

**Varianten der *Leishmania major* [Yakimov & Schockov, 1915]  
 $\Delta clpB$ -Mutante:  
Virulenz und Immunantwort im Mausmodell**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Linda Reiling**

aus Steinheim/Westfalen

Hamburg 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. J. CLOS  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 01. April 2005

Hamburg, den 16. März 2005



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Leishmanien und Leishmaniosen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Kutane Leishmaniose.....	1
1.1.2 Diffuse Kutane Leishmaniose.....	1
1.1.3 Mukokutane Leishmaniose.....	2
1.1.4 Viszerale Leishmaniose: Kala Azar.....	2
1.1.5 Therapie.....	2
<b>1.2 Lebenszyklus und Invasionsstrategien.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Das Th1/ Th2-Konzept.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 <i>Leishmania</i> Infektion und Immunantwort im Tiermodell.....	6
<b>1.4 Hitzeschock.....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Die Hitzeschockantwort im Allgemeinen.....	7
1.4.2 Die Hitzeschockantwort in <i>Leishmania</i> .....	8
1.4.3 Die Hitzeschockproteine.....	9
1.4.3.1 HSP60.....	9
1.4.3.2 HSP70.....	9
1.4.3.3 HSP90.....	10
1.4.3.4 HSP100.....	11
1.4.3.4.1 HSP100 und degenerative Erkrankungen: Prion-Proteine und <i>Huntingtons Disease</i> .....	12
1.4.3.4.2 HSP100 in <i>Leishmania</i> .....	13
<b>1.5 Funktionelle Komplementation.....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Prinzip der funktionellen Komplementation.....	14
1.5.2 Funktionelle Komplementation versus Kompensation.....	15
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Kits.....	20
2.1.3 Membranen.....	20
2.1.4 Marker.....	20
2.1.5 Enzyme.....	20
2.1.6 Antikörper.....	20
2.1.7. Geräte und Sonstiges.....	21
2.1.8 Bakterienstämme.....	21
2.1.9 <i>Leishmania</i> - Stämme.....	21
2.1.10 Vektoren und Plasmide.....	22
2.1.11 Oligonukleotidstarter.....	23
2.1.12 häufig verwendete Puffer.....	23
2.1.13 häufig verwendete Medien.....	24
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Kultur von promastigoten Leishmanien.....	24
2.2.2 Einfrieren von <i>Leishmania</i> -Stammkulturen.....	25
2.2.3 Transfektion von Leishmanien durch Elektroporation.....	25

2.2.4	Vereinzelung von Zellpopulationen.....	26
2.2.5	Vorbereitung von Leishmanien für eine <i>in vivo</i> oder <i>in vitro</i> Infektion.....	26
2.2.6	Isolierung von Peritonealmakrophagen und <i>in vitro</i> Infektion.....	26
2.2.7	<i>In vivo</i> Infektion von BALB/c Mäusen.....	27
2.2.8	Subkutane Infektion: Die <i>air pouch</i> Methode.....	27
2.2.9	Reisolation von Parasiten aus infiziertem Gewebe.....	27
2.2.10	Isolierung von DNA.....	28
2.2.10.1	Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien.....	28
2.2.10.2	Plasmidisolierung durch alkalische Lyse: Minipräparation.....	28
2.2.10.3	Maxipräparation mit dem Qiagen Maxi-Kit.....	29
2.2.10.4	Isolierung von DNA aus Gewebe.....	29
2.2.10.5	Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA.....	29
2.2.11	Herstellung einer Cosmid-DNA-Bank:.....	30
2.2.11.1	Partialverdau von genomischer DNA und Vorbereitung der DNA Fragmente.....	30
2.2.11.2	Vorbereitung des Vectors pCosTL.....	31
2.2.11.3	Ligation der DNA Fragmente mit dem Cosmidvektor pCosTL.....	31
2.2.11.4	Verpackung des Ligationsansatzes in Phagenpartikel - Vorbereitung der Wirtsbakterien.....	31
2.2.11.5	Verpackung des Ligationsansatzes.....	31
2.2.11.6	Infektion der Wirtsbakterien.....	32
2.2.11.7	Amplifikation der Cosmidbank in <i>E.coli</i> .....	32
2.2.11.8	Bestimmung des Titers der Cosmid-Genbank.....	32
2.2.11.9	Isolierung von Cosmid-DNA aus der Cosmidbank zur Transfektion in <i>Leishmania</i> .....	33
2.2.12	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	33
2.2.12.1	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	33
2.2.12.2	Ligation.....	34
2.2.12.3	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.13	Transformation.....	34
2.2.14	Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen.....	34
2.2.15	Auftrennung von DNA Fragmenten in der Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE).....	35
2.2.16	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	35
2.2.16.1	Herstellung von Chromosomen-„Blöckchen“ für die PFGE.....	36
2.2.16.2	Auftrennung von DNA in der PFGE.....	36
2.2.17	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	36
2.2.18	Sequenzieren.....	37
2.2.19	Amplifikation von DNA Fragmenten durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.20	<i>Real time</i> -PCR.....	38
2.2.21	Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten DNA Sonden ( <i>random primed</i> ).....	39
2.2.22	Aufreinigung DIG-markierter Einzelstrangsonden mit Microspin™ S 300 HR Columns.....	40
2.2.23	Qualitätskontrolle der DIG-markierten Einzelstrangsonden.....	40
2.2.24	Kolonie Hybridisierung.....	40
2.2.25	Hybridisierung von Membranen mit DIG-markierten Einzelstrangsonden..	41
2.2.26	Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierten DNA Sequenzen	41
2.2.27	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.2.27.1	eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42

