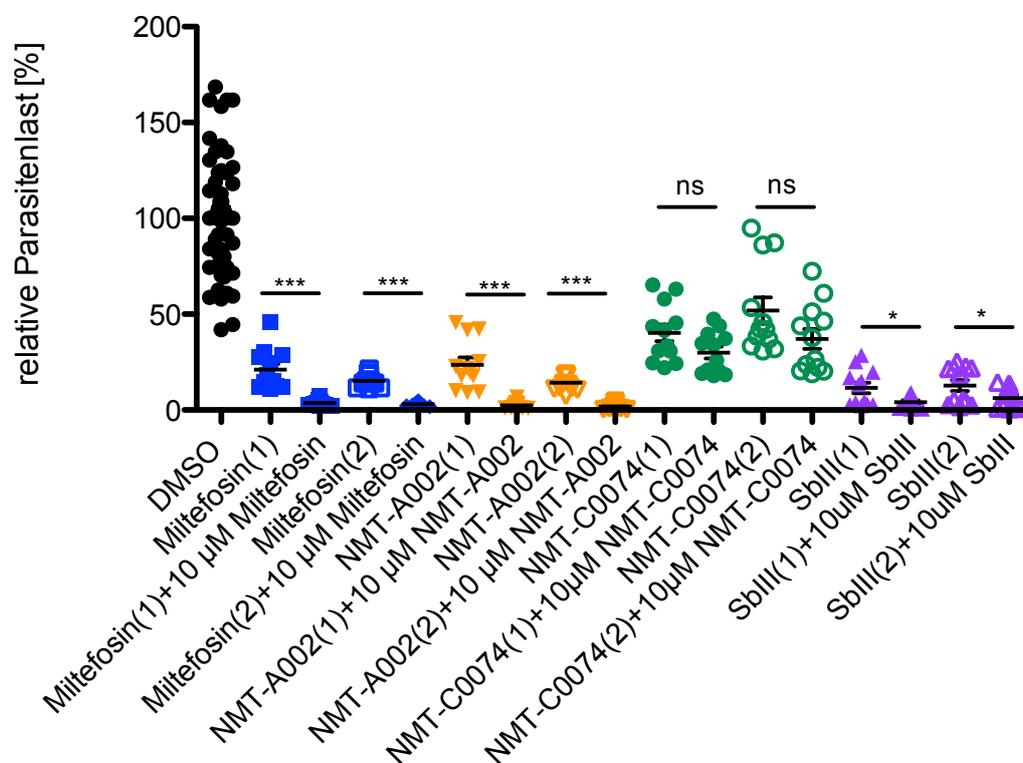
#### **4.2.5. *In vitro* Infektiösität der resistenten Leishmanien**

Da bei Leishmanien die Amastigote das pathogene Stadium ist, war es wichtig zu testen, ob die in den Promastigoten erzeugte Resistenz Auswirkungen auf die intrazellulären Amastigoten hat. Um die Auswirkungen der Resistenz der Promastigoten auf die *in vitro* Infektiösität zu testen wurden murine, primäre Knochenmarksmakrophagen mit den Parasiten infiziert. Aus den infizierten Makrophagen wurde jeweils nach 4,5 h und 48 h die genomische DNA (gDNA) isoliert und für die Quantifizierung der relativen Parasitenlast mittels einer auf TaqMan® Sonden basierten *real-time* PCR (Bifeld et al., 2016) eingesetzt. Um Aussagen über die initiale Parasitenlast geben zu können wurde die gDNA nach 4,5 h isoliert. Nach 48 h wurde die Parasitenlast ebenfalls bestimmt um Aussagen über die Proliferation bzw. das Überleben der Leishmanien innerhalb der Makrophagen machen zu können.

Abb.11(A) zeigte deutlich, dass die initiale Parasitenlast nach 4,5 h für die Antimon resistenten Leishmanien signifikant reduziert ist. Für die Miltefosin resistenten Parasiten wurde eine leicht verringerte Parasitenlast beobachtet. Für NMT-A002 resistente Parasiten wurde kein Unterschied in der initialen Parasitenlast festgestellt. Bei den NMT-C0074 resistente Parasiten ist ein leichter Anstieg der Parasitenlast zu sehen.

Auch 48 h nach der Infektion mit den gegen NMT-C0074 resistenten Leishmanien bleibt die Parasitenlast unverändert, während sie sich bei allen anderen Infektionen deutlich verringert. Die resistenten Leishmanien waren nicht fähig, in den Makrophagen zu überleben. Die Parasitenlast der NMT-C0074 selektierten Parasiten war in Makrophagen signifikant erhöht im Vergleich zu den Parasiten aus der DMSO-Kontrolle. Dies zeigt, dass NMT-C0074 resistente Parasiten besser in den Makrophagen überleben und/oder proliferieren können als die Parasiten mit den Resistenzen gegen andere Wirkstoffklassen. Die Genloci auf den Cosmiden, die unter dem Selektionsdruck von NMT-C0074 selektiert wurden, vermitteln nicht nur eine Resistenz gegen NMT-C0074 in der Promastigote, sondern verbessern auch das Überleben der intrazellulären Amastigoten.

Interessant war, ob die Resistenz der Promastigoten gegen die Leitstrukturen auch in den Amastigoten erhalten bleibt. Um das zu untersuchen, wurden ebenfalls *in vitro* Infektionsexperimente durchgeführt. Die infizierten Makrophagen wurden in diesem Experiment entweder mit der jeweiligen Selektionssubstanz behandelt oder unbehandelt gelassen (Abb.12).



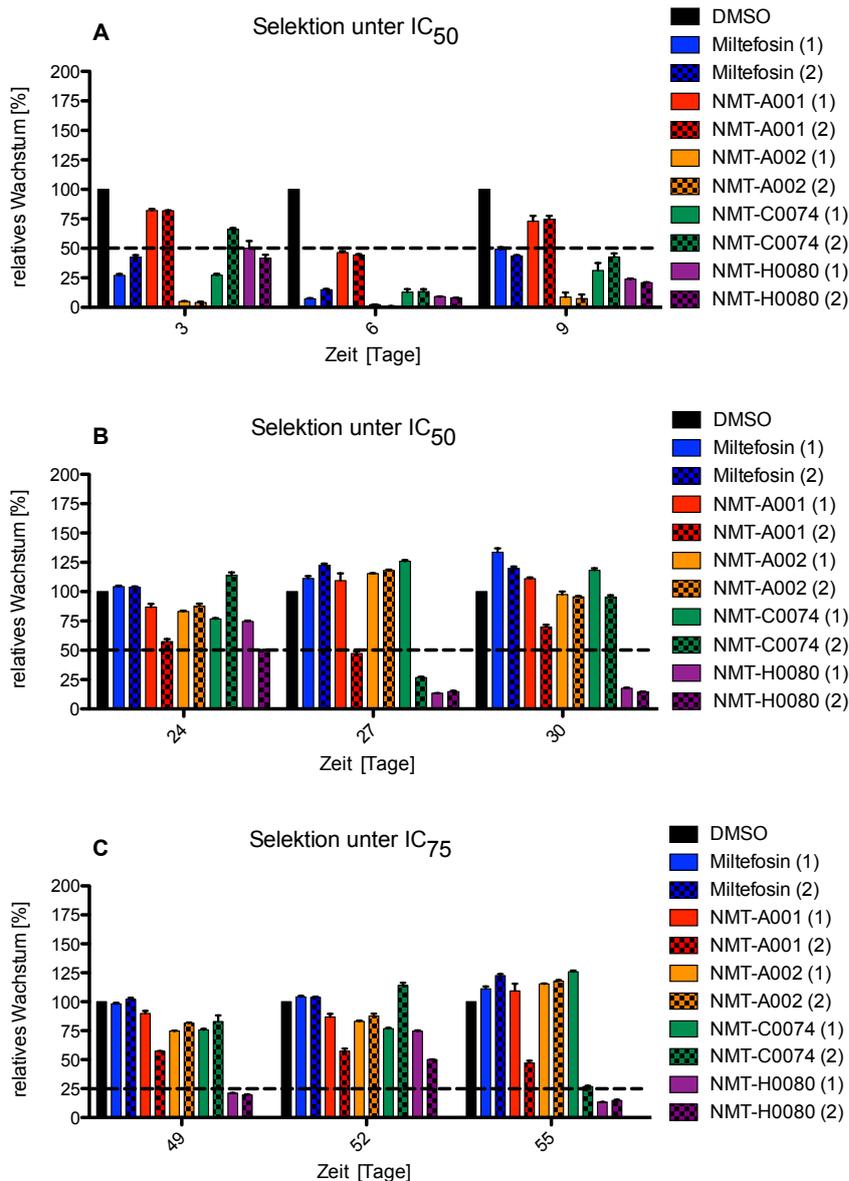
**Abb.12 Wirkung der Leitstrukturen auf intrazelluläre resistente *L.don* BPK091[pcos190].** Murine Knochenmarksmakrophagen wurden im Verhältnis 1:20 mit den jeweils gegen eine der Leitstrukturen resistenten *L.don*BPK091[pcos190] infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Makrophagen jeweils mit 10 µM der entsprechenden Selektionssubstanz behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 48 h wurde aus den infizierten und behandelten sowie unbehandelten Makrophagen die gDNA isoliert und die Parasitenlast mittels einer auf TaqMan® Sonden basierter *real-time* PCR in einem *multiplex* Ansatz quantifiziert. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der Mittelwert für die DMSO-Kontrolle wurde als 100%ige Parasitenlast bestimmt. In Relation dazu wurden die relativen Parasitenlasten der anderen Proben berechnet. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, \*=p< 0,05, \*\*\*= p≤0,001 (U-Test).

Bei der Behandlung der Miltefosin-resistenten, NMT-A002-resistenten und Antimon-resistenten Parasiten mit der jeweiligen Leitstruktur wird die Parasitenlast signifikant reduziert. Für die NMT-C0074 resistenten Parasiten ist keine signifikante Reduktion der Parasitenlast zu beobachten. Die in den Promastigoten erzeugte Resistenz wird also zumeist nicht auf die intrazellulären Amastigoten übertragen. Die unter Selektionsdruck angereicherten Cosmide wirken daher primär im promastigoten Stadium und dürften somit für die Behandlung Erkrankter keine Rolle spielen.

### 4.3 Spontane Resistenzen

#### 4.3.1. Selektion von spontan resistenten *Leishmania* Promastigoten

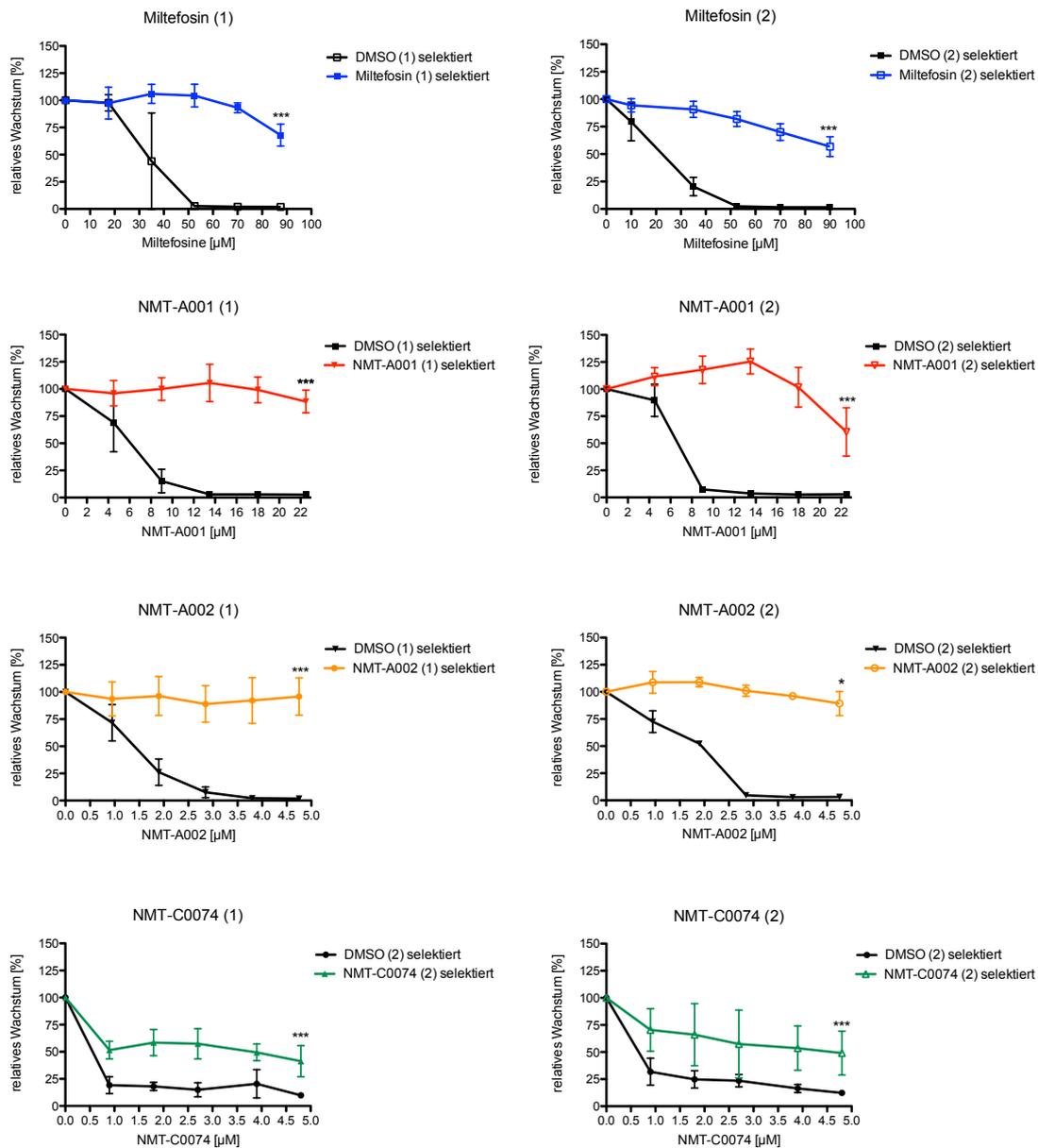
Für die Selektion von spontanen Resistenzen gegen die Leitstrukturen wurden *L.don* 1SR Promastigote mit dem jeweiligen  $IC_{50}$  von Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074 und NMT-H0080 kultiviert. Es wurde für jede Leitstruktur mit zwei biologischen Proben gearbeitet (1) und (2). Nach 30 Tagen wurde für fast alle Kulturen ein Wachstum vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle beobachtet (Abb.13 (B)). Nach 55 Tagen war auch bei einer Selektion mit  $IC_{75}$  für alle Kulturen ein ungehemmtes Wachstum zu beobachten (Abb.13 (C)). Lediglich gegen NMT-H0080 konnten keine resistenten Promastigoten selektiert werden. Zwar war an einigen Tagen Wachstum für die NMT-H0080 selektierten Parasiten zu beobachten, jedoch blieb dies nicht nach dem nächsten Verdünnungsschritt bestehen.



**Abb.13 Selektion von spontan resistenten *L.don* 1SR gegen die Leitstrukturen.**  $1 \times 10^5$  Z/mL wurden in M199+ mit dem jeweiligen IC<sub>50</sub> von Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 eingesetzt. Es gibt jeweils zwei biologische Proben (1) und (2). Die Zellzahl aller Proben wurde jeweils nach 72 h gemessen und ist hier als relatives Wachstum (bezogen auf die DMSO Kontrolle in [%]) dargestellt. Die Leishmanien wurden in frischem Medium mit IC<sub>50</sub> der jeweiligen Leitstruktur wieder auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$ /mL verdünnt und für weitere 72 h kultiviert (**A**). Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die mit den Leitstrukturen selektierten Parasiten das gleiche/oder stärkeres Wachstum zeigen, verglichen mit der DMSO Kontrolle (**B**). Nach Selektion von resistenten Parasiten gegen die jeweilige Leitstruktur wurde der Selektionsdruck auf IC<sub>75</sub> erhöht. Der Vorgang wurde wiederholt bis auch hier resistente Leishmanien-Populationen selektiert wurden (**C**).

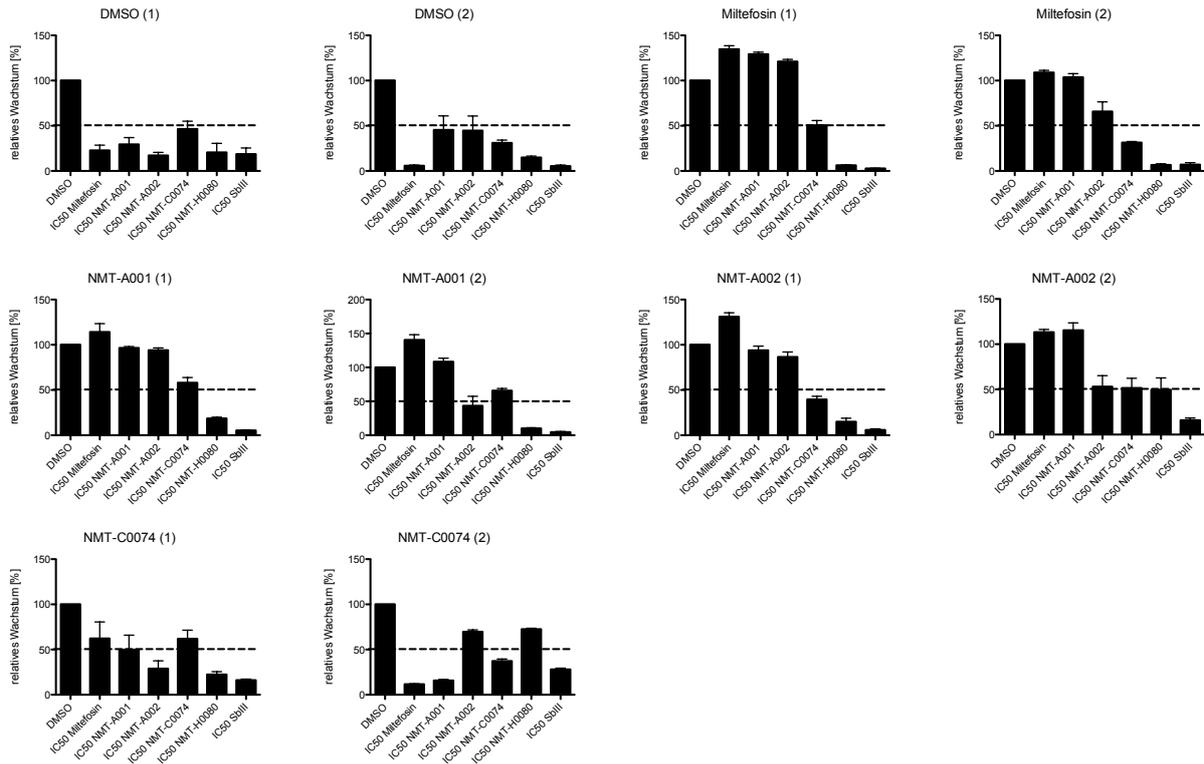
### 4.3.2. *In vitro* Resistenzbestimmung

Zur Bestätigung des resistenten Phänotyps der selektierten Promastigoten wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dazu wurden selektierte und nicht-selektierte Promastigote mit IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>, IC<sub>100</sub> und IC<sub>125</sub> der Leitstruktur für 72 h behandelt. Das Wachstum [%] wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt (Abb.14).



**Abb.14 Dosis-Wirkungskurven für die selektierten und nicht selektierten *L. don* 1SR.** Je  $1 \times 10^5$ /mL der promastigoten Leishmanien aus den resistenten oder DMSO-selektierten Kulturen wurden unter IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub>, IC<sub>100</sub> und IC<sub>125</sub> kultiviert. Nach 72 h wurden die Parasiten mit Hilfe des Casy® Zählsystems gezählt und die Parasitenproliferation in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (0 µM der Leitstruktur) in [%] dargestellt. Die Diagramme der linken Spalte stellen die Ergebnisse für die Biologische Probe 1 dar, die Diagramme der rechten Spalte zeigen die Ergebnisse für die biologische Probe 2. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. \* = p < 0,05, \*\*\* = p ≤ 0,001 (U-Test).