2.2.27.2 zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS.....	43
2.2.27.2.1 Anfertigung von Zellextrakten für die 2D Gelelektrophorese.	43
2.2.27.2.2 erste Dimension: Rehydrierung und isoelektrische Fokussierung.....	44
2.2.27.2.3 zweite Dimension: Äquilibration u. SDS-Gelelektrophorese	44
2.2.28 Anfärben von Proteinen.....	45
2.2.28.1 Coomassie Brilliant Blau.....	45
2.2.28.2 Coomassie Brilliant Blau G250.....	45
2.2.28.3 Modifizierte Silberfärbung (MALDI kompatibel).....	45
2.2.29 <i>matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry</i> (MALDI TOF MS).....	46
2.2.30 Transfer von Proteinmustern auf eine Membran: „Westernblot“.....	46
2.2.31 Immunblot.....	47
2.2.31.1 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen mit alkalischer Phosphatase.....	47
2.2.31.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen durch Chemolumineszenz.....	47
2.2.32 Stimulierung reisolierter Milz- und Lymphknotenzellen.....	48
2.2.33 Messung der Zellproliferation.....	48
2.2.34 <i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i> (ELISA) und.....	48
Elispot-Test.....	49
2.2.35 Generierung von murinen dendritischen Zellen (dendritic cells, Dcs).....	50
2.2.36 Durchflusszytometrie: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (FACS).....	50
2.2.37 Anfertigen von Zellschnitten.....	51
2.2.38 „ <i>fast red</i> “ -Färbung.....	51
2.2.39 Hämatoxylin-Färbung.....	52
2.2.40 Giemsa-Färbung.....	52
2.2.41 Fluoreszenzmikroskopie.....	52

### **3. Ergebnisse..... 54**

#### **3.1 Isolierung und Charakterisierung einer spontanen *L.m. ΔclpB escape* Mutante 54**

3.1.1 Infektionsverlauf.....	54
3.1.2 Isolierung der drainierenden Lymphknoten und Bestimmung der Parasitenlast.....	55
3.1.3 Histologische Untersuchung.....	56
3.1.4 Analyse des Zytokinmusters.....	57
3.1.5 Bestimmung der Proliferationsrate von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten.....	58
3.1.6 FACS-Analyse der isolierten Milz- und Lymphknotenzellen nach Infektion mit <i>L. major</i> WT, <i>ΔclpB</i> - und <i>L.m. ΔclpB escape</i> Mutante.....	60
3.1.7 Untersuchung der einwandernden Zellpopulation am Infektionsort durch die <i>air pouch</i> Analyse.....	61
3.1.8 Untersuchung der Infektiosität in <i>in vitro</i> Makrophageninfektionsstudien.....	63
3.1.9 Morphologie der <i>escape</i> -Population.....	64
3.1.10 Klonierung der <i>escape</i> -Population.....	64
3.1.11 Infektiosität der klonierten <i>escape</i> -Populationen.....	65
a) <i>In vitro</i> Makrophagen-Infektion mit den klonierten <i>escape</i> -Stämmen 1-3..	65
b) Infektion von BALB/c Mäusen mit den klonierten <i>escape</i> -Stämmen.....	67