Für die resistenten Leishmanien war keine Dosis-abhängige Wachstumsinhibierung zu beobachten. Hingegen war bei den DMSO-selektierten Parasiten mit ansteigender Konzentration eine deutliche Hemmung des Wachstums zu erkennen. Bei IC<sub>100</sub> der jeweiligen Leitstruktur war für die DMSO-selektierten Promastigoten kein Wachstum mehr



**Abb.15 Test der Kreuzresistenzen der resistenten *L. don* 1SR gegen alle Leitstrukturen.**  $1 \times 10^5$ /mL resistente Promastigote wurden mit der jeweiligen IC<sub>50</sub> von Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 und Antimon (Sb<sup>III</sup>) für 72 h behandelt. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Wachstum [%] bezogen auf die DMSO-Kontrolle berechnet. Die Überschrift der Diagramme zeigt an, welche resistenten Promastigoten getestet wurden. Die Diagramme der ersten und dritten Spalte stellen die Ergebnisse für die biologische Probe 1 dar, die Diagramme der zweiten und vierten Spalte zeigen die Ergebnisse für die biologische Probe 2. Auf der X-Achse sind die getesteten Substanzen genannt. Die gestrichelte Linie verdeutlicht das erwartete Parasitenwachstum unter IC<sub>50</sub>. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n=4,

zu beobachten. Bei dem Vergleich von DMSO-selektierten und NMT-C0074 selektierten

Promastigoten war die numerische Differenz nicht so deutlich, wie bei den anderen Proben. Jedoch war der Unterschied zwischen den DMSO-selektierten und NMT-C0074-selektierten Promastigoten in beiden biologischen Proben bei einer Behandlung mit IC<sub>125</sub> von NMT-C0074 hoch signifikant (Abb.14).

### 4.3.3. Test zur Bestimmung möglicher Kreuzresistenzen

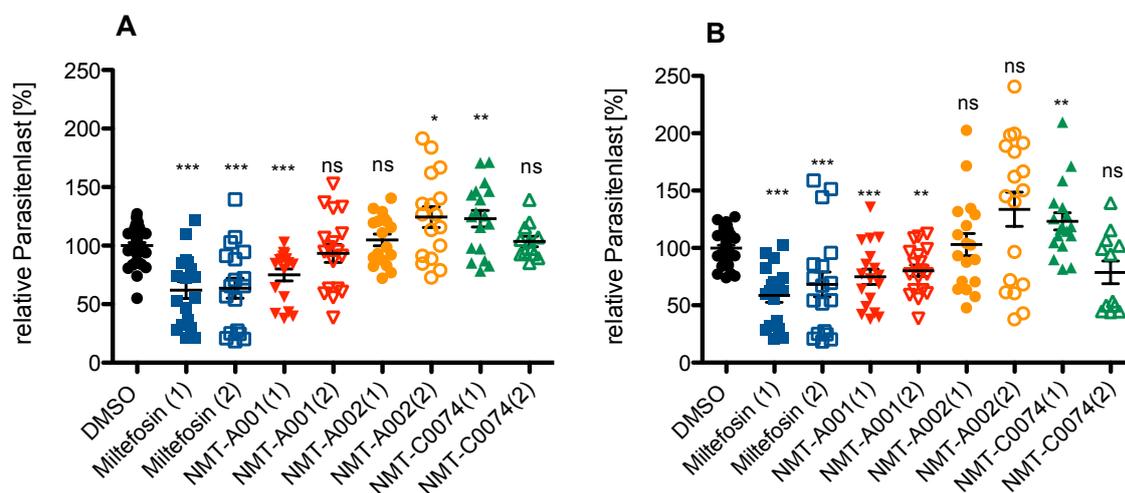
Um zu testen, ob eine spontane Resistenz gegen eine der Leitstrukturen auch Resistenzen gegen andere Substanzen verleiht, wurde eine Kreuzresistenzbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die spontan resistenten Leishmanien mit IC<sub>50</sub> von Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074, NMT-H0080 und Antimon (Sb<sup>III</sup>) inkubiert. Antimon wurde hier getestet, da Antimon-Resistenz in *L. donovani* weit verbreitet ist. Nach 72 h wurde die Zellkonzentration ermittelt und als relatives Wachstum, bezogen auf die DMSO-Kontrolle [%], dargestellt (Abb.15).

Bei der Kontrolle (DMSO-selektierte Promastigote) wurde eine Sensitivität gegen alle getesteten Leitstrukturen beobachtet (Abb.15). Bei den Miltefosin-resistenten Promastigoten zeigte sich auch eine Resistenz gegen die Miltefosin-Derivate und umgekehrt. Die NMT-C0074-resistenten Promastigoten zeigten keine Kreuzresistenzen. Jedoch war für die NMT-C0074-resistenten in diesem Experiment nur ein schwaches Wachstum unter NMT-C0074 zu sehen, was in Kontrast mit dem vorangegangenen Experiment zur Bestätigung des resistenten Phänotyps steht.

Die Selektion mit den Leitstrukturen führt nicht zu einer generellen Resistenz gegen andere Wirkstoffe.

#### 4.3.4. *In vitro* Infektiosität der spontan resistenten Leishmanien

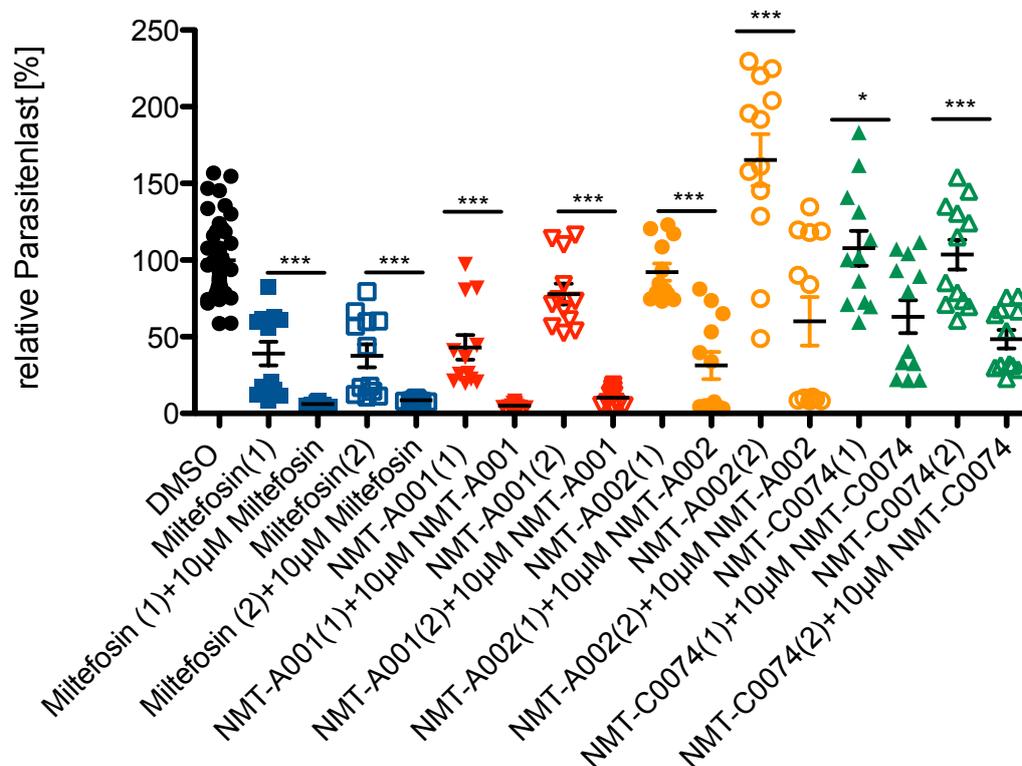
Ob die spontane Resistenz der Promastigoten auch einen Einfluss auf die Infektiosität der Parasiten hat, wurde bei der Infektion von primären, murinen Makrophagen geprüft. Dafür wurden die Makrophagen mit den Promastigoten infiziert und die initiale Parasitenlast nach 4,5 h bestimmt. Nach 48 h wurde die Parasitenlast ebenfalls bestimmt um Aussagen über die Proliferation bzw. das Überleben der Leishmanien innerhalb der Makrophagen machen zu können. Die Quantifizierung der relativen Parasitenlast erfolgte durch eine auf TaqMan® Sonden basierten *real-time* PCR (Bifeld et al., 2016).



**Abb.16 *In vitro* Infektion von murinen Makrophagen mit resistenten *L. don* 1SR** Murine Makrophagen wurden mit einer MOI von 1:20 mit spontan resistenten *L. don* 1SR infiziert. Extrazelluläre Parasiten wurden nach 4h durch das Waschen der infizierten Zellen mit PBS entfernt. Jeweils nach 4,5 h (A) und nach 48 h (B) wurde die gDNA aus den infizierten Makrophagen isoliert und die Parasitenlast mittels einer auf TaqMan® Sonden basierter *real-time* PCR in einem *multiplex* Ansatz quantifiziert. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Der Mittelwert für die DMSO-Kontrolle wurde als 100%ige Parasitenlast bestimmt. In Relation dazu wurden die relativen Parasitenlasten der anderen Proben berechnet. n = 4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, \* = p < 0,05 \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001 (*U*-Test).

Die initiale Parasitenlast (4,5 h) war für die Miltefosin- (1+2) und NMT-A001- (1) resistenten Leishmanien signifikant (\*\*\* = p < 0,001 (*U*-Test)) verringert. Für die NMT-A001- (2), NMT-A002- (1) und NMT-C0074- (2) resistenten Parasiten waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Bei den NMT-A002- (2) und NMT-C0074-resistenten Leishmanien war eine erhöhte Parasitenlast zu messen (Abb.16 (A)).

Nach 48 h war die Parasitenlast für die Miltefosin- und NMT-A001-resistenten Leishmanien signifikant reduziert. Für die NMT-A002- und NMT-C0074-resistenten Leishmanien war eine erhöhte Parasitenlast zu beobachten, wobei nur die Werte für NMT-C0074 (1) signifikant erhöht waren (Abb.16 (B)).



**Abb.17 Wirkung der Leitstrukturen auf intrazelluläre resistente *L.don* 1SR.** Murine Knochenmarksmakrophagen wurden im Verhältnis 1:20 mit den jeweils gegen eine der Leitstrukturen resistenten *L.don* 1SR infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Makrophagen jeweils mit 10 µM der entsprechenden Selektionssubstanz behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 48 h wurde aus den infizierten und behandelten sowie unbehandelten Makrophagen die gDNA isoliert und die Parasitenlast mittels einer auf TaqMan® Sonden basierter *real-time* PCR in einem *multiplex* Ansatz quantifiziert. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Der Mittelwert für die DMSO-Kontrolle wurde als 100%ige Parasitenlast bestimmt. In Relation dazu wurden die relativen Parasitenlasten der anderen Proben berechnet. n=4, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, \*= $p < 0,05$ , \*\*\*= $p \leq 0,001$  (U-Test).

Durch Behandlung mit 10 µM Miltefosin, NMT-A001, NMT-A002 und NMT-C0074 konnte die relative Parasitenlast der vorselektierten Populationen signifikant reduziert werden (Abb.17). Die *in vitro* erzeugte Resistenz der Promastigoten ist also in den Makrophagen nicht mehr zu beobachten.

#### 4.3.5. Next Generation Sequencing

Genmutationen wie Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen (*single nucleotide polymorphism* (SNP)) können verschiedene Auswirkungen auf den jeweiligen Organismus haben. Mutationen können die Funktion des betroffenen Gens zerstören. Resistenzen können genetische Modifikationen zu Grunde liegen. Bei der Selektion mit chemischen Komponenten können Mutationen für Leishmanien jedoch ein Selektionsvorteil bedeuten. Eine wichtige Funktion bei Miltefosin-resistenten Leishmanien kommt dabei dem Miltefosin-Transporter (LinJ13.1590) zu. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene SNPs im Miltefosin-Transportergen (LdMT) zum Funktionsverlust und somit zur *in vitro* Resistenz gegen Miltefosin führen (Pérez-Victoria et al., 2003).

Um zu prüfen, ob und welche genetischen Veränderungen in den spontan resistenten Promastigoten auftreten, wurde die gDNA der Parasiten isoliert und für ein *Next Generation Sequencing* (NGS) verwendet. Dafür wurde aus der gDNA der spontan resistente Leishmanien isoliert und eine DNA *library* hergestellt, wofür die gDNA fragmentiert und mit Adapter-Sequenzen versehen wurden. Der *Next Generation Sequencing* Lauf erfolgte mit dem MiSeq System von Illumina. Die Sequenzdaten (*reads*) wurden mit dem Referenzgenom von *L. don* BPK (TriTrypDB) verglichen.

Bei der Sequenzanalyse wurde geprüft, ob die Miltefosin- oder Miltefosin-Derivat-resistenten *L. don* Änderungen in der Sequenz des LdMT zeigten. Für die spontan NMT-C0074-resistenten Parasiten wurde geprüft, ob es Sequenz-Abweichungen in den Pteridin- oder Folat-Transportern gab.

In Abb.18 sind die Abweichungen in der Aminosäuresequenz des Miltefosin-Transportergens im Vergleich zu Referenz-Aminosäuresequenz aufgelistet.

LdMT=LinJ.13.1590	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT DMSO {1}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT DMSO {2}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT Miltefosin {1}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAH	GALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	900
LdMT Miltefosin {2}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAH	GALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	900
LdMT_NMT-A001_{1}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMTNMT-A001_{2}	170	.....	.....	.....	.....	.....	.....	169
LdMT_NMT-A002_{1}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT_NMT-A002_{2}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT_NMT-C0074_{1}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT_NMT-C0074_{2}	811	SMIREGRVGVGIIGLEGAHAALAADYAI	PRFKHLRRLCAVHG	GRYSLFRNASCILV	SFHKNITVSVVQFI	FAFYVGFSG	GLTDFDGWMLTF	900
LdMT=LinJ.13.1590	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT DMSO {1}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT DMSO {2}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT Miltefosin {1}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT Miltefosin {2}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT_NMT-A001_{1}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMTNMT-A001_{2}	170	.....	.....	.....	.....	.....	.....	169
LdMT_NMT-A002_{1}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT_NMT-A002_{2}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT_NMT-C0074_{1}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT_NMT-C0074_{2}	901	NVLLTSIPPF	FMGIFDKDLPEDALLERPKLYT	PLSHGEYFN	LATLLRWFVESLTTAVILFYAAYPTLIRQD	GSHQRYTGG	TGLVFSGL	990
LdMT=LinJ.13.1590	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT DMSO {1}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT DMSO {2}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT Miltefosin {1}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT Miltefosin {2}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT_NMT-A001_{1}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMTNMT-A001_{2}	170	.....	.....	.....	.....	.....	.....	169
LdMT_NMT-A002_{1}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT_NMT-A002_{2}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT_NMT-C0074_{1}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080
LdMT_NMT-C0074_{2}	991	ILVIQTRF	ILQIRYWQWLQVFGMAMSIFL	FLLFLVYS	AIPSVFSDTNFYQAFDLMS	TAKYWF	FLLLYVGT	1080

**Abb.18 Sequenzanalyse der Aminosäuresequenz von LdMT (Miltefosin-Transporter) der resistenten *L.don* 1SR.** Die gDNA der resistenten *L.don* 1SR wurde isoliert und für eine Next-Generation-Sequencing Analyse verwendet. Als Referenz-Sequenz diente die Aminosäuresequenz von *L.don* BPK. Von der Referenz-Sequenz abweichende Aminosäuren sind weiß unterlegt. Die Zahlen links und rechts neben der Sequenz zeigen die Position in der Aminosäuresequenz an.

Die vergleichende Sequenzanalyse der Aminosäuresequenz von LdMT zeigte für die Negativkontrolle (DMSO-selektierte Parasiten) keine Veränderungen zur Referenz-Sequenz. Für beide Miltefosin-resistenten Leishmanien-Populationen wurde in der Aminosäuresequenz an Position 830 ein Austausch von Alanin zu Glycin beobachtet.

Für die biologische Probe (1) der NMT-A001-resistenten Leishmanien wurde an Position 956 ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Glutaminsäure beobachtet. Bei der Probe NMT-A001 (2) führte die Sequenzveränderung zu einem Stopcodon an Position 169, also zum Syntheseabbruch. Bei den NMT-A002-resistenten Leishmanien war in der biologischen Probe Nr.1 ein Stopcodon an Position 1063 zu erkennen, das zu einem C-terminal verkürzten Protein führt. Bei der biologischen Probe Nr.2 war an Position 913 ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparaginsäure zu erkennen. Für die NMT-C0074-resistenten Parasiten waren in der LdMT-Sequenz keine Abweichungen zur Referenz-Aminosäuresequenz zu erkennen.

Bei der Sequenz-Analyse der Pteridin- und Biopterin/Folat-Transporter wurden *SNPs* in verschiedenen Genen beobachtet. Die Punktmutationen in LinJ.10.0410 führen in beiden unter NMT-C0074 selektierten Proben in der putativen Aminosäuresequenz zu einem Austausch von Threonin zu Alanin in Position 416. Für die Probe NMT-C0074 (1) wurden

in LinJ.10.0400 sogar drei Mutationen beobachtet. Diese führen zu Veränderungen der Aminosäure-Sequenz an Position 310 von Asparaginsäure zu Glycin, an Position 365 von Alanin zu Methionin und an Position 367 von Threonin zu Arginin. In der Probe NMT-C0074 (2) wurde in dem Gen LinJ.10.0380 eine Mutation beobachtet, die an Position 935 zu einem Austausch von Alanin zu Glycin und an Position 521 von Cystein zu Glycin führt.

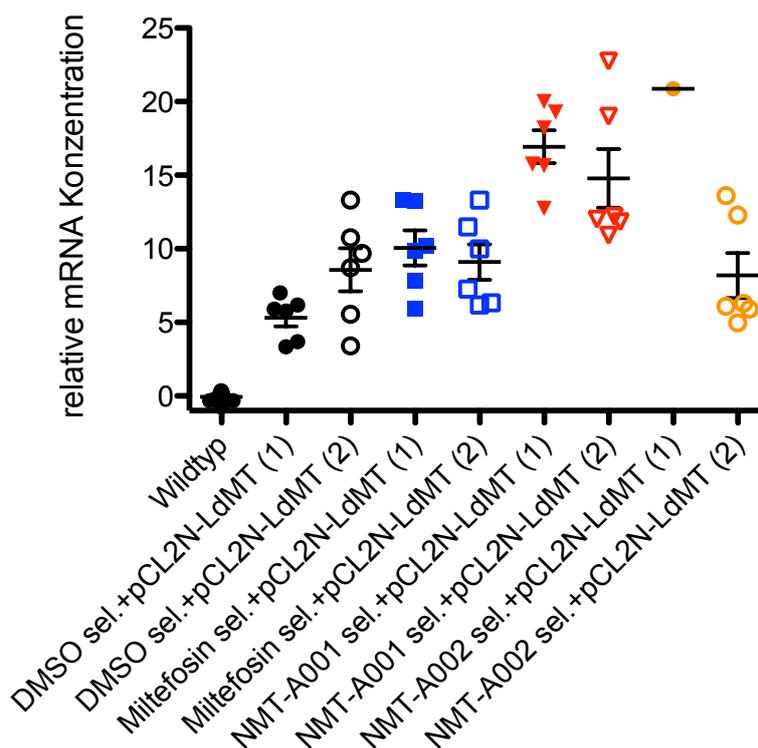
#### **4.3.6. Herstellung von LdMT *gene add back* Mutanten**

Um zu prüfen, ob der Miltefosin-resistente Phänotyp durch die identifizierten Aminosäuresequenz-Veränderungen hervorgerufen wird, wurden die resistenten Leishmanien mit einer funktionellen Kopie des Miltefosin-Transportergens transfiziert. Durch die zusätzliche episomale Kopie des Gens (*gene add back*) sollte der Miltefosin-sensitive Phänotyp wiederhergestellt werden.

Dazu wurde mittels PCR das Miltefosin-Transportergen aus genomischer DNA von *L. don* 1SR Wildtyp Parasiten amplifiziert. Das 3109 bp große PCR-Produkt wurde enzymatisch mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BglII* geschnitten. Das entstandene Produkt wurde in den Klonierungsvektor pUC19 integriert (pUC-LdMT). Die Sequenzierung zeigte keine Abweichungen zu der Sequenz des Referenzgenoms. Zur Vervielfältigung des Plasmids wurden kompetente *E. coli* mit pUC-LdMT transfiziert. Das Miltefosin-Transportergen wurde mittels der Restriktionsenzyme *KpnI* und *HindIII* aus dem pUC-19 Vektor herausgeschnitten und in das Expressionsplasmid pCL2N integriert (pCL2N-LdMT). Miltefosin, NMT-A001- und NMT-A002--resistente Leishmanien wurden mit dem pCL2N-LdMT Plasmid transfiziert, das eine G418-Selektion erlaubt.

#### **4.3.7. Verifizierung der *gene add back* Mutanten auf mRNA-Ebene**

Um die episomale Expression des pCL2N-LdMT zu quantifizieren, wurde eine semi-quantitative *real time* RT-PCR (SYBR *Green* qRT-PCR) durchgeführt. Dafür wurde die RNA der *gene add back* Mutanten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde im Folgenden für eine *real time* RT-PCR verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass der Übergang vom Miltefosin-Transportergen zum Plasmid pCL2N amplifiziert wird. Es kann somit nur zu einem PCR-Produkt kommen, wenn LdMT als Transgen transkribiert wird.

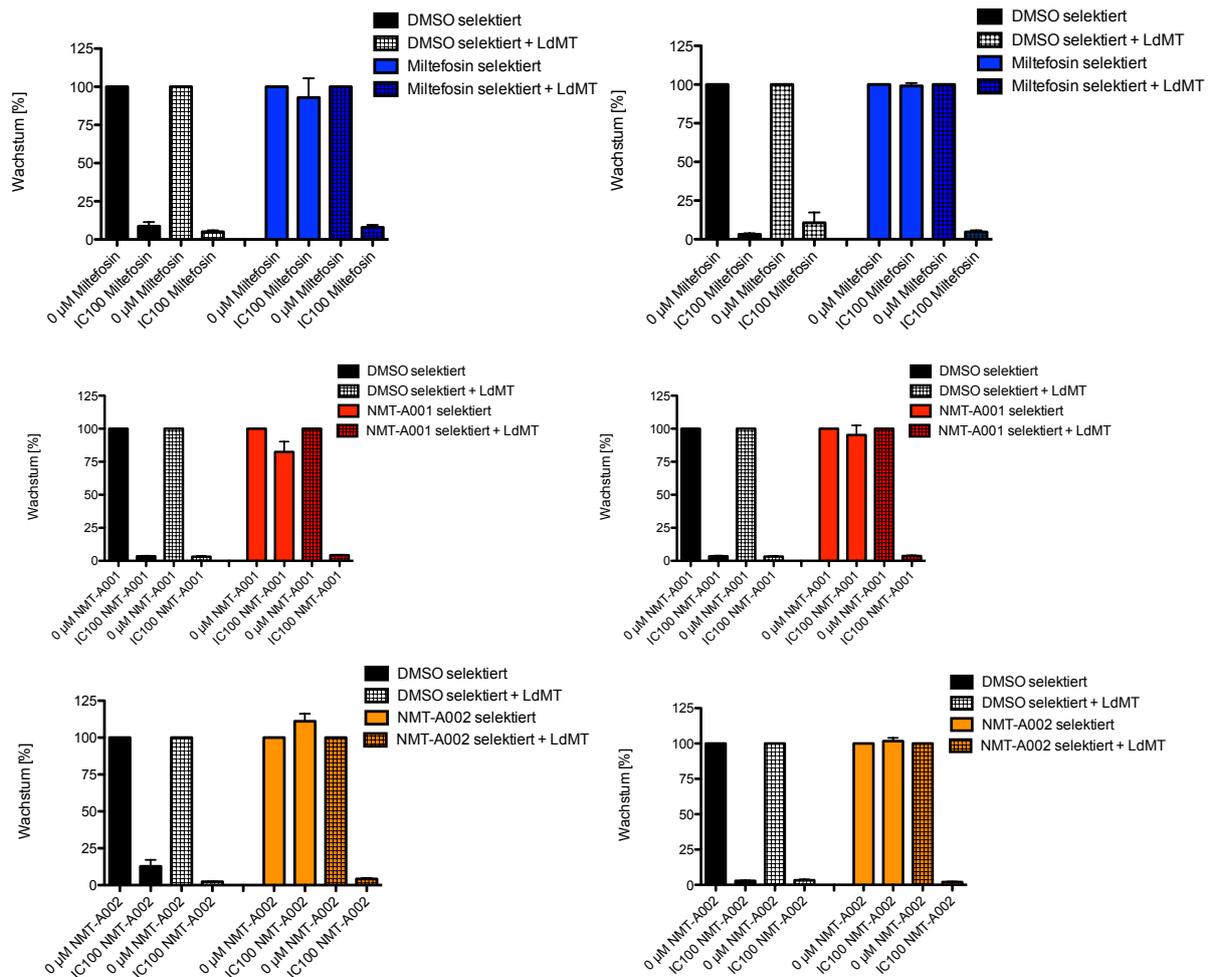


**Abb.19 Verifizierung der *gene add back* Mutanten auf mRNA Level** Die RNA der resistenten Leishmanien wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine semi-quantitative qPCR verwendet. Die Primer wurden so gewählt, das sie im Übergang vom pCL2N-Vektor zum LdMT *Insert* binden. n=4

Die Probe der Wildtyp Promastigoten enthielt keine LdMT-mRNA (Abb.19). Die mRNA Level der transfizierten, resistenten Leishmanien waren deutlich erhöht (5-20 fache mRNA Konzentration), verglichen mit dem mRNA Level der Wildtyp Leishmanien.

#### 4.3.8. *In vitro* Funktionsanalyse der *gene add back* Mutanten

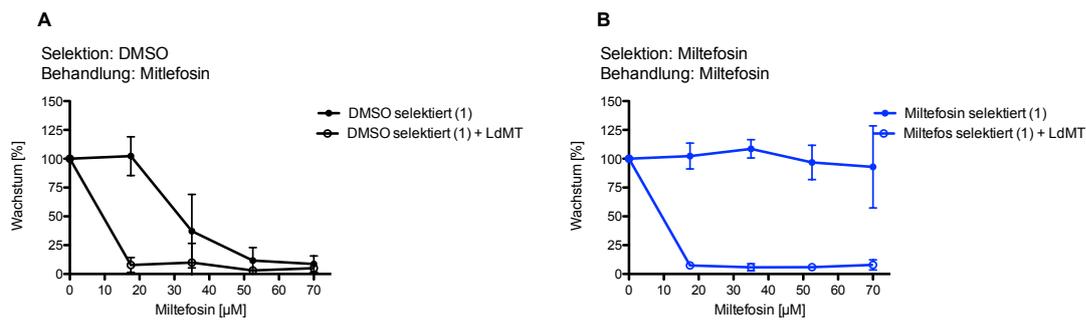
Die episodale Expression des LdMT sollte die selektierten Promastigoten wieder sensitiv gegenüber Miltefosin und Derivaten machen. Um dies zu prüfen, wurden Dosis-Wirkungskurven angefertigt. Die Promastigoten wurden ohne und mit  $IC_{100}$  von Miltefosin, NMT-A001 oder NMT-A002 für 72 h inkubiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Wachstum wurde, bezogen auf die zugehörige DMSO-behandelte Kontrolle [%], dargestellt.



**Abb.20 Funktionsanalyse der LdMT *gene add back* Mutanten.** Je  $1 \times 10^5$ /mL der resistenten Promastigoten und die LdMT *gene add back* Mutanten wurden mit bzw. ohne die jeweilige Leitstruktur eingesät. Nach 72 h wurde die Zellzahl bestimmt und bezogen auf die jeweilige mit DMSO behandelte Kontrolle [%] dargestellt. n=4

Es wurde deutlich, dass die mit pCL2N-LdMT transfizierten Promastigoten wieder sensitiv gegen eine Behandlung mit Miltefosin oder dem jeweiligen Miltefosin-Derivat wurden (Abb. 20). Der Miltefosin-resistente Phänotyp der Promastigoten wurde durch eine episodale Expression des Miltefosin-Transporters wieder aufgehoben. Dies belegt, dass die Resistenzen auf die Mutationen im LdMT-Gen zurückzuführen sind.

Um zu prüfen, ob die Wiederherstellung des Miltefosin-sensitiven Phänotyps der *gene add back* Mutanten nur auf die Überexpression des pCL2N-LdMT zurückzuführen ist, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Hierbei wurden die resistenten Promastigoten und die *gene add back* Mutanten mit IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> und IC<sub>100</sub> der jeweiligen Leitstruktur behandelt.



**Abb.21 *gene add back* Mutanten mit Miltefosin Behandlung** Die resistenten und die transfizierten *L.don* 1SR wurden für 72 h mit  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  und  $IC_{100}$  Miltefosin inkubiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Wachstum [%] bezogen auf die DMSO Kontrolle dargestellt.

Es wurde deutlich, dass die episodale Expression von LdMT sowohl bei den DMSO-selektierten (Abb.21(A)) als auch bei den Miltefosin-resistenten Leishmanien (Abb.21(B)) zu einer gleichermaßen erhöhten Sensitivität gegen Miltefosin führte, was gegen zusätzliche Resistenzmechanismen in den selektierten Parasiten spricht.

Tabelle 15: Übersicht der durchgeführten Experimente

	Miltefosin	NMT-A001	NMT-A002	NMT-C0074	NMT-H0080	Antimon (Sb <sup>III</sup> )
Erworbene Resistenz von <i>L. don</i> BPK091[pcos190] unter (IC <sub>75</sub> )	✓	-	✓	✓	✗	✓
Kreuzresistenz gegen andere Wirkstoffklassen	✗	-	✗	✗	-	✗
Cos-Seq	✓	-	✓	✓	(✓) Selektion unter (IC <sub>50</sub> )	✓
Infektioexperimente	✓	-	✓	✓	-	✓
Resistenz der intrazellulären Amastigote	✗	-	✗	✓	-	✗
Spontane Resistenz von <i>L. don</i> 1SR unter (IC <sub>75</sub> )	✓	✓	✓	✓	✗	-
Kreuzresistenz gegen andere Wirkstoffklassen	✗	✗	✗	✗	-	-
NGS	✓	✓	✓	✓	-	-
Infektioexperimente	✓	✓	✓	✓	-	-
Resistenz der intrazellulären Amastigote	✗	✗	✗	✗	-	-

✗ = konnte nicht beobachtet werden

- = Experiment nicht durchgeführt

## 5. Diskussion

### 5.1. Analyse der Leitstrukturen

#### 5.1.1. Effektivität der Leitstrukturen bei der Behandlung von *L. donovani* Promastigoten

Miltefosin ist ein Alkylphosphocholin, das ursprünglich für die Therapie von Mammakarzinomen getestet wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass Miltefosin bei oraler Einnahme die gleiche Effektivität wie bei intravenöser Darreichung hat (Eibl und Unger, 1990). Alkylphosphocholine weisen ebenfalls anti-parasitische Wirksamkeit auf (Croft, et al., 1987). Miltefosin ist sowohl gegen amastigote als auch gegen promastigote Leishmanien wirksam (Azzouz, et al., 2005). Auch im Maus-Modell konnte die Wirksamkeit von Miltefosin gegen die viszerale Leishmaniose gezeigt werden (Kuhlencord, et al., 1992). Miltefosin wird als erstes orales Medikament erfolgreich in der Behandlung von Leishmaniosen eingesetzt und ist auch bei Therapie-resistenten Fällen wirksam (Sundar, et al., 1999)(Sundar et al., 2002) (Sundar und Rai, 2002). Mittlerweile gehört Miltefosin zu den Standard Anti-*Leishmania*-Medikamenten.

Die mittlere effektive Hemmkonzentration ( $EC_{50}$ ) für Miltefosin gegen Promastigote wird mit 26,73  $\mu\text{M}$  (23,28–30,19  $\mu\text{M}$ ) angegeben (Azzouz et al., 2005). Die in dieser Arbeit bestimmte mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) für Miltefosin liegt mit 35  $\mu\text{M}$  etwas höher als die Literaturwerte (Abb.2). Die  $IC_{50}$ -Werte der Miltefosin-Derivate liegen für NMT-A001 bei 9  $\mu\text{M}$  und für NMT-A002 bei 1,9  $\mu\text{M}$ . Die beiden Miltefosin-Derivate zeigen somit eine um eine Größenordnung höhere Aktivität. NMT-A001 ist vierfach effektiver gegen *Leishmania* Promastigoten. Für NMT-A002 ist die Effektivität 18-fach höher. Bezogen auf die Anti-*Leishmania*-Aktivität sind die Miltefosin-Derivate effektiver als Miltefosin selbst.

Leishmanien benötigen Pteridine, wie z.B. Biopterin, die meist aus dem Wirtsmetabolismus gewonnen werden. In den Parasiten werden Pteridine mittels Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Pteridin-Reduktase 1 (PTR1) umgesetzt (Vickers und Beverley, 2011). Somit bietet dieser Stoffwechselweg viele mögliche Zielstrukturen für die Entwicklung neuer anti-*Leishmania*-Wirkstoffe (Nare, et al., 1997). In Promastigoten kann PTR1 die Funktion von DHFR übernehmen, wenn DHFR gehemmt ist, was bei der Entwicklung von DHFR-Inhibitoren berücksichtigt werden muss (Cunningham und

Beverley, 2001). Mittels virtuellem *screening* wurden für PTR1-hemmende Leitstrukturen  $IC_{50}$  zwischen 0,39 und 5,6 mM ermittelt (Ferrari, et al., 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Leitstruktur NMT-C0074 gehört zur Klasse der Pteridin-Reduktase1-Inhibitoren (PTR1-Inhibitoren). Für NMT-C0074 wurde in dieser Arbeit ein  $IC_{50}$  von 1,85  $\mu$ M bestimmt (Abb.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass NMT-C0074 eine stärkere anti-*Leishmania*-Aktivität als bisher in der Literatur beschriebene PTR1-Inhibitoren und als Miltefosin/-Derivate hat.

NMT-H0080 ist ein Flavonoid. Flavonoide sind Bestandteile von Pflanzen und Teil vieler intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden. Baicalein ist ein Flavonoid, welches durch oxidativen Stress ähnliche Veränderungen in Leishmanien auslöst wie der programmierte Zelltod (Apoptose). Die Behandlung mit 5 bzw. 10  $\mu$ M Baicalein führt bei Promastigoten zu einer Apoptoserate von 32,5 und 72% (BoseDasgupta, et al., 2008). Für NMT-H0080 wurde in dieser Arbeit eine  $IC_{50}$  von 7,5  $\mu$ M bestimmt (Abb.2). Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten Leitstrukturen bei der Behandlung von *L. donovani* Promastigoten eine bessere Effektivität als Miltefosin zeigen.

### **5.1.2. Wirkung der Leitstrukturen auf *L. donovani* Promastigoten**

Die Behandlung mit hohen Konzentrationen von Miltefosin führt bei Leishmanien zur Apoptose (Khademvatan et al., 2011). Es treten DNA-Kondensationen im Nukleus auf sowie DNA-Fragmentierungen (Verma und Dey, 2004). Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die daraus resultierende Freisetzung von ROS (*reactive oxygen species*) in das Zytosol sind ein Zeichen für Apoptose (Paris, et al., 2004). Der Farbstoff MitoTracker (Red CMXRos) eignet sich auf Grund der spezifischen Färbung des Mitochondriums zur Differenzierung von apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen (Poot, et al., 1997).

Die Färbung mit MitoTracker (Red CMXros) zeigte für die Behandlung von *Leishmania* Promastigoten mit Miltefosin und den Miltefosin-Derivaten (NMT-A001 und NMT-A002) bei  $IC_{50}$  keine Schädigungen des Mitochondriums. Die Membran war klar gegen das Zytosol abgegrenzt und die Form der Mitochondrien wies keine Unterschiede zu denen der Kontrolle (DMSO-behandelt) auf (Abb.3). Auch die mit DAPI angefärbten Zellkerne zeigten

keine Schädigungen oder DNA-Kondensationen. Es waren bei  $IC_{50}$  keine zytotoxischen Effekte für Miltefosin und die Miltefosin-Derivate zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Miltefosin-Derivate die gleiche Verträglichkeit hatten wie Miltefosin.

### **5.1.3. Auswirkung der Biotinylierung der Leitstrukturen**

Für die Identifizierung von Interaktionspartnern wurden die Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 biotinyliert. Nach der Behandlung der promastigoten Leishmanien sollten Gesamtzellextrakte hergestellt werden und durch Fällung von biotinylierten Leitstrukturen mit Streptavidin-Agarose die n gebunden Zielstrukturen isoliert werden (Uno, et al., 2012). Die Dosis-Wirkungskurven zeigten, dass die biotinylierten Derivate keine Anti-*Leishmania*-Aktivität hatten (Abb.6).

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die zusätzliche Biotin-Gruppe den ursprünglichen Wirkmechanismus der Miltefosin-Derivate behindert. Ein möglicher Grund könnte die sterische Veränderung der Miltefosin-Derivate durch die Biotinylierung sein. Es ist beschrieben, dass die Markierung von Enzymen deren Aktivität beeinflussen kann (Freydank, et al., 2008). Möglicherweise verhindert das Biotin-Molekül auch den Transport der Miltefosin-Derivate über die Plasmamembran in das Zytoplasma der Leishmanien.

Es wäre nötig zu prüfen, ob andere Gruppen (Histidin, GFP, *Myc*) die Funktion der Miltefosin-Derivate ebenfalls beeinflussen oder stören. Weiterhin sollten verschiedene Positionen innerhalb der Moleküle geprüft werden, an welchen die Markierung erfolgen könnte.

### **5.1.4. Hitzeschock-Antwort der Leishmanien auf die Behandlung mit den Leitstrukturen**

Der Lebenszyklus von Leishmanien ist biphasisch. Im Darm der Sandmücke leben Leishmanien als Promastigote. Bei Eintritt in den Säugetierwirt kommt es bedingt durch die erhöhte Temperatur und den geringen pH-Wert der Umgebung (pH 5,5) zur Umwandlung in Amastigote. Bei dieser Umwandlung kommt den Hitzeschockproteinen (HSP) eine wichtige Rolle zu (Krobitsch, et al., 1998) (Krobitsch und Clos, 1999) (Wiesgigl und Clos, 2001). Doch Hitzeschockproteine schützen Leishmanien auch vor weiteren Stressoren, wie z.B. oxidativem Stress oder der Behandlung mit Chemikalien (Hombach, et al., 2014) (Codonho, et al., 2016). Sowohl für Miltefosin-resistente als auch für Antimon-

resistente *Leishmania* Promastigoten wurden veränderte Proteinmengen von HSP70 ist beschrieben. Es konnten in Miltefosin-resistenten Leishmanien verringerte Mengen des mitochondriale HSP70 (HSPA9B) beobachtet werden (Vacchina, et al., 2016b). Bei Antimon-resistenten Leishmanien, war hingegen eine verstärkte Expression von HSP70 zu beobachten (Brochu et al., 2004).