3.1.12 Versuch des Nachweises eines stadienspezifischen Proteins der Metazyklognese.....	67
3.1.13 Untersuchung der Lymphknotenmasse und der Parasitenlast nach Infektion mit <i>L.m. ΔclpB escape 1, -2 und -3</i> .....	68
3.1.14 Untersuchung des Zytokinmusters nach Infektion den <i>L.m. ΔclpB escape 1-3</i> .....	69
3.1.15 Untersuchung des Genoms von <i>L.m. ΔclpB escape</i> in der Pulsfeldgelelektrophorese.....	70
3.1.16 Proteomics Analyse des Proteoms des <i>escape</i> -Mischisolats und der klonierten <i>escape</i> Stämme.....	71
3.1.17 Verifizierung der Überexpression von PFR-Proteinen durch Immunoblot und Immunfluoreszenz.....	75
3.1.18 Nachweis des PFR-Proteins durch Immunfluoreszenz.....	76
3.1.19 Klonierung eines <i>pfr</i> -Gens und Überexpression in <i>L. major ΔclpB</i> .....	76
3.1.20 Klonierung der offenen Leserahmen von <i>pfr1d</i> und <i>pfr2c</i> .....	77
3.1.21 Auswirkungen der klonierten <i>escape</i> -Stämme und von <i>L.m. ΔclpB</i> -PFR++ auf die Reifung von dendritischen Zellen	
a) Analyse der Sezernierung von Interleukin 12.....	78
b) Quantifizierung der Expression des Oberflächenmarkers CD86.....	79
3.1.22 Untersuchung des Antiserums aus WT- und <i>escape</i> -infizierten Mäusen im Immunoblot.....	80
<b>3.2 genetische Komplementationsanalyse.....</b>	<b>82</b>
3.2.1 Herstellung einer Cosmid-Genbank.....	82
3.2.2 Untersuchung der Repräsentativität der Cosmidbank durch Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße.....	84
3.2.3 Überprüfung der Heterogenität der Cosmidbank.....	84
3.2.4 Austausch eines Resistenzmarkers in <i>Leishmania major</i> durch homologe Rekombination.....	85
3.2.5 Transfektion von <i>L. major ΔclpB Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup></i> mit Genbank-Cosmid DNA und Selektion von Virulenz-vermittelnden Cosmiden <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> ...	86
3.2.6 <i>In vivo</i> Selektion.....	86
3.2.7 Charakterisierung der Virulenz vermittelnden Cosmide.....	87
3.2.8 <i>in vitro</i> Selektion.....	89
3.2.9 Analyse der reisolierten Cosmidspezies durch Feldinversionsgelelektrophorese.....	90
3.2.10 Selektionsrunde 2.....	91
a) <i>In vivo</i> Selektion Runde 2.I.....	91
b) Runde 2.II.....	92
c) Runde 2.III.....	93
3.2.11 Selektion in der Promastigote.....	95
3.2.12 Sequenzanalyse der prominenten Cosmidtypen.....	96
3.2.13 Verifizierung der Virulenzsteigerung in <i>in vitro</i> Makrophagen-Infektionsstudien.....	97
3.2.14 Identifizierung des Virulenz vermittelnden ORFs auf Cosmid a13.....	99
3.2.15 Durchmustern der Genbank nach Cosmid a13-Homologen.....	99
3.2.16 Variierung des Inserts von Cosmid a13 durch Restriktionsverdau.....	99
3.2.17 <i>in vivo</i> Selektion auf a13-homologe Cosmide.....	100
3.2.18 Analyse der reisolierten Cosmide durch Restriktionsverdau.....	101