HSP100 zeigt von allen HSPs den stärksten Anstieg unter Hitzestress (Abb.4) (Hubel, et al., 1997) (Krobitch und Clos, 1999, Rosenzweig, et al., 2008). Um Veränderungen der Abundanz verschiedener Hitzeschockproteine zu ermitteln, wurden Western Blots durchgeführt (Abb.4). Bei der Behandlung von promastigoten Leishmanien mit Miltefosin war bei der vergleichenden Analyse der Hitzeschockproteine keine erhöhte Protein-Abundanz für HSP100 zu beobachten (Abb.5). Nur in der Positiv-Kontrolle (24 h, 37°C) war ein erhöhtes Signal für HSP100 zu beobachten. Diese Beobachtung zeigt, dass durch die Behandlung mit Miltefosin/-Derivaten keine klassische Stressantwort in Leishmanien ausgelöst wird.

Für HSP23 war nach 24 h Behandlung mit IC<sub>50</sub> Miltefosin und den Miltefosin-Derivate eine leichte Erhöhung der Proteinmenge zu beobachten (Abb.5). Das Wachstum von HSP23-Nullmutanten ist bei der Behandlung mit Ethanol oder Antimon (Sb<sup>III</sup>) signifikant gehemmt (Hombach et al., 2014). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass HSP23 auch eine Rolle bei der Antwort der Leishmanien auf die Behandlung mit Miltefosin/-Derivaten spielt. Es wäre interessant zu prüfen, wie HSP23 Nullmutanten auf die Behandlung mit Miltefosin reagieren.

Für HSP70 war bei der Behandlung mit Miltefosin, NMT-A001 oder NMT-A002 eine verringerte Proteinabundanz zu beobachten (Abb.5). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass auch HSP70 eine Rolle bei der Antwort der Leishmanien auf die Behandlung mit den Leitstrukturen spielt. Vacchina *et al.* konnten zeigen, dass Miltefosin-resistente Leishmanien verringerte Proteinmengen des mitochondrialen HSP70 (HSPA9B) aufwiesen. Weiterhin wurde beschrieben, dass HSPA9B Leishmanien vor anderen Stressoren wie niedrigen pH-Werten oder Temperaturerhöhungen schützt (Vacchina et al., 2016b).

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass Leishmanien mit einer verstärkten Expression von HSP 70 und HSP23 auf die Behandlung mit Miltefosin/-Derivaten reagieren.

## 5.2. Resistente *L. donovai* Promastigote

Das vermehrte Auftreten Therapie-resistenter Leishmanien stellt ein wachsendes Problem bei der Behandlung von Leishmaniosen dar (Croft, et al., 2006). Beim Test neuer Anti-*Leishmania* Wirkstoff-Kandidaten muss daher deren Resistenz-Potential mit einbezogen werden. Die Analyse der genetischen Grundlagen von Resistenzmechanismen kann außerdem Hinweise auf Wirkweisen der Leitstrukturen geben.

Im Rahmen des Projektes "*New Medicines for Trypanosomatidic Infections*" (NMTrypl) wurden neue Substanzen verschiedener Wirkstoffklassen erzeugt und auf ihre leishmanizide Wirkung geprüft. Das Resistenz-Potential der Leitstrukturen NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074 und NMT-H0080 in Leishmanien wurde in dieser Arbeit getestet. Die genetischen Grundlagen der Resistenzen wurden analysiert und die Auswirkungen der Resistenzen auf die Infektiosität und das intrazelluläres Überleben getestet. Die Ergebnisse werden im Folgenden den Wirkstoffklassen nach geordnet diskutiert.

### 5.2.1. Miltefosin

Miltefosin gehört zu den Alkylphosphocholinen und ist ein Wirkstoff, der ursprünglich zur Therapie von Mammakarzinomen getestet wurde. Miltefosin wird ebenfalls erfolgreich für die Behandlung von Leishmaniosen verwendet. Die Teratogenität von Miltefosin ist der schwerwiegendste Nebeneffekt, der den Nutzen von Miltefosin stark einschränkt (Sundar et al., 2002). Aus diesem Grund wird nach Alternativen für Miltefosin gesucht.

Die Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 sind Miltefosin-Derivate; daher wurde Miltefosin in allen Experimenten als Kontrolle verwendet.

#### 5.2.1.1. Erfolgreiche *in vitro* Selektion resistenter Promastigoten unter Miltefosin

Bei der *in vitro* Selektion resistenter *L. donovani* Promastigoten unter dem  $IC_{50}$  von Miltefosin können in verhältnismäßig kurzer Zeit viele Generationen unter dem Selektionsdruck durchlaufen werden. Somit kann im Labor der langwierige Prozess der Selektion von bestimmten Resistenz-Merkmalen in einer Population nachgestellt werden.

Die *in vivo* Selektion von intrazellulären Amastigoten ist dagegen zeitintensiver, jedoch wird bei diesem Ansatz das relevante, amastigote Stadium in der Wirtszelle selektiert.

Bei der *in vitro* Selektion unter Miltefosin ( $IC_{50}$  und nachfolgend unter  $IC_{75}$ ) konnten sowohl für *L. don* BPK091[pcos190] als auch für *L. don* 1SR resistente Promastigote selektiert werden (Abb.7+13).

Dieses Ergebnis zeigt, dass in der heterogenen Ausgangspopulation Leishmanien mit veränderten genetischen Merkmalen zum Wachstum unter Miltefosin vorhanden waren, die sich unter Selektion durchsetzten.

In der Literatur wurde der Prozess der Selektion von Miltefosin-Resistenz mehrfach beschrieben. Seifert et al. beschrieben im Jahr 2003 die Selektion einer Miltefosin-resistenten *Leishmania*-Population. Durch stetige und schrittweise Erhöhung des Miltefosin-Selektionsdrucks konnte eine *Leishmania*-Population selektiert werden, die 15-fach resistenter gegen Miltefosin war als die korrespondierende Wildtyp-Population (Seifert, et al., 2003). Für die humane Leukämie-Zelllinie HL60 ist die *in vitro* Erzeugung einer Miltefosin-resistenten Zelllinie (HL60R) beschrieben. HL60R kann eine bis zu 10-fach höhere Konzentration von Miltefosin tolerieren, verglichen mit der Miltefosin-sensitiven Zelllinie (Berkovic et al., 1996). Auch für *C. elegans* und *S. cerevisiae* konnten Resistenzen gegen Edelfosin, ein Miltefosin-Derivat bestimmt werden (Cuesta-Marban, et al., 2013, Sanchez-Blanco, et al., 2014).

Dies zeigt, dass die Resistenz gegen Miltefosin nicht exklusiv in Leishmanien auftreten.

#### **5.2.1.2. Miltefosin-Resistenz vermittelt in Promastigoten keine Kreuzresistenzen**

Wurden die Miltefosin-resistenten Leishmanien mit den  $IC_{50}$  der anderen Leitstrukturen behandelt, war eine Kreuzresistenz nur gegen die Miltefosin-Derivate NMT-A001 und NMT-A002 zu beobachten (Abb.10+15). Gegen Leitstrukturen aus den anderen Wirkstoffklassen war dagegen keine Kreuzresistenz nachzuweisen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch Miltefosin induzierte Resistenz spezifisch für Miltefosin und seine Derivate ist.

Für Leishmanien ist beschrieben, dass *in vitro* selektierte, Miltefosin-resistente Parasiten resistent gegenüber anderen Alkylphospholipiden wie z. B. Edelfosin sind (Perez-Victoria et al., 2001). Jedoch wurden keine Kreuzresistenzen gegen Wirkstoffe anderer Wirkstoffklassen beschrieben (Seifert et al., 2003). Analoge Ergebnisse wurden für

Miltefosin-resistente humane Zelllinien beschrieben, ebenfalls ohne Kreuzresistenzen gegen andere Wirkstoffklassen (Danhauser-Riedl, et al., 1990). Jedoch wurde auch in solchen Modellen eine Resistenz gegen weitere Alkylphospholipide (Perifosin und Edelfosin) beobachtet (Munoz-Martinez, et al., 2008) (Fu et al., 1999).

Weiter wurde für *Leishmania* spp. gezeigt, dass *in vitro* selektierte Antimon (Sb<sup>III</sup>)-, Miltefosin- und Amphotericin-B-resistente Parasiten schneller eine Kreuzresistenz gegen Methotrexat ausbilden, als dies für Paromomycin-resistente Leishmanien zu beobachten war (Moreira, et al., 2011).

Für die Analyse der Entstehung von Kreuzresistenzen in Leishmanien sind die in dieser Arbeit selektierten Wirkstoff-resistenten Promastigoten daher ein nützliches Werkzeug. Es wäre somit interessant zu überprüfen, ob dies auch für die von mir erzeugten, Wirkstoff-resistenten *Leishmania*-Stämme gilt.

### 5.2.1.3. Genetische Grundlagen der Miltefosin-Resistenz

Verschiedene *Leishmania*-Spezies haben eine hohe Varianz in der Anzahl bestimmter Genkopien ebenso wie unterschiedliche Chromosomenzahlen (Aneuploidie), was eine hohe Heterogenität der Populationen bedingt (Rogers et al., 2011). In Leishmanien kann Aneuploidie zu einer schnellen Anpassung führen (Mannaert et al., 2012). Auch auf den Selektionsdruck durch Anti-*Leishmania* Wirkstoffe können Parasiten-Populationen mit einer Veränderung der Anzahl an Genkopien reagieren (Laffitte et al., 2016). Daher bieten vergleichende Genom-Analysen eine gute Möglichkeit, Resistenzgene oder Zielstrukturen der Wirkstoffe zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden für die Identifizierung von Resistenzgenen oder Zielstrukturen der Leitstrukturen zum einen funktionelle Komplementationsanalysen durchgeführt (Choudhury et al., 2008, Nuhs et al., 2014, Tejera Nevado et al., 2016). Die Methode kombiniert die funktionelle Selektion von Genloci in Cosmid-Vektoren unter einem Selektionsdruck in *Leishmania* und die darauf folgende Sequenzierung der selektierten Cosmide durch *Next-Generation-Sequencing*.

Bei der Selektion von *L. don* BPK091[pcos190] unter Miltefosin wurden in zwei biologischen Proben jeweils unterschiedliche Cosmide selektiert (Abb.8,A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass verschiedene Genloci gleichermaßen eine Resistenz gegen Miltefosin hervorrufen können. In der Probe Miltefosin (1) wurde ein Cosmid mit

einem Locus des Chromosoms (CHR)36 selektiert, während sich in Miltefosin (2) ein Bereich aus dem CHR23 durchsetzte (Abb.8,B).

Für *L. infantum* wurde durch funktionelle Komplementation ein Gen, *P299*, (LinJ.08..0630) beschrieben, das eine Resistenz gegen Sb<sup>III</sup> und Miltefosin vermittelt. Dieses Gen ist Teil eines 44-kbp großen Genlocus', der auf CHR08 und zusätzlich als Duplikat auf CHR29 zu finden ist und für ein 299 kDa großes Polypeptid kodiert. Überexpression von *P299* in *L. infantum* führt zur Resistenz gegen Miltefosin und Sb<sup>III</sup> (Choudhury et al., 2008). Interessanterweise wurde dieser Genlocus nicht in der vorliegenden Arbeit selektiert. Ein möglicher Grund kann die Selektion unter einem anderen Selektionsdruck sein. Chowdhury et al. selektierten die mit der Cosmid-Genbank transfizierten Leishmanien von Beginn an unter IC<sub>95</sub> Miltefosin, während in dieser Arbeit erst mit IC<sub>50</sub> und dann mit IC<sub>75</sub> von Miltefosin selektiert wurde. Ein anderer Grund kann das Fehlen der hier selektierten Cosmide in der damals benutzten rekombinanten *L. infantum*-Population sein. Zum damaligen Zeitpunkt war es technisch unmöglich, die Abdeckung des *Leishmania*-Genoms durch eine Cosmid-Genbank zu bestimmen. Dies wurde nun durch *Next-Generation-Sequencing* möglich, sodass das Genom in der *L. donovani* BPK [pCos190] Population zu >95% vertreten ist (Tejera, 2016).

Bei der Analyse klinischer *L. infantum*, *L. major* und *L. killicki* Parasiten-Isolate aus Antimon-Therapie-resistenten Fällen konnten zum Teil erhöhte Mengen von *P299*-spezifischer mRNA nachgewiesen werden. In allen Proben mit erhöhter *P299* mRNA-Konzentration wurden ebenfalls verstärkte mRNA-Mengen für mindestens einen weiteren Resistenzmarker beobachtet (Jeddi, et al., 2014). Diese Beobachtung deutet an, dass Resistenzen multifaktorielle Ereignisse sind und *P299* im Patienten nur mit anderen Resistenzmechanismen zusammen den resistenten Phänotyp begründet.

Dieses Ergebnis zeigt einmal mehr den Unterschied zwischen natürlicher Selektion und *in vitro* Selektion.

#### **5.2.1.4. Punktmutationen im LdMT führen zu Miltefosin-resistenten Promastigoten**

Da die oben beschriebene Selektion von Cosmid-tragenden Parasiten ausschließlich dominante Resistenzmarker identifizieren kann, habe ich zusätzlich nach spontanen Resistenzbildungen in einer nicht gentechnisch veränderten Population gesucht. Bei dieser Strategie können auch rezessive Merkmale zur Resistenz führen. Allerdings

gestaltet sich die Identifizierung der genetischen Veränderungen aufwändiger und erfordert eine vollständige genomische Sequenzierung mit hinreichender Redundanz. Bei der Analyse der Genom-Sequenzen resistenter und sensitiver Populationen musste ich mich zunächst auf bereits bekannte Resistenz-Marker beschränken, wie die Gene für Phospholipid-Transporter (LdMT) und das ROS3-Gen.

Bei der Analyse der spontan Miltefosin-resistenten *L. don* 1SR wurden im LdMT-Gen Punktmutationen gefunden (Abb.18). Bei den Miltefosin-resistenten Leishmanien war an Position 830 ein Austausch von Alanin (A) zu Glycin (G) zu beobachten. Dagegen konnten in den Kontrollen keine Sequenzabweichungen identifiziert werden. Mutationen im ROS3-Gen waren nicht zu beobachten. Es handelt sich bei den Aminosäuren Alanin und Glycin um kleine Aminosäuren; die resultierende sterische Veränderung ist gering. Jedoch ist Alanin eine unpolare Aminosäure, wohingegen Glycin zu den polaren Aminosäuren zählt und alpha-Helices destabilisiert, was die korrekte Faltung und die Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins stören kann.

LdMT wurde 2003 von Pérez-Victoria *et al.* als Transporter beschrieben, der in Leishmanien für die Aufnahme von Phospholipiden wie z. B. Miltefosin verantwortlich ist. LdMT gehört zur Klasse der P4-Typ ATPasen und wurde durch funktionelle Komplementation einer spontan Miltefosin-resistenten Population identifiziert. Es wurden bei der Sequenzanalyse der Miltefosin-resistenten *L. donovani* weder Amplifikationen des Gens noch Insertionen oder Deletionen nachgewiesen, jedoch konnten Punktmutationen im LdMT-Gen identifiziert werden. Die Mutationen T420N, L856P führten zu einer Inaktivierung des LdMT und somit zur verringerten Aufnahme von Miltefosin (Perez-Victoria *et al.*, 2003b). Auch Coelho *et al.* zeigten für Miltefosin-resistente Leishmanien Mutationen im Miltefosin-Transporter an den Positionen P782T, W895\*, M547del, G852D, W617\*, G565R (Coelho, *et al.*, 2012). Das zahlreiche Auftreten von verschiedenen Punktmutationen in LdMT zeigt, dass es sich um eine hoch variable Gen-Region handelt, in der natürlicherweise viele Mutationen auftreten.

Die im Rahmen dieser Arbeit selektierten Miltefosin-resistenten Promastigoten zeigten vergleichbare Punktmutationen im LdMT. Die hier erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den Daten aus der Literatur.

Die erfolgreiche *in vitro* Selektion für Miltefosin-resistente *L. infantum* Amastigote wurde kürzlich beschrieben (Hendrickx, *et al.*, 2015). Die Sequenz-Analyse des LiMT dieser Miltefosin-resistenten Parasiten zeigt einen Syntheseabbruch an Position 369 des Transporters. Es wurden ebenfalls keine Mutationen im ROS3-Gen beobachtet

(Mondelaers, et al., 2016). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass der Miltefosin Transporter auch bei der Entstehung Miltefosin-resistenter *Leishmania*-Infektionen eine Rolle spielt.

#### **5.2.1.5. LdMT *gene add back* Mutanten sind wieder sensitiv gegenüber Miltefosin**

Durch das Einbringen von funktionellen, episomalen Genkopien des LdMT wurden die zuvor resistenten Promastigoten wieder sensitiv gegenüber Miltefosin (Abb.20). Schon 2003 zeigten Pérez-Victoria et al. die Reversibilität des resistenten Phänotyps von Miltefosin-resistenten Leishmanien durch die episomale Expression des LdMT (Perez-Victoria et al., 2003b). Mit dieser Methode können im Labor schnell verschiedene Mutationen auf ihre Kausalität für den beobachteten Phänotyp getestet werden.

Es zeigte sich bei der Quantifizierung der pCL2N-LdMT Expression, dass mehrere Kopien des Vektors pro Parasit vorhanden waren (Abb.19). Durch die erhöhte Anzahl an pCL2N-LdMT Kopien reagierten sowohl nicht-resistente (DMSO-selektierte) als auch Miltefosin-resistente Promastigote sensitiver auf die Behandlung mit Miltefosin als die Kontrollen (Abb.21). Diese erhöhte Sensitivität nach Komplementation war für resistente und nicht-resistente Ausgangsstämme in gleichem Maße zu beobachten.

Die Überexpression konnte bisher nur durch die erhöhte mRNA-Menge und die erhöhte Sensitivität gegen Miltefosin belegt werden. Es fehlen die Quantifizierung des Proteins und der Beleg dafür, dass die LdMT-Dichte in der Membran erhöht ist.

#### **5.2.1.6. Verminderte Infektiosität von Miltefosin-resistenten Leishmanien**

Bei der Infektion von murinen, primären Knochenmarksmakrophagen zeigten die Miltefosin-resistenten Leishmanien reduzierte intrazelluläre Parasitenlasten, was eine verminderte Infektiosität der resistenten Leishmanien andeutet (Abb.11+16).

Das Phänomen, dass Eigenschaften, die für die *in vitro* Infektiosität von Vorteil waren, durch die Selektion der Promastigoten unter Miltefosin verloren gingen, da sie keinen Selektionsvorteil für die Promastigoten boten, ist aus der Literatur bekannt. Die Selektion einer resistenten Parasiten-Population führt zum Verlust anderer Fähigkeiten, wie z. B. der Infektiosität (Gimode, et al., 2015).

Für Leishmanien ist beschrieben, dass die Selektion von Antimon-resistenten Parasiten mit einer allgemein verbesserten Fitness der Parasiten einhergeht (Vanaerschot, et al., 2013) (Garcia-Hernandez, et al., 2015). Diese Beobachtung konnte jedoch nicht für Miltefosin-resistente Leishmanien bestätigt werden. Vacchina *et al.* zeigten für *in vitro* selektierte Miltefosin-resistente *L. donovani* Promastigote keinen Einfluss der Resistenz auf die Infektiosität der Parasiten (Vacchina, et al., 2016a). Für *in vitro* selektierte Miltefosin-resistente *L. major* konnten bei der Infektion von Makrophagen sogar verringerte intrazelluläre Parasitenlasten gezeigt werden (Turner, et al., 2015). Dieses Bild war auch bei den hier selektierten Miltefosin-resistenten Leishmanien zu beobachten.

Ein wichtiger Unterschied der hier gezeigten Ergebnisse zu bereits in der Literatur beschriebenen Infektionsexperimenten liegt in der Durchführung der Experimente. Die Auswertung der Infektionsexperimente erfolgte durch TaqMan Sonden basierte *real-time* qPCR. Es handelt sich bei dieser qPCR um einen *multiplex* Ansatz zur parallelen Quantifizierung von Leishmanien-Aktin und Maus-Aktin ( Bifeld et al., 2016). Bei dieser Methode können infizierte Wirtszellen mit einbezogen werden, die sich abgelöst haben oder bereits lysiert wurden, ebenso wie die dadurch freigesetzten Leishmanien. Bei der optischen Quantifizierung sind diese Zellen von der Auswertung ausgeschlossen, da sie vor der vorangegangenen Fixierung und Färbung entfernt wurden. Das Anfärben der infizierten Zellen, z. B. mit DAPI, gefolgt von einer optischen Analyse, zählte trotzdem lange zu den Standardmethoden bei der Auswertung von Infektionsexperimenten.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem mit ausdifferenzierten, primären Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen gearbeitet. C57BL/6 Mäuse können keine *Leishmania*-Infektion ausbilden (Aguilar-Torrentera und Carlier, 2001, Loria-Cervera und Andrade-Narvaez, 2014). Viele vorangegangene Arbeiten wurden mit murinen Krebs-Zelllinien wie z. B. RAW264.7 und J774 oder aber auch mit der humanen Krebs-Zelllinie (THP1) durchgeführt. Diese Ergebnisse sind nur eingeschränkt mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Verwendung ausdifferenzierter Knochenmarksmakrophagen spiegelt die natürlichen Infektionsbedingungen besser wieder als die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie. Dennoch handelt es sich auch bei der Verwendung von Knochenmarksmakrophagen nur um ein Modellsystem, das nicht den Einfluss eines komplexen Wirts-Organismus und dessen Immunsystems widerspiegeln kann.

### 5.2.1.7. Keine Miltefosin-Resistenz der intrazellulären Amastigoten

Für Miltefosin-resistente Promastigote wurde beschrieben, dass diese sowohl bei der Infektion von Makrophagen als auch bei der Infektion von BALB/C-Mäusen zu Miltefosin-resistenten intrazellulären Amastigoten werden (Seifert, et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte bei der Behandlung der mit den Miltefosin-resistenten Leishmanien infizierten Makrophagen eine signifikante Reduktion der Parasitenlast beobachtet werden (Abb. 12+17). Die Resistenz der Parasiten blieb hier nicht in den intrazellulären Amastigoten erhalten.

Mögliche Ursachen für die nicht vorhandene Miltefosin-Resistenz der Amastigoten können die Unterschiede zwischen den Resistenz-Mechanismen in Pro- und Amastigoten sein (Hendrickx et al., 2015).

Ein weiterer möglicher Grund der deutlich reduzierten Parasitenlasten kann die Wirkung von Miltefosin auf die Makrophagen sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von humanen mononukleären Zellen mit Miltefosin die Expression von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) erhöht (Hochhuth, et al., 1992). IFN- $\gamma$  aktiviert die Makrophagen, was zur Zerstörung der intrazellulären amastigoten Leishmanien führt (Green, et al., 1990).

Abschließend bleibt zu sagen, dass trotz der schnellen *in vitro* Selektion von Miltefosin-resistenten Promastigoten, keine gesteigerte Infektiosität und keine Resistenz der intrazellulären Amastigoten gegen Miltefosin zu beobachten war. Für Miltefosin-resistente Amastigote sind anscheinend weitere und/oder andere genetische Veränderungen notwendig. Dieses Ergebnis spricht allerdings auch für eine weitere erfolgreiche Anwendung von Miltefosin bei der Behandlung von Leishmaniosen.

### 5.2.2. Miltefosin-Derivate (NMT-A001 und NMT-A002)

Die Leitstrukturen NMT-A001 und NMT-A002 gehören zu den Miltefosin-Derivaten. Durch Veränderungen der Molekülstruktur des bereits zugelassenen Wirkstoffes Miltefosin sollen Verbesserungen für die Anwendung erreicht werden. Ziel war es, Miltefosin-Derivate mit einer gleichen oder gesteigerten anti-parasitären Wirksamkeit aber verringerter Teratogenität herzustellen. Ein verändertes Resistenzmarker-Profil stand nicht zu erwarten; eine verringerte Resistenz-Ausbildung wäre jedoch von Vorteil. Das Resistenz-

Potential von NMT-A001 und NMT-A002 wurde daher in dieser Arbeit mit dem von Miltefosin verglichen.

### **5.2.2.1. Erfolgreiche *in vitro* Selektion resistenter Promastigoten unter NMT-A001 und NMT-A002**

Die Selektion von NMT-A001- und NMT-A002-resistenten *Leishmania*-Promastigoten war ebenso möglich, wie die zuvor beschriebene Selektion von Miltefosin-resistenten Parasiten (Abschnitt 5.2.1.1). Dies deutet auf einen mit Miltefosin vergleichbaren Selektionsdruck von NMT-A001 und NMT-A002 hin. In dieser Eigenschaft unterschieden sich die Miltefosin-Derivate nicht voneinander und auch nicht von Miltefosin.

Die in Leishmanien auftretenden genetischen Veränderungen ermöglichen auch ein Heranwachsen unter dem Selektionsdruck von NMT-A001 oder NMT-A002. Die beobachteten Mutationen werden im Folgenden genauer beschrieben.

### **5.2.2.2. NMT-A001- und NMT-A002-Resistenzen vermitteln in Promastigoten keine Kreuzresistenzen gegen andere Wirkstoffklassen**

Analog zu den Ergebnissen der Miltefosin-resistenten Promastigoten konnten sowohl bei der Behandlung der NMT-A001 als auch NMT-A002-resistenten Promastigoten mit  $IC_{50}$  der anderen Leitstrukturen keine Kreuzresistenzen gegen andere Wirkstoffklassen beobachtet werden. Es waren nur Resistenzen gegen Miltefosin und die Miltefosin-Derivate zu beobachten. (Abb.10+15).

Die durch NMT-A001 oder NMT-A002 induzierte Resistenz ist spezifisch für Miltefosin und seine Derivate. Dieses Ergebnis passt zu den bereits beschriebenen Beobachtungen, dass sowohl Miltefosin-resistente Leishmanien als auch Miltefosin-resistente humane Zelllinien resistent gegen andere Alkylphospholipide sind, jedoch nicht gegen Wirkstoffe anderer Wirkstoffklassen (Perez-Victoria et al., 2001) (Munoz-Martinez et al., 2008).

### 5.2.2.3. Punktmutationen im LdMT führen zu NMT-A001- und NMT-A002-Resistenzen

Da es bei der Selektion unter Miltefosin zur Selektion von Mutationen im LdMT kam, wurde geprüft, ob dies auch unter der Selektion mit den Miltefosin-Derivaten zu beobachten ist.

Bei der Analyse der spontan NMT-A001-resistenten und NMT-A002-resistenten *L. don* 1SR wurden im LdMT-Gen ebenfalls Punktmutationen beobachtet (Abb.18).

In der Probe NMT-A001 (1) der resistenten Leishmanien wurde an Position 956 ein Aminosäureaustausch von Alanin (A) zu Glutamat (E) beobachtet. Bei diesem Austausch wird eine kleine, unpolare Aminosäure gegen eine große, saure Aminosäure ausgetauscht. Bei der Probe NMT-A002 (2) war an Position 913 ein Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Aspartat (D) zu erkennen. Auch hier kommt es zur Substitution einer kleinen, polaren Aminosäure gegen eine große, saure Aminosäure. Derartige Substitutionen können durch sterische und elektrostatische Veränderungen die Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins stören und die Funktion des LdMT behindern.

Bei der Probe NMT-A001 (2) führte die Sequenzveränderung zu einem Stopcodon an Position 169, also zum Syntheseabbruch, was zur Synthese eines stark verkürzten Polypeptids führt. Bei den NMT-A002-resistenten Leishmanien war in der biologischen Probe (1) ein Stopcodon an Position 1063 zu erkennen, das zu einem C-terminal verkürzten Protein führte. Auch Punktmutationen, die zu einem Syntheseabbruch des LdMT führen, sind in der Literatur beschrieben. So zeigten Coelho *et al.* die unter Miltefosin-selektierten Syntheseabbruchmutanten W895\* und W617\* (Coelho *et al.*, 2012). Dies lässt darauf schließen, dass für einen funktionellen Transporter die gesamte Länge des Gen-Produkts benötigt wird.

Allgemein lässt sich sagen, dass die NMT-A001 oder NMT-A002 selektierten Mutanten den unter Miltefosin selektierten Leishmanien entsprachen. Es gibt weder Insertionen oder Deletionen, sondern der Verlust der Funktionalität von LdMT ist auf einzelne Nukleinsäure-Austausche zurückzuführen. Weder NMT-A001, NMT-A002 oder Miltefosin selektieren auf Mutationen im LdROS3. Dies verdeutlicht, dass der von Miltefosin-Derivaten ausgehende Selektionsdruck dem Selektionsdruck unter Miltefosin gleicht und spezifisch zur Selektion von Punktmutationen im LdMT führt.

Die NMT-A001- und NMT-A002-Resistenzen waren reversibel. Durch Einbringen einer funktionellen, episomalen LdMT-Genkopie konnte die Sensitivität gegen NMT-A001 bzw.

NMT-A002 wiederhergestellt werden (Abb.20). Diese Beobachtung konnte auch schon bei den spontan Miltefosin-resistenten Leishmanien gemacht werden. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl NMT-A001 als auch NMT-A002 über den LdMT in die Zellen gelangen können. Dabei ist der genaue Transportmechanismus noch unbekannt.

#### **5.2.2.4. Ähnlichkeiten der genetischen Grundlage der NMT-A002-Resistenz zur Miltefosin-Resistenz**

Bei der Analyse der erfolgreich unter  $IC_{75}$  NMT-A002 selektierten resistenten *L. don* BPK091[pcos190] zeigte sich, dass in zwei biologischen Proben jeweils unterschiedliche Cosmide angereichert wurden. Bei der Probe NMT-A002 (1) war ein Bereich auf CHR25 (Abb.8 C) am häufigsten nachzuweisen. Bei NMT-A002 (2) wurde am stärksten ein Locus auf CHR36 selektiert (Abb.8 D). Dabei decken die Sequenzen auf CHR36 den gleichen Chromosomenabschnitt ab wie die unter Miltefosin selektierte Probe (1) (Abb.8 A).

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das Miltefosin-Derivat NMT-A002 z. T. auf gleiche Resistenzmechanismen selektiert wie Miltefosin. Ein möglicher, naheliegender Grund dafür ist, dass NMT-A002 ein Derivat von Miltefosin ist und aufgrund ähnlicher Wirkweisen auch gleiche Resistenzmechanismen selektiert wie Miltefosin. Untermauert wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der spontan gegen NMT-A002-resistenten *L. donovani* für die vergleichbare Punktmutationen im LdMT gefunden wurden wie in Miltefosin-resistenten Parasiten.

#### **5.2.2.5. Die spontane Resistenz gegen NMT-A001 vermindert die Infektiosität und führt nicht zu resistenten intrazellulären Amastigoten**

Interessanterweise konnten bei Infektionsexperimenten mit Miltefosin-resistenten Leishmanien von der Literatur abweichende Beobachtungen gemacht werden. Die Miltefosin-resistenten Leishmanien zeigten eine verminderte Infektiosität. Daher war es von Interesse zu prüfen, ob auch die gegen Miltefosin-Derivate-resistenten Parasiten in der Infektiosität beeinträchtigt waren.

Bei der Infektion von murinen, primären Knochenmarksmakrophagen zeigten die spontanen NMT-A001-resistenten *L. don* 1SR reduzierte intrazelluläre Parasitenlasten, also eine verminderten Infektiosität der resistenten Leishmanien (Abb.16). Eine mögliche

Erklärung ist auch hier der Verlust Infektionsfördernder-Eigenschaften aufgrund der Selektion von Resistenzen (Vanaerschot et al., 2013). Es ist jedoch auch denkbar, dass LdMT eine Bedeutung während des intrazellulären Stadiums zukommt.

Außerdem konnte bei der Behandlung der Makrophagen, die mit NMT-A001-resistenten Leishmanien infiziert waren, eine signifikante Reduktion der Parasitenlast bewirkt werden (Abb.17). Es gab keine Resistenz intrazellulärer Amastigoten gegen NMT-A001. Auch dieses Ergebnis wurde so für die Miltefosin-resistenten Parasiten beobachtet.

#### **5.2.2.6. Erhalt der *in vitro* Infektiosität von spontan NMT-A002-resistenten *L. don* 1SR**

Im Gegensatz zu den spontan Miltefosin- und NMT-A001-resistenten Parasiten zeigen die spontan NMT-A002-resistenten Leishmanien bei der Infektion von Knochenmarksmakrophagen keine reduzierten Parasitenlasten (Abb.16). Die Parasitenlasten glichen der nicht-selektierten Kontrolle und waren nach 4 h für die Probe NMT-A002 (2) sogar signifikant erhöht. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen, bei denen eine Resistenz gegen Miltefosin und Miltefosin-Derivate mit verringerten intrazellulären Parasitenlasten assoziiert war.

Die beobachteten Punktmutationen im LdMT der spontan NMT-A002-resistenten Parasiten lassen eigentlich auf ähnliche Resistenzmechanismen und Phänotypen schließen wie die Miltefosin- oder NMT-A001-resistenten Parasiten, jedoch bilden die spontan NMT-A002-resistenten *L. don* 1SR hier eine Ausnahme.

Würden diese Mutationen durch die natürliche Selektion auftreten, könnten sich diese mutierten Parasiten möglicherweise stärker verbreiten als Leishmanien ohne diese Punktmutationen. Da 48 h nach der Infektion leicht gesteigerte Parasitenlasten zu beobachten waren, wäre es möglich, dass die Leishmanien besser an das Überleben und die Proliferation im Makrophagen angepasst sind.

#### **5.2.2.7. Die erworbene Resistenz gegen NMT-A002 vermindert die Infektiosität der Parasiten**

Ganz im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen unverminderten Infektiosität der spontan NMT-A002-resistenten Leishmanien wurden bei Infektionsexperimenten mit NMT-A002-

resistenten *L. don* BPK091[pcos190] verminderte Parasitenlasten gezeigt (Abb.11). Diese Eigenschaft wurde bereits bei selektierten Miltefosin-resistenten *L. don* BPK091[pcos190] Parasiten beobachtet. Interessanterweise werden diese unterschiedlichen Auswirkungen der Resistenz durch den Selektionsdruck mit NMT-A002 hervorgerufen. Grund hierfür könnte der Unterschied der Selektion nach erworbener Resistenz oder spontaner Resistenz sein, wodurch unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen.

#### **5.2.2.8. NMT-A002-Resistenz überträgt sich nicht auf intrazelluläre Amastigote**

Interessanterweise konnte bei der Behandlung mit NMT-A002 sowohl für die spontan resistenten *L. don* 1SR als auch für die NMT-A002-resistenten *L. don* BPK091[pcos190] eine signifikante Reduktion der intrazellulären Parasitenlast erreicht werden (Abb.12). Obwohl sich die NMT-A002-resistenten *L. don* 1SR und *L. don* BPK091[pcos190] in der Infektiosität unterscheiden, ist bei beiden Populationen keine Übertragung der NMT-A002-Resistenz auf intrazelluläre Amastigoten zu beobachten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen für die Miltefosin- und NMT-A001-resistenten Parasiten. Diese Beobachtung würde gegen eine Verbreitung von NMT-A002-Therapie-resistenten Leishmanien sprechen, da vorhandene intrazelluläre Amastigote durch die Behandlung mit NMT-A002 oder vermutlich auch durch Miltefosin eliminiert werden können.

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass die Miltefosin-Derivate NMT-A001 und NMT-A002 das gleiche Potential bei der Selektion von Resistenzen in Promastigoten zeigen wie Miltefosin. Spontane Resistenzen gegen NMT-A001 und NMT-A002 sind wie bei Miltefosin auch durch Punktmutationen im LdMT bedingt.

Spontane Resistenzen gegen NMT-A001 und die erworbene Resistenz gegen NMT-A002 vermindern die Infektiosität von Leishmanien. Es ist keine Resistenz in intrazellulären Amastigoten zu beobachten.

Dennoch war für spontan NMT-A002-resistente *L. don* 1SR eine unbeeinträchtigte Infektiosität und leicht gesteigerte Fähigkeit zum Überleben in Makrophagen zu beobachten. Aufgrund dieser Beobachtung sollten Miltefosin und NMT-A001 der Verwendung von NMT-A002 vorgezogen werden. Jedoch sind für weitere Aussagen der

Anwendungsmöglichkeiten von NMT-A002 weiterführende Experimente notwendig, um die Toxizität, Teratogenität und Anwendung im Tiermodell zu prüfen.

### 5.2.3. Antimon (Sb<sup>III</sup>)

Antimon wird seit mehr als 70 Jahren zur Therapie von Leishmaniosen verwendet und war lange die erste Wahl für die medikamentösen Behandlung. Durch die jahrelange massive Verwendung von Antimon-Verbindungen zur Behandlung von Leishmaniosen treten seit 30 Jahren verstärkt Therapie-resistente Fälle auf. In endemischen Gebieten wie z. B. dem Bundesstaat Bihar sind bis zu 65% der gemeldeten Leishmaniose-Fälle Antimon-resistent (Sundar, 2001). Neben der Analyse von Parasiten aus Therapie-resistenten Patientenisolaten wurde auch die *in vitro* Selektion von Antimon-resistenten Parasiten bereits beschrieben (Haimeur und Ouellette, 1998) (Ullman, et al., 1989). Die Analyse dieser resistenten Parasiten liefert wichtige Beiträge zum Verständnis der Wirkmechanismen von Antimon in Leishmanien. Zusammengenommen zählen zu den beobachteten Resistenzmechanismen eine verminderte Aufnahme von Antimon, erhöhte intrazelluläre Thiol-Konzentrationen und der verstärkte Export von Antimon aus der Zelle (Dey et al., 1994, Gourbal et al., 2004, Mukhopadhyay, et al., 1996). Auf Grund der steigenden Anzahl Therapie-resistente Leishmaniose-Fälle werden andere Wirkstoffe zur Therapie von Leishmaniosen benötigt.

Antimon (Sb<sup>III</sup>) wurde in dieser Arbeit ebenfalls als Kontrolle zu den Leitstrukturen verwendet.

#### 5.2.3.1. Genetische Grundlagen der Sb<sup>III</sup>-resistenten

##### ***L.donBPK091[pcos190]***

In dieser Arbeit konnten mit Sb<sup>III</sup> unter IC<sub>50</sub> und nachfolgend unter IC<sub>75</sub> resistente *L.donBPK091[pcos190]* Promastigote selektiert werden (Abb.7). Bei der Analyse der Sb<sup>III</sup>-resistenten Promastigoten wurden in beiden biologischen Proben zwei Cosmide identifiziert, deren Sequenzen Bereiche auf den Chromosomen 23 und 34 abdecken (Abb. 8 H+I).

Auf CHR34 liegt der selektierte Bereich nahe am Telomer-Ende und umfasst ein *cluster* von Resistenzgenen: ARM58 (*antimony resistance marker*), ARM56 und HSP23 (32 kD

*heat shock protein*). ARM58 vermittelt in Leishmanien eine Resistenz gegen Antimon und die Überexpression von ARM58 senkt die Antimon-Konzentration in dem Parasiten (Nuhs et al., 2014)(Schafer, et al., 2014). Die Überexpression jedes der drei Gene in Leishmanien vermindert die Sensitivität von intrazellulären Amastigoten gegen Antimon in *in vitro* Infektionsexperimenten (Tejera Nevado et al., 2016). HSP23 schützt außerdem promastigote Leishmanien gegen Behandlung mit Antimon (Sb<sup>III</sup>) (Hombach et al., 2014). Die in dieser Arbeit beobachtete Selektion dieses Gen-Lokus unter dem Selektionsdruck von Sb<sup>III</sup> bestätigt die bereits beschriebenen Ergebnisse und verifiziert die angewandte Methode.