<b>4. Diskussion.....</b>	<b>103</b>
4.1 Eine kompensatorische $\Delta clpB$ <i>escape</i> -Variante verursacht eine Wildtyp- vergleichbare Läsionsentwicklung.....	103
4.2 Die Läsionsgröße korreliert nicht mit der Parasitenlast.....	103
4.3 Infektion mit der <i>escape</i> -Mutante führt zur Induktion einer Th1-Antwort im BALB/c Modell.....	104
4.4 Die modifizierte Immunantwort beruht nicht auf einer variierten kostimulatorischen Aktivität.....	105
4.5 Die <i>L.m.</i> $\Delta clpB$ <i>escape</i> -Population besteht aus verschiedenen Einzelklonen mit unterschiedlicher Infektiosität.....	107
4.6 Verstärkte Expression von PFR-Protein führt nicht zu einer Stimulierung von dendritischen Zellen .....	108
4.7 Ergänzung des $\Delta clpB$ Phänotyps durch funktionelle Komplementation.....	109
4.7.1 Herstellung einer vollständigen und heterogenen Cosmid-Genbank.....	109
4.7.2 Cosmid-transfizierte $\Delta clpB$ Parasiten zeigen eine erhöhte Virulenz in der BALB/c Maus im Vergleich zu untransfizierten Zellen.....	110
4.7.3 <i>in vivo</i> Selektionsrunden führen zur Selektion auf definierte Cosmidtypen.....	111
4.7.4 Cosmide vermitteln auch einen Vorteil bei der <i>in vitro</i> Infektion von Makrophagen.....	113
4.7.5 ORF 4 von Cosmid a13 ist für die Virulenz der $\Delta clpB$ Deletionsmutante verantwortlich.....	114
4.7.6 Komplementation oder Kompensation?.....	114
4.7.7 Auch bei der <i>in vitro</i> Selektion findet eine Selektion auf definierte Cosmide statt.....	115
4.8 Funktion von ClpB.....	116
4.9 Ausblick.....	117
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> (Antigen präsentierende Zelle)
APZ	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3- ((3- Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propansulfonat
ClpB	ClpB Protease ( <i>caseinolytic protease B</i> )
cos	Cosmid
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIG	Digoxygenin
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Dinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen- Dinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylen- bis- (beta- aminomethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
esc	escape
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GIPL	Glykosylinositolphospholipid
GPI	Glykosylphosphatidyinositol
G418	Neomycinderivat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N' - 2-ethansulfonsäure
HS	Hitzeschock
Hsp	Hitzeschockprotein
hygro	Hygromycin
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IFN	Interferon
IR	intergenische Region
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L.	Leishmania
L.m.	Leishmania major
LPG	Lipophosphoglykan
M	Mol
MALDI TOF MS	<i>matrix associated laser desorption-ionisation time of flight mass spectrometry</i>
mcs	multiple Klonierungsstelle
MES	2-N-Morpholinethansulfonsäure
min	Minute
mM	millimolar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
N	Nourseothricin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4- Nitroblautetrazoliumchlorid
neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NTP	Nukleotid-Triphosphat
ORF	offenes Leseraster
p	Plasmid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFR	<i>para flagellar rod</i>
PPG	Proteophosphoglykan
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sog.	sogenannte/s
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
U	<i>unit</i> , enzymatische Einheit
upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslatierte Region

UV	ultraviolett
V	Volt
Vh	Voltstunden
X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat
z.B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{l}$	Mikroliter
2d	zweidimensional

## 1. Einleitung

### 1.1 Leishmanien und Leishmaniosen

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida. Wesentliches Merkmal dieser Ordnung ist der namensgebende Kinetoplast, der ca. 15% der zellulären DNA beinhaltet. Der Kinetoplast ist in Nähe des Geißelbasalkörpers lokalisiert, und mit dem einzigen Mitochondrium der Zelle assoziiert.

Die parasitären Protozoen wurden 1903 unabhängig von Sir William B. Leishman und Charles Donovan beschrieben. Der Erreger der viszeralen Leishmaniose wurde nach seinen Entdeckern *Leishmania donovani* genannt.

Die Leishmaniose ist auf vier Kontinenten vertreten, und in 88 Ländern endemisch. Weltweit sind ca. 12 Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert, und weitere 350 Millionen Menschen leben in Risikogebieten (WHO).