Der selektierte Bereich auf CHR 23 enthält unter anderem das Gene LinJ.23.0290, das für den ABC-Thiol-Transporter kodiert. In Antimon-resistenten Leishmanien wurden ABC-Transporter bereits als Resistenzvermittler beschrieben (Ouellette, et al., 1998)(Haimeur, et al., 2000). So kann auch hier das Ergebnis dieser Arbeit mit bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen untermauert werden.

Die hier beschriebene Antimon(Sb<sup>III</sup>)-Resistenz der *L.donBPK091[pcos190]* deutet auf einen Resistenzmechanismus hin, der auf einer Kombination aus verminderter Antimon-Akkumulation in der Zelle (ARM58-vermittelt) und dem erhöhten Efflux von Antimon aus der Zelle durch die Überexpression des ABC-Transporters beruhen könnte.

### **5.2.3.2. Verminderte Infektiosität der Sb<sup>III</sup>-resistenten**

#### ***L.donBPK091[pcos190]* und keine Resistenz als Amastigoten**

*In vitro* Infektionsexperimente zeigten, dass Sb<sup>III</sup>-resistente *L.donBPK091[pcos190]* eine signifikant verminderte Parasitenlast im Vergleich zu den nicht-selektierten Parasiten erzeugen (Abb.11). Auch im Vergleich mit den unter den anderen Leitstrukturen selektierten *L.donBPK091[pcos190]* wurden für die Sb<sup>III</sup>-resistenten *L.donBPK091[pcos190]* die geringsten initialen Parasitenlasten (4 h nach der Infektion) beobachtet.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Infektionsexperimenten, die in der Literatur für Antimon-resistenten Leishmanien beschrieben wurden. Die Antimon-Resistenz von *L. donovani* aus Patientenproben wurde mit einer höheren Fitness der Parasiten in Zusammenhang gebracht (Vanaerschot, et al., 2010). Auch bei *in vivo*

Infektionsexperimenten in BALB/c Mäusen wurden für Antimon-resistente *L. donovani* aus Patientenproben höhere Parasitenlasten beobachtet (Vanaerschot et al., 2011).

Ibrahim *et al.* (1994) zeigten jedoch, dass Leishmanien einer *in vitro* selektierte Antimon-resistenten *L. major* Population als intrazelluläre Amastigote wieder sensitiv gegenüber Antimon waren (Ibrahim, Hag-Ali et al. 1994). Auch in dieser Arbeit waren die Antimon-resistenten Parasiten in *in vitro* Infektionsexperimenten sensitiv gegenüber Antimon (Abb. 12). Ein möglicher Grund für diese Beobachtung kann der immunomodulatorische Effekt von Antimon auf die Wirtszelle sein (Muniz-Junqueira und de Paula-Coelho, 2008). Wie bereits erwähnt, konnte ein stimulierender Effekt auf die Wirtszelle auch für Miltefosin beschrieben werden (Green et al., 1990).

Es lässt sich sagen, dass die hier beobachteten Ergebnisse für die Antimon(Sb<sup>III</sup>)-resistenten *L. don*BPK091[pcos190] zum Teil mit den Ergebnisse aus der Literatur übereinstimmen. Da die in dieser Arbeit selektierten Antimon-resistenten Promastigoten sowohl eine verminderte Infektiosität als auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Antimon im Amastigoten-Stadium aufwiesen, sind die hier hervorgerufenen Resistenzen nachteilig für den Parasiten bei einer Infektion des Wirtes und könnten sich somit nicht durch natürliche Selektion durchsetzen. Dennoch sind *in vitro* selektierte Antimon-resistente Parasiten ein hilfreiches Werkzeug die Biologie der Leishmanien zu verstehen und auftretende Resistenzmechanismen zu untersuchen.

#### 5.2.4. NMT-C0074

Leishmanien sind auxothroph für Pteridine wie Pterine und Folate und müssen diese aus dem Metabolismus der Wirtszelle gewinnen. Pteridine und Pterine sind Derivate der Stammheterozyklen Pteridin und Pterin. Eine wichtige Molekülgruppe dieser Derivate sind die Folate, die essentiell für viele Stoffwechselwege in Zellen sind, insbesondere für das Zellwachstum. Daher stellen Pteridin-Analoga eine gute Möglichkeit dar, hemmend auf die Proliferation von Zellen, so auch Leishmanien, zu wirken. Ihre Wirksamkeit gegen intrazelluläre Leishmanien wurde bereits beschrieben (Mukhopadhyay, et al., 1989).

Antifolate werden ebenfalls für die Therapie von anderen parasitischen Infektionserkrankungen wie z.B. Malaria genutzt (Wilson und Edeson, 1953). In Leishmanien werden Pteridine durch die Dihydrofolat-Reduktase/Thymidylate-Synthase

(DHFR-TS) und die Pteridin-Reduktase1 (PTR1) umgesetzt (Vickers und Beverley, 2011). Ein bekannter DHFR-TS-Inhibitor mit Proliferations-hemmender Wirkung bei Leishmanien ist der Folat-Antagonist Methotrexat (MTX). Leishmanien können die Hemmung der DHFR-TS durch MTX jedoch durch die Aktivität der PTR1 teilweise kompensieren (Cunningham und Beverley, 2001). Erhöhte Mengen von PTR1 machen den Parasiten sogar resistent gegen MTX (Callahan und Beverley, 1992). Für eine effektive Hemmung des Pteridin-Metabolismus in Leishmanien wird daher eine Kombination von DHFR-TS und PTR1-Inhibitoren benötigt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Leitstruktur NMT-C0074 ist ein PTR1-Inhibitor.

#### **5.2.4.1. Erfolgreiche *in vitro* Selektion von NMT-C0074-resistenten Promastigoten**

Bei der *in vitro* Selektion unter NMT-C0074 ( $IC_{50}$  und nachfolgend unter  $IC_{75}$ ) konnten sowohl für *L.don*BPK091[pcos190] als auch für *L.don* 1SR resistente Promastigote selektiert werden (Abb.7+13).

Die *in vitro* Selektion mit Pteridin-Anatagonisten auf resistente Leishmanien wurde auch schon von anderen Gruppen gezeigt (Beverley, et al., 1984, Ritt, et al., 2013). Auch in anderen Organismen sind Resistenzen gegen DHFR-TS-Inhibitoren bekannt. Greenberg and Bond konnten bereits 1956 zeigen, dass Plasmodien durch die *in vitro* Selektion unter Pyrimidin-Derivaten resistent wurden (Greenberg und Bond, 1956). Ein weiteres Beispiel ist die MTX-Resistenz in humanen Krebszelllinien. Dabei sind eine verminderte Aufnahme von MTX, ebenso wie eine gesteigerte Aktivität und Menge der DHFR für die Resistenz verantwortlich (Cowan, et al., 1982, Ohnoshi, et al., 1982, Todd, et al., 1982).

Dies zeigt, dass die Entwicklung einer Resistenz gegen Pteridin-Analoga eine gängige Reaktion von Organismen auf die Einwirkung dieser Substanzen ist und nicht nur in Leishmanien auftritt.

#### **5.2.4.2. NMT-C0074-Resistenz vermittelt in Promastigoten keine Kreuzresistenzen**

Die Behandlung der NMT-C0074-resistenten Leishmanien mit den  $IC_{50}$  der anderen Leitstrukturen zeigte keine Kreuzresistenz (Abb.10+15). Die beobachtete Resistenz ist somit spezifisch für NMT-C0074.

Für Methotrexat-resistente Leishmanien wurden schwache Kreuzresistenzen gegen Primaquin (anti-Malaria-Wirkstoff) und Terbinafin (Antimykotikum) beschrieben, jedoch keine Kreuzresistenzen gegen Miltefosin oder Antimon (Ellenberger und Beverley, 1989). Es wäre sicher interessant gewesen, zu prüfen, ob die NMT-C0074-resistenten Promastigoten auch gegen Methotrexat oder Pyrimethamin resistent sind.

### 5.2.4.3. Genetische Grundlagen der NMT-C0074-Resistenz

Bei der Selektion von *L.don*BPK091[pcos190] unter  $IC_{75}$  NMT-C0074 wurden in beiden biologischen Proben Cosmide angereichert, die einen Bereich auf Chromosom 6 (Abb.8 E+F) abdecken.

In diesem Bereich befindet sich unter anderem das für die DHFR-TS codierende Gen (LinJ.06.0890). Diese Ergebnis legt nahe, dass die zusätzlichen extrachromosomalen DHFR-TS-Genkopien zum Überleben der Parasiten bei hohen Konzentrationen von NMT-C0074 beitragen. Grund zu dieser Annahme gibt die Beobachtung der verstärkten Expression der DHFR-TS in Methotrexat-resistenten Leishmanien (Coderre, et al., 1983, Washtien, et al., 1985). Diese Annahme könnte durch eine gezielte Überexpression von DHFR-TS in den Leishmanien und einer anschließenden Behandlung der Zellen mit NMT-C0074 überprüft werden.

Cunningham and Beverley (2001) zeigten, dass die PTR1 die Funktion der DHFR-TS teilweise übernehmen kann, wenn diese durch Inhibitoren gehemmt wird. Wahrscheinlich kann die DHFR-TS umgekehrt die Funktion der PTR1 übernehmen, wenn diese gehemmt wird. Dies bleibt jedoch durch weitere Experimente zu klären.

Bislang wurden keine Resistenzen gegen PTR1-Inhibitoren in Leishmanien beschrieben. Mögliche Ursachen für die Entstehung von Resistenzen gegen Pteridin-Inhibitoren könnten teilweise aus dem verwandten Folat-Stoffwechselweg abgeleitet werden. Für eine MTX-Resistenz wurden verschiedene Wege beschrieben: Eine verminderte Aufnahme von Methotrexat über den MTX-Transporter, eine Amplifikation des DHFR-TS codierenden Gens und die daraus resultierende Überexpression der DHFR-TS durch die extrachromosomale Amplifikation der H-DNA-Region (Papadopoulou, et al., 1992) (Callahan und Beverley, 1992). PTR1 ist das Methotrexat-Resistenz-vermittelnde Gen auf den H-DNA-Regionen, die Leishmanien bei der Selektion unter Methotrexat amplifizieren (Bello, et al., 1994). Auch für Trypanosomen sind z.T. gleiche Wege zur Entwicklung einer Methotrexat-Resistenz beschrieben. Methotrexat-resistente *T. brucei* zeigten einen

verminderten Transport von Methotrexat in die Zellen (Dewar, et al., 2016). In *T. cruzi* korrelierte die Expression von PTR1 mit der Methotrexat-Resistenz der Zellen ( Robello, et al., 1997).

Eine genomweiten Analyse von genetischen Veränderungen der spontan NMT-C0074-resistenten *L.don* 1SR unter NMT-C0074-Selektion ist zur Zeit noch in Arbeit, so dass nichts über weitere Resistenz-vermittelnde genetische Marker bekannt ist.

Wie erwartet wurden in den spontan NMT-C0074-resistenten *L.don* 1SR keine Mutationen in dem Miltefosin-Transporter gefunden (Abb. 18), die bei den Miltefosin-Derivaten für die Resistenz gegen die Leitstrukturen verantwortlich sind. Als Pteridin-Derivat wird NMT-C0074 vermutlich auch über Pteridin- oder Folat-Transporter von den Parasiten aufgenommen (Lemley, et al., 1999). Tatsächlich zeigten sich in der genomweiten Sequenzanalyse Mutationen in drei Transporter-Genen, die Aminosäure-Austausche bedingen. Eine Funktionsanalyse dieser Mutanten steht z.Zt. noch aus.

#### **5.2.4.4. Spontan NMT-C0074-resistente *L.don* zeigen SNPs in Folat-Transportern**

Im *Leishmania*-Genom wurde mehreren Genen eine Transportfunktion für Pteridine, zu denen auch Biopterin und Folate zählen, zugeschrieben. Die Analyse dieser Pteridin- und Biopterin/Folat-Transporter zeigte in den spontan NMT-C0074-resistenten *L. don* Sequenzabweichungen. Es wurden SNPs in drei Protein-kodierenden Sequenzen beobachtet, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. In beiden unter NMT-C0074 selektierten Proben wurde für das Gen LinJ.10.0410 Mutationen gefunden, die zu einer Aminosäure-Sequenz-Veränderung an Position 416 (Thr416Ala) führen. Der Austausch einer polaren Aminosäure, Threonin, gegen eine unpolare Aminosäure, Alanin, ist geeignet, Funktionsveränderungen auszulösen. In LinJ.10.0400 konnten gleich mehrere SNPs beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass es sich um ein hoch variable Gen-Region handelt. Für den in Leishmanien wichtigen Folat-Transporter (FT1) konnte bereits gezeigt werden, dass Punktmutationen zu einer verringerten Aktivität des Transporters führten können. Dridi et al. ersetzten gezielt konservierte Aminosäuren in der Transporter-Sequenz und zeigten direkte Auswirkungen auf die Sensitivität der Parasiten gegen Methotrexat. Ebenso konnte dabei gezeigt werden, dass eine unveränderte Ladung der Seitenketten der Aminosäuren für die Stabilität und Funktion des FT1 wichtig war (Dridi, et al., 2010).

Für LinJ.10.0400 wurden ebenfalls mehrere Basen-Austausche beobachtet, die in der Aminosäure-Sequenz an Position 310 zum Austausch von Asparaginsäure zu Glycin führen. Bei dieser Substitution handelt es sich um den Austausch einer sauren Aminosäure gegen eine neutrale Aminosäure; auch dies kann zum Aktivitätsverlust des putativen Transporters führen.

Auch für murine Zellen wurde beschrieben, dass Mutationen in Folat-Transporter mit einem verminderten Import von Folaten korreliert und dass ein Erhalt der Ladungen der Aminosäuren-Seitenketten notwendig für den Transport von Folaten über die Membran war (Sharina, et al., 2001). Die Selektion von spontanen Resistenzen gegen Methotrexat in murinen Krebs-Zelllinien zeigte ebenfalls Aminosäure-Substitutionen im Folat-Transporter und ein damit einhergehende Resistenz gegen MTX (Zhao, et al., 1999). Dies verdeutlicht noch einmal, dass Mutationen in Pteridin-Transportern Resistenzen begründen können und nicht nur in Leishmanien auftreten.

#### **5.2.4.5. Erhöhte Infektiosität durch NMT-C0074-Resistenz**

Bei den Infektionsexperimenten mit murinen, primären Knochenmarksmakrophagen (BMMs) zeigten die NMT-C0074-resistenten *L.donBPK091[pcos190]* erhöhte Parasitenlasten. 48 h nach Beginn der Infektion war ein signifikanter Unterschied zu der nicht-resistenten Kontrolle zu beobachten (Abb.11).

Dieses Ergebnis unterscheidet die NMT-C0074-resistenten *L.donBPK091[pcos190]* deutlich von den anderen in dieser Arbeit selektierten Parasiten. Die Miltefosin-, NMT-A002- und Sb<sup>III</sup>-resistenten-*L.donBPK091[pcos190]* zeigten stets geringere Parasitenlasten in den BMMs im Vergleich zu den nicht-resistenten Kontrollen.

Dies legt nahe, dass die Mechanismen, die den Parasiten nach einer *in vitro* Selektion resistent gegen NMT-C0074 machen, sich auch verstärkend auf die Infektiosität auswirken. Es ist bekannt, dass sich *L.major* DHFR-TS—Nullmutanten nicht in murinen Makrophagen vermehren können (Titus, et al., 1995). Wenn die Abwesenheit der DHFR zu einer verminderten Infektiosität der Parasiten führt, könnten zusätzlichen Genkopien der DHFR-TS in den NMT-C0074-resistenten *L.donBPK091[pcos190]* für eine stärkere Infektiosität der Parasiten verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind jedoch weiterführenden Experimente nötig.

Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung der gesteigerten Infektiosität von Antimon-resistenten *L. donovani* in Infektionsexperimenten im Vergleich mit Antimon-sensitiven Parasiten (Carter, et al., 2005). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei der Infektion von BALB/c-Mäusen (Vanaerschot, et al., 2011). Die höhere Virulenz von resistenten Leishmanien kann auf die allgemein bessere Fitness der Parasiten zurückgeführt werden. Durch den Selektionsdruck wachsen in der resistenten *Leishmania*-Population die Parasiten heran, die sich am schnellsten und besten an die neuen Bedingungen anpassen können (Vanaerschot et al., 2010).

Um das Gen, das unter dem Selektionsdruck von NMT-C0074 für eine bessere Fitness des Parasiten verantwortlich ist zu identifizieren, sollen die Gene, die auf dem aus NMT-C0074-resistenten *L.don*BPK091[pcos190] isolierten Cosmid liegen, einzeln durch Überexpression und Phänotypanalysen untersucht werden. Dieses Projekt wird Teil einer geplanten Dissertation.

Eine interessante Beobachtung wurde bei den Infektionsexperimenten mit den spontan-NMT-C0074-resistenten *L.don* 1SR gemacht. Hier zeigte nur die biologische Probe 1 signifikant erhöhte Parasitenlasten in in vitro Infektionsexperimenten (Abb.16).

Diese Ergebnis steht im Kontrast zum zuvor beschriebenen Ergebnis der Infektionsexperimente mit NMT-C0074-resistenten *L.don*BPK091[pcos190]. Die spontane Resistenz der *L.don* 1SR gegen NMT-C0074 liegt hier vermutlich nicht in der höheren Fitness des Parasiten begründet. Eine mögliche Erklärung könnten die verschiedenen Selektionsverfahren zur Erzeugung der resistenten Parasiten liefern. Während bei der Selektion einer Cosmid-Genbank tragenden *Leishmania*-Population Parasiten mit dominanten Merkmalen selektiert werden, können sich bei der Selektion von *wildtyp*-Zellen auch rezessive Resistenzmerkmale in der Population durchsetzen.

Da die Parasiten beider biologischen *L. don* Proben resistent gegen NMT-C0074 sind, wäre es interessant die genetischen Unterschiede der beiden Proben genauer zu analysieren.

#### **5.2.4.6. Resistenz gegen NMT-C0074 von *L.don*BPK091[pcos190] bleibt auch in intrazellulären Amastigoten erhalten**

Um zu prüfen ob die NMT-C0074-resistenten Parasiten auch als intrazelluläre Amastigoten resistent gegen NMT-C0074 sind, wurden BMMs mit NMT-C0074-resistenten

*L.don*BPK091[pcos190] infiziert und anschließend mit NMT-C0074 behandelt. Es konnte keine signifikante Reduktion der Parasitenlast beobachtet werden (Abb.12). Im Gegensatz zu den Resistenzen gegen die anderen Leitstrukturen, die im Rahmen dieser Arbeit in *L.don*BPK091[pcos190] erzeugt wurden, konnte nur die NMT-C0074-Resistenz im amastigoten Stadium beobachtet werden. In der Literatur wurden Miltefosin-resistente *L. donovani* Promastigoten beschrieben, die auch als intrazelluläre Amastigoten resistent gegen Miltefosin waren (Seifert et al., 2007). Diesen Ergebnissen kommt eine gewichtige Bedeutung zu, da bei einer Leishmaniose die Amastigote und damit die pathogene Lebensform mit dem Wirkstoff behandelt werden muss. Eine Wirksamkeit der Wirkstoffe gegen intrazelluläre Amastigoten unter Vermeidung von möglichen auftretenden Resistenzen ist daher besonders wichtig für die Entwicklung von Medikamenten.

#### **5.2.4.7. Spontane Resistenz NMT-C0074 bleibt nicht in intrazellulären Amastigoten erhalten**

Bei der Behandlung von murinen, primären Makrophagen, die mit spontan NMT-C0074-resistenten *L.don* 1SR infiziert waren, konnte eine signifikante Reduktion der Parasitenlast beobachtet werden (Abb.X). Die spontan NMT-C0074-resistenten Parasiten waren im Stadium der intrazellulären Amastigoten wieder sensitiv gegenüber NMT-C0074. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem mit den Cosmid-Genbank tragenden *L.don*BPK091, die resistent gegen NMT-C0074 waren und verdeutlicht den Unterschied zwischen der Selektion einer Cosmid-Genbank-tragenden *Leishmania* Population oder der Selektion *wildtyp*-Zellen auf eine spontane Resistenz. In beiden Fällen konnten resistente Promastigoten erzeugt werden, jedoch vermutlich mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen und damit Auswirkungen auf den Parasiten im intrazellulären amastigoten Stadium.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass NMT-C0074 das gleiche Potential besitzt in *Leishmania*-Promastigoten Resistenzen zu induzieren, wie Miltefosin und die Miltefosin-Derivate. Obwohl die spontane Resistenz gegen NMT-C0074 keine Auswirkungen auf die Infektiosität der intrazellulären Amastigoten oder ihre Sensitivität gegenüber NMT-C0074 zu beobachten war, zeigten die NMT-C0074-resistenten *L.don*BPK091[pcos190] eine erhöhte Infektiosität und eine verminderte Sensitivität der intrazellulären Amastigoten gegen die Behandlung mit NMT-C0074. Dies zeigt ein Risiko

nach einer systematischen Behandlung von Patienten mit NMT-C0074 resistente Leishmanien gegen diese Leitstruktur zu selektieren. Daher ist der Einsatz dieser Leitstruktur als Wirkstoff gegen Leishmaniose in diesem Stadium nicht sinnvoll. Eine mögliche Verwendung ist der Einsatz in der Kombinationstherapie. Durch die zusätzliche Gabe eines weiteren Wirkstoffes kann das Risiko der Selektion resistenter Parasiten vermindert werden.

### **5.2.5. NMT-H0080**

NMT-H0080 ist ein Flavonoid-Derivat (Borsari, et al., 2016). Flavonoide sind eine Gruppe aromatischer Verbindungen, die in Pflanzen zum Großteil im Blütenfarbstoff vorkommen und an vielen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind. Flavonoide haben eine anti-parasitische Wirkung, die gegen intrazelluläre *Leishmania* sowohl *in vitro* als auch in Maus-Infektionsexperimenten gezeigt wurde (Tasdemir, Kaiser et al. 2006) (Fonseca-Silva, Inacio et al. 2016). Aber auch gegen Parasiten wie Trypanosomen und Plasmodien können Flavonoide eingesetzt werden (Weniger, et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden *L.don*BPK091[pcos190] Promastigoten mit NMT-H0080 selektiert. Cosmide, die unter dem Selektionsdruck in den NMT-H0080-resistenten Parasiten angereichert wurden, wurden zur Identifikation der dominanten genetischen Marker analysiert.

#### **5.2.5.1. *In vitro* Selektion von NMT-H0080-resistenten Leishmanien nur unter IC<sub>50</sub> möglich**

Bei der Selektion von *L.don*BPK091[pcos190] konnten nur unter IC<sub>50</sub> NMT-H0080-resistente Promastigoten selektiert werden (Abb.7,B). Verglichen mit den Parasiten, die gegen andere Leitstrukturen resistent waren, war das Wachstum der NMT-H0080-resistenten Parasiten meist langsamer. Unter IC<sub>75</sub> konnten keine resistenten Parasiten kultiviert werden (Abb.7,C).

Die beobachtete Resistenz gegen NMT-H0080 war konzentrationsabhängig. Höhere Konzentrationen von NMT-H0080 konnten von den unter IC<sub>50</sub> selektierten Parasiten nicht mehr toleriert werden. Möglicherweise wird die Hemmung des Wachstums durch den Überschuss an NMT-H0080 erreicht. Es scheint sich um einen NMT-H0080-

unspezifischen Resistenzmechanismus zu handeln, der kompensatorisch wirkt, aber bei zu hohen Konzentrationen von NMT-H0080 diese Funktion nicht mehr aufrecht erhalten kann. Um eine genaue Aussage über die zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen treffen zu können, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

### 5.2.5.2. Genetische Grundlagen der NMT-H0080 Resistenz

Die Selektion der *L.don*BPK091[pcos190] mit NMT-H0080 unter  $IC_{50}$  führte zur Anreicherung eines Cosmids, das einen Bereich von Chromosom 36 abdeckt (Abb.8, G). In diesem Bereich auf Chromosom 36 befindet sich unter anderem das Gen LinJ.36.6970. Das Genprodukt wird auf Grund seiner Homologie zu den Methyltransferasen gezählt. Über die tatsächliche Funktion des Proteins in Leishmanien ist bislang jedoch noch nichts bekannt.

Ein Zusammenhang von resistenten Parasiten und der Funktion von Methyltransferasen ist aus der Literatur abzuleiten. Das Fehlen von alkylierten Sterolen in der Membran von Amphotericin-B-resistenten *L. donovani* korreliert mit der verminderten Expression ebenso wie die Expression einer veränderten mRNA der S-Adenosyl-L-Methionin:C-24-Delta-Sterol-Methyltransferase (Pourshafie, et al., 2004). Möglicherweise spielen hier auch die Extrakopien von LinJ.36.6970 bei der Resistenz gegen NMT-H0080 eine Rolle. Dies müsste durch weiterführende Experimente geprüft werden.

Flavonoide sind eine Wirkstoffklasse mit einer hohen Diversität und damit sehr unterschiedlichen Wirkweisen. In Leishmanien können Flavonoide das Wachstum der Parasiten durch ihre Bindung an P-Glykoprotein-ähnliche Transporter hemmen (Perez-Victoria, Chiquero et al. 1999). P-Glykoproteine sind ABC-Transporter und wurden in humanen Krebszelllinien durch Flavonoide inhibiert (Di Pietro, Conseil et al. 2002). Durch die Überexpression der Transporter können Resistenzen gegen Flavonoide entstehen (Di Pietro, Conseil et al. 2002). Ein weiterer anti-parasitärer Mechanismus von Flavonoiden ist die Induktion der *reactive oxygen species* (ROS), die das Mitochondrion des Parasiten schädigen und so zum Absterben der Zelle führen (Fonseca-Silva, Canto-Cavalheiro et al. 2015).

Da die Selektion von NMT-H0080-resistenten Leishmanien nur unter  $IC_{50}$  erfolgreich war, wurden die Parasiten nicht in die vergleichenden Infektionsexperimente mit den anderen unter  $IC_{75}$  selektierten Parasiten mit einbezogen. Daher kann hier keine Aussage über die

Auswirkungen einer NMT-H0080-Resistenz auf die Infektiosität der Parasiten gemacht werde. Verglichen mit den anderen hier getesteten Leitstrukturen zeigte NMT-H0080 jedoch das geringste Potential eine Resistenz in Leishmanien zu induzieren, was ein großer Vorteil für eine therapeutische Anwendung von NMT-H0080 ist.

### **Fazit**

Der Vergleich der in dieser Arbeit getesteten Leitstrukturen NMT-A001, NMT-A002, NMT-C0074 und NMT-H0080 mit den bereits bekannten Wirkstoffen Miltefosin und Antimon ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) zeigte nur für NMT-H0080 ein geringeres Potential zur Induktion der Resistenzbildung. Unter diesem Gesichtspunkt war NMT-H0080 die Leitstruktur mit dem vielversprechendsten Anwendungspotential.

Nur für die NMT-C0074-resistenten Parasiten war eine erhöhte Infektiosität und auch eine Übertragung der Resistenz auf das Amastigoten Stadium zu beobachten. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Verwendung dieser Leitstruktur.

Die Miltefosin-Derivate NMT-A001 und NMT-A002 zeigen nahezu das gleiche Potential bei der Induktion von Resistenzen in Leishmanien wie Miltefosin, nur bei spontan-NMT-A002-resistenten Parasiten konnte ein unbeeinträchtigte Infektiosität beobachtet werden

## 6. Literaturverzeichnis

- F. Aguilar-Torrentera und Y. Carlier (2001). Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. *Rev Latinoam Microbiol* 43, 135-142.
- J. Alvar, I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer und W. H. O. L. C. Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
- J. Alvar, S. Yactayo und C. Bern (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22, 552-557.
- Ashutosh, M. Garg, S. Sundar, R. Duncan, H. L. Nakhasi und N. Goyal (2012). Downregulation of mitogen-activated protein kinase 1 of *Leishmania donovani* field isolates is associated with antimony resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 518-525.
- S. Azzouz, M. Maache, R. G. Garcia und A. Osuna (2005). Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96, 60-65.
- A. R. Bello, B. Nare, D. Freedman, L. Hardy und S. M. Beverley (1994). PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11442-11446.
- N. Berhe, D. Wolday, A. Hailu, Y. Abraham, A. Ali, T. Gebre-Michael, P. Desjeux, A. Sonnerborg, H. Akuffo und S. Britton (1999). HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS* 13, 1921-1925.
- D. Berkovic, D. Haase, W. Hiddemann und E. A. Fleer (1996). Induction of resistance in the human leukemia cell line HL60 towards hexadecylphosphocholine and other ether phospholipid analogues. *J Exp Ther Oncol* 1, 368-375.
- D. Berkovic, S. Sievers, D. Haase, E. A. Fleer und C. Binder (2002). Effects of hexadecylphosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylserine metabolism in human lymphoma cells. *J Exp Ther Oncol* 2, 85-92.
- S. M. Beverley, J. A. Coderre, D. V. Santi und R. T. Schimke (1984). Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* 38, 431-439.
- E. Bifeld, P. Tejera Nevado, J. Bartsch, J. Eick und J. Clos (2016). A versatile qPCR assay to quantify trypanosomatid infections of host cells and tissues. *Med Microbiol Immunol* 205, 449-458.
- C. Borsari, R. Luciani, C. Pozzi, I. Poehner, S. Henrich, M. Trande, A. Cordeiro-da-Silva, N. Santarem, C. Baptista, A. Tait, F. Di Pisa, L. Dello Iacono, G. Landi, S. Gul, M. Wolf, M. Kuzikov, B. Ellinger, J. Reinshagen, G. Witt, P. Gribbon, M. Kohler, O. Keminer, B. Behrens, L. Costantino, P. Tejera Nevado, E. Bifeld, J. Eick, J. Clos, J. Torrado, M. D. Jimenez-Anton, M. J. Corral, J. M. Alunda, F. Pellati, R. C. Wade, S. Ferrari, S. Mangani und M. P. Costi (2016). Profiling of Flavonol

- Derivatives for the Development of Antitrypanosomatidic Drugs. *Journal of medicinal chemistry* 59, 7598-7616.
- S. BoseDasgupta, B. B. Das, S. Sengupta, A. Ganguly, A. Roy, S. Dey, G. Tripathi, B. Dinda und H. K. Majumder (2008). The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalin: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'. *Cell death and differentiation* 15, 1629-1640.
- C. Britto, C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pages, J. P. Dedet und P. Wincker (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222, 107-117.
- C. Brochu, A. Haimeur und M. Ouellette (2004). The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *leishmania*. *Cell Stress Chaperones* 9, 294-303.
- A. Bryceson (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* 6, 928-934.
- H. L. Callahan und S. M. Beverley (1992). A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem* 267, 24165-24168.
- H. L. Callahan, W. L. Roberts, P. M. Rainey und S. M. Beverley (1994). The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* 68, 145-149.
- M. Ceccarelli, L. Galluzzi, A. Diotallevi, F. Andreoni, H. Fowler, C. Petersen, F. Vitale und M. Magnani (2017). The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania (L.) infantum* and *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasites & vectors* 10, 239.
- K. Choudhury, D. Zander, M. Kube, R. Reinhardt und J. Clos (2008). Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *Int J Parasitol* 38, 1411-1423.
- J. Clos und K. Choudhury (2006). Functional cloning as a means to identify *Leishmania* genes involved in drug resistance. *Mini Rev Med Chem* 6, 123-129.
- J. A. Coderre, S. M. Beverley, R. T. Schimke und D. V. Santi (1983). Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2132-2136.
- B. S. Codonho, S. Costa Sdos, F. Peloso Ede, P. P. Joazeiro, F. R. Gadelha und S. Giorgio (2016). HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 0, 0.
- A. C. Coelho, S. M. Beverley und P. C. Cotrim (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 130, 83-90.

- A. C. Coelho, S. Boisvert, A. Mukherjee, P. Leprohon, J. Corbeil und M. Ouellette (2012). Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1512.
- S. Cojean, S. Houze, D. Haouchine, F. Huteau, S. Lariven, V. Hubert, F. Michard, C. Bories, F. Pratlong, J. Le Bras, P. M. Loiseau und S. Matheron (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis* 18, 704-706.
- K. H. Cowan, M. E. Goldsmith, R. M. Levine, S. C. Aitken, E. Douglass, N. Clendeninn, A. W. Nienhuis und M. E. Lippman (1982). Dihydrofolate reductase gene amplification and possible rearrangement in estrogen-responsive methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 257, 15079-15086.
- S. L. Croft, R. A. Neal, W. Pendergast und J. H. Chan (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 36, 2633-2636.
- S. L. Croft, S. Sundar und A. H. Fairlamb (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.
- A. Cuesta-Marban, J. Botet, O. Czyz, L. M. Cacharro, C. Gajate, V. Hornillos, J. Delgado, H. Zhang, F. Amat-Guerri, A. U. Acuna, C. R. McMaster, J. L. Revuelta, V. Zaremberg und F. Mollinedo (2013). Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast. *J Biol Chem* 288, 8405-8418.
- M. L. Cunningham und S. M. Beverley (2001). Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* 113, 199-213.
- S. Danhauser-Riedl, A. Himmelmann, G. Steinhäuser, R. Busch, W. R. Vogler, J. Rastetter und W. E. Berdel (1990). Cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine in neoplastic cell lines including drug-resistant sublines in vitro. *J Lipid Mediat* 2, 271-280.
- R. N. Davidson, L. di Martino, L. Gradoni, R. Giacchino, G. B. Gaeta, R. Pempinello, S. Scotti, A. Cascio, E. Castagnola, A. Maisto, M. Gramiccia, D. di Caprio, R. J. Wilkinson und A. D. Bryceson (1996). Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis* 22, 938-943.
- S. Decuypere, S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis und J. C. Dujardin (2005). Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4616-4621.
- D. K. Deep, R. Singh, V. Bhandari, A. Verma, V. Sharma, S. Wajid, S. Sundar, V. Ramesh, J. C. Dujardin und P. Salotra (2017). Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005641.
- S. Dewar, N. Sienkiewicz, H. B. Ong, R. J. Wall, D. Horn und A. H. Fairlamb (2016). The Role of Folate Transport in Antifolate Drug Action in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 291, 24768-24778.

- S. Dey, B. Papadopoulou, A. Haimeur, G. Roy, K. Grondin, D. Dou, B. P. Rosen und M. Ouellette (1994). High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 67, 49-57.
- A. Dostalova und P. Volf (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* 5, 276.
- L. Dridi, A. Haimeur und M. Ouellette (2010). Structure-function analysis of the highly conserved charged residues of the membrane protein FT1, the main folic acid transporter of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem Pharmacol* 79, 30-38.
- H. Eibl und C. Unger (1990). Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat Rev* 17, 233-242.
- K. El Fadili, N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Legare und M. Ouellette (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1988-1993.
- T. E. Ellenberger und S. M. Beverley (1989). Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 264, 15094-15103.
- M. Ephros, E. Waldman und D. Zilberstein (1997). Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1064-1068.
- S. Ferrari, F. Morandi, D. Motiejunas, E. Nerini, S. Henrich, R. Luciani, A. Venturelli, S. Lazzari, S. Calo, S. Gupta, V. Hannaert, P. A. Michels, R. C. Wade und M. P. Costi (2011). Virtual screening identification of nonfolate compounds, including a CNS drug, as antiparasitic agents inhibiting pteridine reductase. *Journal of medicinal chemistry* 54, 211-221.
- E. A. Fleer, D. Berkovic, U. Grunwald und W. Hiddemann (1996). Induction of resistance to hexadecylphosphocholine in the highly sensitive human epidermoid tumour cell line KB. *Eur J Cancer* 32A, 506-511.
- A. C. Freydank, W. Brandt und B. Drager (2008). Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins* 72, 173-183.
- F. Frezard, C. Demicheli, C. S. Ferreira und M. A. Costa (2001). Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 913-916.
- D. Fu, Z. Shi und Y. Wang (1999). Bcl-2 plays a key role instead of mdr1 in the resistance to hexadecylphosphocholine in human epidermoid tumor cell line KB. *Cancer Lett* 142, 147-153.
- J. D. Fulton und L. P. Joyner (1949). Studies on protozoa; the metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 43, 273-286, pl.
- R. Garcia-Hernandez, V. Gomez-Perez, S. Castanys und F. Gamarro (2015). Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003704.

- M. Garg und N. Goyal (2015). MAPK1 of *Leishmania donovani* modulates antimony susceptibility by downregulating P-glycoprotein efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 3853-3863.
- E. Gazanion, C. Fernandez-Prada, B. Papadopoulou, P. Leprohon und M. Ouellette (2016). Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E3012-3021.
- W. R. Gimode, D. M. Kiboi, F. T. Kimani, H. N. Wamakima, M. W. Burugu und F. W. Muregi (2015). Fitness cost of resistance for lumefantrine and piperazine-resistant *Plasmodium berghei* in a mouse model. *Malar J* 14, 38.
- B. Gourbal, N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen und R. Mukhopadhyay (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279, 31010-31017.
- S. J. Green, M. S. Meltzer, J. B. Hibbs, Jr. und C. A. Nacy (1990). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144, 278-283.
- J. Greenberg und H. W. Bond (1956). Further studies on cross-resistance between pyrimethamine and related compounds. *Am J Trop Med Hyg* 5, 14-18.
- A. Haimeur, C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou und M. Ouellette (2000). Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 108, 131-135.
- A. Haimeur und M. Ouellette (1998). Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1689-1694.
- S. Hendrickx, A. Mondelaers, E. Eberhardt, L. Lachaud, P. Delputte, P. Cos und L. Maes (2015). Intracellular amastigote replication may not be required for successful in vitro selection of miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 114, 2561-2565.
- C. H. Hochhuth, K. Vehmeyer, H. Eibl und C. Unger (1992). Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. *Cell Immunol* 141, 161-168.
- A. Hombach, G. Ommen, A. MacDonald und J. Clos (2014). A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. *J Cell Sci* 127, 4762-4773.
- A. Hubel, S. Krobitsch, A. Horauf und J. Clos (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 17, 5987-5995.
- I. Y. Iourov, S. G. Vorsanova und Y. B. Yurov (2008). Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet* 1, 26.
- A. C. Ivens, C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E.

- Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell und P. J. Myler (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- F. Jeddi, C. Mary, K. Aoun, Z. Harrat, A. Bouratbine, F. Faraut, R. Benikhlef, C. Pomares, F. Pratlong, P. Marty und R. Piarroux (2014). Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4866-4874.
- J. M. Jimenez-Lopez, P. Rios-Marco, C. Marco, J. L. Segovia und M. P. Carrasco (2010). Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis* 9, 33.
- J. M. Kelly, P. Das und A. M. Tomas (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.
- S. Khademvatan, M. J. Gharavi, F. Rahim und J. Saki (2011). Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L. tropica* strains. *Korean J Parasitol* 49, 17-23.
- S. Krobitsch, S. Brandau, C. Hoyer, C. Schmetz, A. Hubel und J. Clos (1998). *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem* 273, 6488-6494.
- S. Krobitsch und J. Clos (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4, 191-198.
- A. Kuhlencord, T. Maniera, H. Eibl und C. Unger (1992). Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1630-1634.
- M. N. Laffitte, P. Leprohon, B. Papadopoulou und M. Ouellette (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res* 5, 2350.
- T. Laskay, G. van Zandbergen und W. Solbach (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11, 210-214.
- C. Lemley, S. Yan, V. S. Dole, R. Madhubala, M. L. Cunningham, S. M. Beverley, P. J. Myler und K. D. Stuart (1999). The *Leishmania donovani* LD1 locus gene ORFG encodes a bipterin transporter (BT1). *Mol Biochem Parasitol* 104, 93-105.
- E. N. Loria-Cervera und F. J. Andrade-Narvaez (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56, 1-11.