Leishmanien werden durch den Biss weiblicher Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* auf ihren Säugwirt übertragen. Dabei ist eine Übertragung durch die Gattung *Phlebotomus* in der alten Welt in semiariden und Savannengebieten gegeben, während die Gattung *Lutzomyia* in der neuen Welt vorwiegend in den Waldgebieten Zentral- und Südamerikas beobachtet wird (Harms und Bienzle, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 1993). Je nach Erregerspezies manifestieren sich unterschiedliche Symptome und Krankheitsverläufe, die auch vom Immunstatus des Wirtes abhängen (s.u., zusammengefaßt aus: Harms und Bienzle, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Thieme Verlag, 1993; WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, 2001).

#### 1.1.1 Kutane Leishmaniose

Eine kutane Leishmaniose wird in der Alten Welt durch *L. major*, *L. infantum* und *L. tropica* (Mittelmeerraum und mittlerer Osten) sowie *L. aethiopica* (Äthiopien, Kenia und Sudan) hervorgerufen. In der Neuen Welt stellen die Erreger des *L. mexicana*-Komplexes (Mittelamerika, Venezuela und Kolumbien) und des *L. brasiliensis*-Komplexes (Süd- und Mittelamerika) den Erreger dieser Leishmaniose-Form dar. Dabei manifestiert sich die Infektion 3-4 Wochen nach der Inokulation in Form einer juckenden Papel, die in der Regel von einer Lymphozyten- und Plasmazelleninfiltration sowie einer Ulzeration der Wunde begleitet wird. Als Komplikationen können Superinfektionen der Wunde auftreten. Nach einer Spontanheilung bleibt in den meisten Fällen eine eingezogene Narbe zurück. Rückfälle oder Therapieresistenzen werden gelegentlich beobachtet. Nach erfolgreicher Therapie ist der Patient gegen eine Reinfektion mit derselben Erregerspezies immun.

#### 1.1.2 Diffuse Kutane Leishmaniose

Selten kann durch die Erreger des *L. mexicana*-Komplexes (*L.m. mexicana*, *L.m. amazonensis*, *L.m. venezuelensis*) sowie durch *L. aethiopica* zumeist bei Immun-defekten Patienten eine diffuse kutane Leishmaniose hervorgerufen werden. Im Unterschied zur kutanen Leishmaniose kommt es dabei nicht zur Infiltration von Lymphozyten an der Stichstelle. Parasiten-beladene Makrophagen bilden Knoten-artige Hautläsionen am ganzen Körper, die jedoch nicht ulzerieren. Der infizierte Patient stellt somit ein permanentes Erregerreservoir für eine fortlaufende Übertragung auf den Insektenvektor dar. Diese Form der kutanen Leishmaniose heilt nicht spontan, und ist durch häufige Rückfälle charakterisiert.

### 1.1.3 Mukokutane Leishmaniose: Espundia

Diese auch als Espundia bekannte Krankheit stellt einen progressiven Verlauf der kutanen Leishmaniose des *L. brasiliensis*-Komplexes dar (*L.b. brasiliensis*, *L.b. panamensis*, *L.b. guyanensis*). 90% der Fälle treten in Brasilien, Bolivien und Peru auf (WHO). Es kommt noch während der kutanen Leishmaniose oder auch erst Jahre später zur Invasion der nasopharyngealen Schleimhäute, die daraufhin nekrotisieren. Auf diese Weise kann es zur vollständigen Auflösung des Nasenseptums, des Gaumens, der Zunge und der Lippen kommen. Unbehandelt verläuft die Espundia tödlich.