- M. Maarouf, F. Lawrence, S. Brown und M. Robert-Gero (1997). Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol Res* 83, 198-202.
- G. Mandal, A. Sarkar, P. Saha, N. Singh, S. Sundar und M. Chatterjee (2009). Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. *Indian J Biochem Biophys* 46, 86-92.
- A. Mannaert, T. Downing, H. Imamura und J. C. Dujardin (2012). Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends Parasitol* 28, 370-376.
- N. Marquis, B. Gourbal, B. P. Rosen, R. Mukhopadhyay und M. Ouellette (2005). Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 57, 1690-1699.
- M. L. Metzker (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31-46.
- M. K. Mittal, S. Rai, Ashutosh, Ravinder, S. Gupta, S. Sundar und N. Goyal (2007). Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 76, 681-688.
- A. Mondelaers, M. P. Sanchez-Canete, S. Hendrickx, E. Eberhardt, R. Garcia-Hernandez, L. Lachaud, J. Cotton, M. Sanders, B. Cuypers, H. Imamura, J. C. Dujardin, P. Delputte, P. Cos, G. Caljon, F. Gamarro, S. Castanys und L. Maes (2016). Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLoS One* 11, e0154101.
- W. Moreira, P. Leprohon und M. Ouellette (2011). Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis* 2, e201.
- A. Mukherjee, S. Boisvert, R. L. Monte-Neto, A. C. Coelho, F. Raymond, R. Mukhopadhyay, J. Corbeil und M. Ouellette (2013). Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 88, 189-202.
- A. Mukhopadhyay, G. Chaudhuri, S. K. Arora, S. Sehgal und S. K. Basu (1989). Receptor-mediated drug delivery to macrophages in chemotherapy of leishmaniasis. *Science* 244, 705-707.
- R. Mukhopadhyay, S. Dey, N. Xu, D. Gage, J. Lightbody, M. Ouellette und B. P. Rosen (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10383-10387.
- M. I. Muniz-Junqueira und V. N. de Paula-Coelho (2008). Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol* 8, 1633-1638.
- F. Munoz-Martinez, C. Torres, S. Castanys und F. Gamarro (2008). The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1778, 530-540.

- H. W. Murray, J. D. Berman, C. R. Davies und N. G. Saravia (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- B. Nare, L. W. Hardy und S. M. Beverley (1997). The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* 272, 13883-13891.
- A. Nuhs, C. Schafer, D. Zander, L. Trube, P. Tejera Nevado, S. Schmidt, J. Arevalo, V. Adai, L. Maes, J. C. Dujardin und J. Clos (2014). A novel marker, ARM58, confers antimony resistance to *Leishmania* spp. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4, 37-47.
- T. Ohnoshi, T. Ohnuma, I. Takahashi, K. Scanlon, B. A. Kamen und J. F. Holland (1982). Establishment of methotrexate-resistant human acute lymphoblastic leukemia cells in culture and effects of folate antagonists. *Cancer Res* 42, 1655-1660.
- M. Ouellette, D. Legare, A. Haimeur, K. Grondin, G. Roy, C. Brochu und B. Papadopoulou (1998). ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat* 1, 43-48.
- R. Panatala, H. Hennrich und J. C. Holthuis (2015). Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. *J Cell Sci* 128, 2021-2032.
- B. Papadopoulou und M. Ouellette (1993). Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene in methotrexate resistant *Leishmania*. *Adv Exp Med Biol* 338, 559-562.
- B. Papadopoulou, G. Roy und M. Ouellette (1992). A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J* 11, 3601-3608.
- C. Paris, P. M. Loiseau, C. Bories und J. Breard (2004). Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 852-859.
- C. S. Peacock, K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith und M. Berriman (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- F. J. Perez-Victoria, S. Castanys und F. Gamarro (2003a). *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2397-2403.
- F. J. Perez-Victoria, S. Castanys und F. Gamarro (2003a). *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 2397-2403.
- F. J. Perez-Victoria, F. Gamarro, M. Ouellette und S. Castanys (2003b). Functional Cloning of the Miltefosine Transporter: A NOVEL P-TYPE PHOSPHOLIPID TRANSLOCASE FROM LEISHMANIA INVOLVED IN DRUG RESISTANCE. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49965-49971.

- F. J. Perez-Victoria, M. P. Sanchez-Canete, S. Castanys und F. Gamarro (2006a). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 281, 23766-23775.
- J. M. Perez-Victoria, F. Cortes-Selva, A. Parodi-Talice, B. I. Bavchvarov, F. J. Perez-Victoria, F. Munoz-Martinez, M. Maitrejean, M. P. Costi, D. Barron, A. Di Pietro, S. Castanys und F. Gamarro (2006b). Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3102-3110.
- J. M. Perez-Victoria, F. J. Perez-Victoria, A. Parodi-Talice, I. A. Jimenez, A. G. Ravelo, S. Castanys und F. Gamarro (2001). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2468-2474.
- N. C. Peters, J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain und D. Sacks (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.
- M. Poot, L. L. Gibson und V. L. Singer (1997). Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* 27, 358-364.
- M. Pourshafie, S. Morand, A. Virion, M. Rakotomanga, C. Dupuy und P. M. Loiseau (2004). Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24-Delta-sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-Resistant promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2409-2414.
- M. Rakotomanga, M. Saint-Pierre-Chazalet und P. M. Loiseau (2005). Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2677-2686.
- J. F. Ritt, F. Raymond, P. Leprohon, D. Legare, J. Corbeil und M. Ouellette (2013). Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2564.
- C. Robello, P. Navarro, S. Castanys und F. Gamarro (1997). A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 90, 525-535.
- C. W. Roberts, R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance und L. J. Goad (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 126, 129-142.
- M. B. Rogers, J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler und J. C. Mottram (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* 21, 2129-2142.

- D. Rosenzweig, D. Smith, F. Opperdoes, S. Stern, R. W. Olafson und D. Zilberstein (2008). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22, 590-602.
- R. Ross (1903). Further Notes on Leishman's Bodies. *Br Med J* 2, 1401.
- M. Rybczynska, R. Liu, P. Lu, F. J. Sharom, E. Steinfelds, A. D. Pietro, M. Spitaler, H. Grunicke und J. Hofmann (2001). MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. *Br J Cancer* 84, 1405-1411.
- D. L. Sacks (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular microbiology* 3, 189-196.
- A. K. Saha, T. Mukherjee und A. Bhaduri (1986). Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 19, 195-200.
- A. Sanchez-Blanco, A. G. Rodriguez-Matellan, M. Reis-Sobreiro, B. Saenz-Narciso, J. Cabello, W. A. Mohler und F. Mollinedo (2014). *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle* 13, 3375-3389.
- M. P. Sanchez-Canete, L. Carvalho, F. J. Perez-Victoria, F. Gamarro und S. Castanys (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1305-1313.
- C. Schafer, P. Tejera Nevado, D. Zander und J. Clos (2014). Reduced antimony accumulation in ARM58-overexpressing *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1565-1574.
- K. Seifert, S. Matu, F. Javier Perez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro und S. L. Croft (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 22, 380-387.
- K. Seifert, F. J. Perez-Victoria, M. Stettler, M. P. Sanchez-Canete, S. Castanys, F. Gamarro und S. L. Croft (2007). Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 30, 229-235.
- I. G. Sharina, R. Zhao, Y. Wang, S. Babani und I. D. Goldman (2001). Mutational analysis of the functional role of conserved arginine and lysine residues in transmembrane domains of the murine reduced folate carrier. *Mol Pharmacol* 59, 1022-1028.
- N. Singh, M. Chatterjee und S. Sundar (2014). The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. *Parasit Vectors* 7, 596.
- S. Srivastava, J. Mishra, A. K. Gupta, A. Singh, P. Shankar und S. Singh (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & vectors* 10, 49.
- Y. Sterkers, L. Lachaud, L. Crobu, P. Bastien und M. Pages (2011). FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cellular microbiology* 13, 274-283.

- S. Sundar (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6, 849-854.
- S. Sundar und J. Chakravarty (2010). Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *J Glob Infect Dis* 2, 159-166.
- S. Sundar, L. B. Gupta, M. K. Makharia, M. K. Singh, A. Voss, F. Rosenkaimer, J. Engel und H. W. Murray (1999). Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol* 93, 589-597.
- S. Sundar, T. K. Jha, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson und J. Berman (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347, 1739-1746.
- S. Sundar und H. W. Murray (2005). Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ* 83, 394-395.
- S. Sundar und M. Rai (2002). Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 15, 593-598.
- X. Tang, M. S. Halleck, R. A. Schlegel und P. Williamson (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272, 1495-1497.
- P. Tejera Nevado, E. Bifeld, K. Hohn und J. Clos (2016). A Telomeric Cluster of Antimony Resistance Genes on Chromosome 34 of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 5262-5275.
- R. G. Titus, F. J. Gueiros-Filho, L. A. de Freitas und S. M. Beverley (1995). Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10267-10271.
- J. A. Todd, E. J. Modest, P. W. Rossow und Z. A. Tokes (1982). Liposome encapsulation enhancement of methotrexate sensitivity in a transport resistant human leukemic cell line. *Biochem Pharmacol* 31, 541-546.
- E. Torres-Guerrero, M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud und R. Arenas (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Res* 6, 750.
- K. G. Turner, P. Vacchina, M. Robles-Murguía, M. Wadsworth, M. A. McDowell und M. A. Morales (2015). Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003948.
- B. Ullman, E. Carrero-Valenzuela und T. Coons (1989). *Leishmania donovani*: isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostam)-resistant cell lines. *Exp Parasitol* 69, 157-163.
- M. Uno, Y. Koma, H. S. Ban und H. Nakamura (2012). Discovery of 1-[4-(N-benzylamino)phenyl]-3-phenylurea derivatives as non-peptidic selective SUMO-sentrin specific protease (SENP)1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 5169-5173.
- P. Vacchina, B. Norris-Mullins, M. A. Abengozar, C. G. Viamontes, J. Sarro, M. T. Stephens, M. E. Pfrender, L. Rivas und M. A. Morales (2016a). Genomic Appraisal of the Multifactorial Basis for In

- Vitro Acquisition of Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 4089-4100.
- P. Vacchina, B. Norris-Mullins, E. S. Carlson und M. A. Morales (2016b). A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in *Leishmania donovani*. *Parasites & vectors* 9, 621.
- W. J. van Blitterswijk und M. Verheij (2008). Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* 14, 2061-2074.
- W. J. van Blitterswijk und M. Verheij (2013). Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1831, 663-674.
- E. L. van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn und C. Thermes (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30, 418-426.
- G. van Zandbergen, M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach und T. Laskay (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-6525.
- M. Vanaerschot, S. De Doncker, S. Rijal, L. Maes, J. C. Dujardin und S. Decuypere (2011). Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased in vivo parasite burden. *PLoS One* 6, e23120.
- M. Vanaerschot, S. Decuypere, M. Berg, S. Roy und J. C. Dujardin (2013). Drug-resistant microorganisms with a higher fitness--can medicines boost pathogens? *Crit Rev Microbiol* 39, 384-394.
- M. Vanaerschot, I. Maes, M. Ouakad, V. Adai, L. Maes, S. De Doncker, S. Rijal, F. Chappuis, J. C. Dujardin und S. Decuypere (2010). Linking in vitro and in vivo survival of clinical *Leishmania donovani* strains. *PLoS One* 5, e12211.
- B. Vergnes, B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummelsmith und M. Ouellette (2007). A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6, 88-101.
- N. K. Verma und C. S. Dey (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3010-3015.
- T. J. Vickers und S. M. Beverley (2011). Folate metabolic pathways in *Leishmania*. *Essays in biochemistry* 51, 63-80.
- W. L. Washtien, R. Grumont und D. V. Santi (1985). DNA amplification in antifolate-resistant *Leishmania*. The thymidylate synthase-dihydrofolate reductase gene and abundant mRNAs. *J Biol Chem* 260, 7809-7812.
- A. Weingartner, B. Drobot, A. Herrmann, M. P. Sanchez-Canete, F. Gamarro, S. Castanys und T. Gunther Pomorski (2010). Disruption of the lipid-transporting LdMT-LdRos3 complex in *Leishmania donovani* affects membrane lipid asymmetry but not host cell invasion. *PLoS One* 5, e12443.

- B. Weniger, C. Vonthron-Senecheau, M. Kaiser, R. Brun und R. Anton (2006). Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 13, 176-180.
- M. Wiesgigl und J. Clos (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.
- T. Wilson und J. F. Edeson (1953). Treatment of acute malaria with pyrimethamine. *Br Med J* 1, 253-255.
- P. Wincker, C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, Y. Jauffret, J. P. Dedet und P. Bastien (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24, 1688-1694.
- S. Wyllie, M. L. Cunningham und A. H. Fairlamb (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 39925-39932.
- V. Yardley, S. L. Croft, S. De Doncker, J. C. Dujardin, S. Koirala, S. Rijal, C. Miranda, A. Llanos-Cuentas und F. Chappuis (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* 73, 272-275.
- R. Zhao, I. G. Sharina und I. D. Goldman (1999). Pattern of mutations that results in loss of reduced folate carrier function under antifolate selective pressure augmented by chemical mutagenesis. *Mol Pharmacol* 56, 68-76.
- E. E. Zijlstra, A. M. Musa, E. A. Khalil, I. M. el-Hassan und A. M. el-Hassan (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 3, 87-98.
- R. Zufferey und C. B. Mamoun (2002). Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. *Mol Biochem Parasitol* 125, 127-134.

## 7. Veröffentlichungen

- Bartsch, K., Eick, J., Zirpel, H., and J. Clos (2017). "Leishmania Heat Shock Proteins as Effectors of Immune Evasion and Virulence." *Curr Immunol Rev* (in press)
- Choy, S., L. H. Bernin, T. Aiba, E. Bifeld, S.C. Lender, M. Mühlenpfordt, J. Noll, J. Eick, C. Marggraff, H. Niss, N. González Roldán, S. Tanaka, M. Kitamura, K. Fukase, J. Clos, E. Tannich, Y. Fujimoto and H. Lotter (2017). "Synthetic analogs of a protozoan glycolipid designed to combat intracellular Leishmania infection." *Sci. Rep.* doi: 10.1038/s41598-017-09894-8
- Bifeld, E., P. Tejera Nevado, J. Bartsch, J. Eick and J. Clos (2016). "A versatile qPCR assay to quantify trypanosomatid infections of host cells and tissues." *Med Microbiol Immunol* 205(5): 449-458.
- Borsari, C., R. Luciani, C. Pozzi, I. Poehner, S. Henrich, M. Trande, A. Cordeiro-da-Silva, N. Santarem, C. Baptista, A. Tait, F. Di Pisa, L. Dello Iacono, G. Landi, S. Gul, M. Wolf, M. Kuzikov, B. Ellinger, J. Reinshagen, G. Witt, P. Gribbon, M. Kohler, O. Keminer, B. Behrens, L. Costantino, P. Tejera Nevado, E. Bifeld, J. Eick, J. Clos, J. Torrado, M. D. Jimenez-Anton, M. J. Corral, J. M. Alunda, F. Pellati, R. C. Wade, S. Ferrari, S. Mangani and M. P. Costi (2016). "Profiling of Flavonol Derivatives for the Development of Antitrypanosomatidic Drugs." *J Med Chem* 59(16): 7598-7616.
- Yau, W. L., U. Lambertz, L. Colineau, P. Pescher, A. MacDonald, D. Zander, S. Retzlaff, J. Eick, N. E. Reiner, J. Clos and G. F. Spath (2016). "Phenotypic Characterization of a Leishmania donovani Cyclophilin 40 Null Mutant." *J Eukaryot Microbiol* 63(6): 823-833.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

Bezeichnung	Abkürzung
ARM	engl. <i>antimony resistance marker</i>
BNITM	<b>Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin</b>
bp	<b>Basenpaare</b>
°C	Temperatur in Grad (°) <b>Celsius</b>
CHR	<b>Chromosom</b>
CL	engl. <i>cutaneous leishmaniasis</i> kutane Leishmaniose
CO <sub>2</sub>	engl. <i>carbon dioxide</i>
Cos-Seq	<b>Cosmid-Sequenzierung</b>
Cs	<b>Cäsium</b>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHFR	<b>Dihydrofolat-Reduktase</b>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<i>E. coli</i>	<b><i>Escherchia coli</i></b>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
EtOH	<b>Ethanol</b>
ggf.	gegebenenfalls
x g	Vielfaches der Gravitation (engl. <i>g-force</i> ) [ $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$ ], entspricht rcf (engl. <i>relative centrifugal force</i> )
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h	engl. <i>hour</i>
HSP	<b>Hitzeschockprotein</b>
H <sub>2</sub> O, ddH <sub>2</sub> O	Wasser, <b>doppelt destilliertes Wasser</b>
IC <sub>50</sub>	engl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>
k	<b>kilo (10<sup>3</sup>)</b>
LB	<b>Lauria-Bertani-Medium</b>
LdMT	<b><i>Leishmania donovani</i> Miltefosin Transporter</b>
Lsg.	<b>Lösung</b>
MTX	<b>Methotrexat</b>
mm	<b>Millimeter</b>

## Abkürzungsverzeichnis

mL, L	<b>Milliliter, Liter</b>
min	<b>Minuten</b>
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
NMTrypl	engl. <b>New Medicines for Trypanosomatidic Infections</b>
nt	<b>Nukleotid(e)</b>
NGS	engl. <b>Next Generation Sequencing</b>
PCR	engl. <b>polymerase chain reaction</b>
PBS	engl. <b>Phosphat buffered saline</b> (Phosphatpuffersalzlösung)
PTR1	<b>Pteridin-Reduktase1</b>
qRT-PCR	semi quantitative <b>real time PCR</b>
ROS	<b>reactive oxygen species</b>
RT	<b>Raumtemperatur</b>
SbIII	Antimon
SDS	engl. <b>sodium dodecyl sulfate</b> (Natriumdodecylsulfat)
SNP	engl. <b>single nucleotide polymorphism</b>
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
U	<b>Unit</b> ist die Einheit der Enzymaktivität Def.: 1U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
V	<b>Volt</b>
VL	engl. <b>visceral leishmaniasis</b> viszerale Leishmaniose
Vol	Volumen
WHO	engl. <b>world health organization</b>
WT	<b>Wildtyp</b>
w/v	engl. <b>weight/ volume</b> , (g Gewicht pro mL Volumen)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Joachim Clos bedanken. Vielen Dank Joachim für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Rahmen des überaus interessanten und vielfältigen NMTrypI Projektes anfertigen zu können. Ich habe viel gelernt und danke dir für die Unterstützung während meiner Zeit in deiner AG auch während des Schreibens meiner Arbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Kehr für die Anfertigung des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an die gesamte AG Clos! An alle derzeitigen und vorangegangenen Mitglieder der Arbeitsgruppe. Liebe Antje, Eugenia, Paloma, Kathi, Vanessa, Elena, Anne, Doro und natürlich lieber Henner ich hatte eine wundervolle Zeit mit euch. Ich danke euch für die Unterstützung, dafür das ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und für die gute Laune im Labor mit euch. Ich bedanke mich auch bei allen Studenten und Praktikanten, die unsere AG zeitweilig auf ihre ganz eigene Art bereichert haben.

Jill ich bedanke mich dafür, dass du mich ans BNI vermittelt hast und ich danke dir für unsere wundervollen gemeinsamen Mittwochs-Mittagessen.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die aufmunternden Worte und für euer Verständnis. Die Zeit mit euch war immer ein ganz wundervoller Ausgleich zu meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Mirco. Ich danke dir für deine Geduld, deine Unterstützung und deinen beständigen Glauben an mich. Danke, dass du schon seit so langer Zeit bei all meinen Lebensentscheidungen an meiner Seite bist.

**Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 24. August 2017