### 1.1.4 Viszerale Leishmaniose: Kala Azar

Die Erreger des *L. donovani*-Komplexes sind für die viszerale Leishmaniose verantwortlich. *L.d. donovani* (Ostafrika, Südsahara, Südasien, Indien, Iran) und *L.d. infantum* (Mittelmeerraum) sind die Erreger der viszeralen Leishmaniose in der Alten Welt. In der Neuen Welt wird diese Manifestation durch *L.d. chagasi* (Brasilien, Venezuela, Kolumbien) hervorgerufen, wobei diese Erregerspezies mit *L.d. infantum* gleichzusetzen ist. 90% aller viszeralen Leishmaniosen werden in Indien, Bangladesch, Nepal, Brasilien und im Sudan registriert (WHO). Bei diesem Krankheitsverlauf kommt es zum Befall des gesamten retikulo-endothelialen Systems, der von einer Hepato- und Splenomegalie und einer Anämie begleitet wird. Aufgrund einer zunehmenden Depigmentierung erhält die Haut einen Grauton, was zu der Bezeichnung Kala Azar (schwarze Krankheit) führte. Unbehandelt verläuft die Krankheit meist innerhalb von zwei Jahren nach Infektion tödlich. Die Mortalitätsrate behandelter Fälle liegt bei 15%. Bei unzureichender Behandlung kann sich das sogenannte *post Kala Azar dermal Leishmanoid* (PKDL) manifestieren. Dabei handelt es sich um Parasiten-beladene Hautknoten, die nicht ulzerieren, sich aber über die gesamte Körperoberfläche verteilen können.

### 1.1.5 Therapie

Die Mittel der Wahl sind nach wie vor pentavalente Antimonpräparate. Dabei wird am häufigsten auf Pentostam (Natriumstibogluconat) und Glucantim (N-Methylglucaminantimonat) zurückgegriffen. Deren Wirkung beruht auf der Hemmung von Purinnukleotidtriphosphaten der Parasiten (Harms und Bienzle, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Thieme Verlag, 1993). Eine Heilung wird in 95% der behandelten Fälle beobachtet (Bryceson, 2001). Der Nachteil dieser Behandlung liegt in der Anreicherung von pentavalentem Antimon in der Milz, sowie in der häufig beschriebenen Kardiotoxizität.

Bei Therapieresistenzen werden Pentamidin-Präparate (Polyamine) eingesetzt, die auf die Kinetoplasten DNA der Parasiten wirken. Nachteil dieser Therapie sind zahlreiche Nebenwirkungen bis hin zur Entwicklung einer Diabetes durch Pankreasschädigungen, sowie Nierenversagen (Harms und Bienzle, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Thieme Verlag, 1993).

Amphotericin B wird ebenfalls bei Antimonresistenzen eingesetzt. Neben der traditionellen Verabreichungsform durch regelmäßige Infusionen wurden in den letzten Jahren weitere Applikationsmöglichkeiten mit geringerer Toxizität erprobt (liposomales Amphotericin B). Die Wirkung beruht auf der Inhibierung der Ergosterol-Synthese, welche Bestandteile der *Leishmania*-Membran darstellen. Aufgrund der extrem hohen Kosten ist dieses Medikament jedoch in Entwicklungsländern keine Alternative zu den herkömmlichen Präparaten.

Das vielversprechende Miltefosine wurde bereits in klinischen Studien überprüft. Es ist in Indien bereits zugelassen und verspricht dort eine 96%-ige Heilungsrate bei viszeraler

Leishmaniose. Auch die kutane Leishmaniose in Europa konnte in klinischen Studien bis zu 94% geheilt werden (Fischer *et al.*, 2001). Allerdings sind in unpublizierten Fallbeschreibungen nur temporäre Effekte bei HIV ko-infizierten Patienten beschrieben worden. Weiterhin ist dieses Präparat aufgrund seiner teratogenen Wirkung unbrauchbar für weibliche Patienten im gebärfähigen Alter (Bryceson, 2001).

## 1.2 Lebenszyklus und Invasionsstrategien

Leishmanien zeichnen sich durch einen biphasischen Lebenszyklus aus. Beim Biss eines infizierten Säugerwirtes durch eine Sandmücke werden die Parasiten mit der Blutmahlzeit in den Vektor aufgenommen. Im Darmlumen erfolgt die Freisetzung der amastigoten Leishmanien aus den Wirtszellen des Säugerwirtes. Innerhalb von 12-24 Stunden differenzieren diese zum begeißelten, 15-25  $\mu\text{m}$  langen, promastigoten Stadium, das sich im Darmlumen des Vektors etabliert. Dabei erfolgt eine Anheftung der Parasiten über das Hauptoberflächenmolekül LPG (Lipophosphoglykan) an das Darmepithel in Form einer gerichteten Insertion der Flagellen zwischen die Mikrovilli der Darmepithelzellen (Sacks *et al.*, 1994). Von Pimenta *et al.* (1994) wurde gezeigt, dass die Anheftung Vektor-spezifisch erfolgt, und vom strukturellen Polymorphismus des LPGs abhängig ist. Während der Metazyklogenese differenzieren die avirulenten, prozyklischen Promastigoten im Verlauf von 5-8 Tagen zu hochvirulenten, metazyklischen Promastigoten. Im Verlauf dieser Differenzierung wird eine Veränderung der Komposition der terminalen LPG-Zucker beobachtet, die für die Ablösung der Parasiten vom Darmepithel verantwortlich ist (Pimenta *et al.*, 1992). Anschließend erfolgt eine Wanderung zum Vorderende des Darms, zum Ösophagus und zum Pharynx, von wo eine erneute Übertragung auf einen Säugerwirt stattfinden kann.

Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie die Leishmanien gegen den Blutstrom der saugenden Mücke übertragen werden können; möglicherweise spielen Chitin-lyisierende Enzyme eine Rolle, die durch die Zerstörung der Valvula cardiaca eine Regurgitation der Sandmücken und damit eine Übertragung der Leishmanien auf den Säugerwirt ermöglichen (Schlein *et al.*, 1992).

Im Gewebe des Wirtes sind die metazyklischen Parasiten zunächst verschiedenen Mechanismen des Immunsystems ausgesetzt. Dabei spielt das Komplementsystem eine zentrale Rolle bei der Etablierung einer Infektion. Verschiedene Strategien erlauben den Parasiten einerseits der Lyse durch eine erhöhte Komplement-Resistenz im metazyklischen Stadium zu entkommen. So wurde beispielsweise beobachtet, dass die Bildung lytischer C5b-9 Komplexe durch das Komplement zwar erfolgt, aber von metazyklischen Promastigoten im Gegensatz zu prozyklischen Promastigoten nicht in die parasitäre Membran integriert wird (Puentes *et al.*, 1990). Andererseits werden die Komponenten des Komplements sogar für eine erfolgreiche Invasion ihrer Wirtsmakrophagen genutzt:

Eine C2- und C4-unabhängige Aktivierung des alternativen Komplementweges erfolgt durch die Fixierung der Komplementkomponente C3 auf der Oberfläche der Parasiten, was in eine gesteigerte Bindungsfähigkeit an Makrophagen resultiert. Durch die schnelle Spaltung von C3 in C3b und einer anschließenden Konvertierung in C3bi werden die Parasiten über den Rezeptor für C3-Komponenten (CR3) auf der Oberfläche von Makrophagen von diesen phagozytiert. Eine Aufnahme der Parasiten in Makrophagen über den CR3 wurde sogar in der Abwesenheit von Serumkomponenten beobachtet (Mosser & Edelson, 1984; Mosser und Edelson, 1985). Auch der Rezeptor für C3b (CR1) scheint an der Bindung und

Internalisierung opsonisierter, metazyklischer Parasiten beteiligt zu sein (Da Silva *et al.*, 1989).

Weiterhin wurde beschrieben, dass auch die Bindung von nicht-Komplement-Faktoren an die Komplementrezeptoren bei der Internalisierung von Leishmanien von Bedeutung sind. Von Kedzierski *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass auch das *parasite surface antigen 2* (PSA2) bei der Bindung an CR3 der Makrophagen eine Rolle spielt. Vermutlich sind Leucin-reiche *repeats* (LRR) in der Sequenz von PSA2 und auch von Proteophosphoglykanen (PPG) für die Bindung an CR3 verantwortlich. Von Russell und Wilhelm (1986) wurde eine direkte Bindung der Oberflächenprotease gp63 (Leishmanolysin) an den Rezeptor CR3 nachgewiesen. Neben den Rezeptoren für Komponenten des Komplementsystems wurde auch die Beteiligung eines Mannose-Fucose-Rezeptors auf der Oberfläche humaner Phagozyten bei der Internalisierung von *L. donovani* beschrieben (Wilson and Pearson, 1986).

Nach der Internalisierung durch Makrophagen erfolgt eine Stadiendifferenzierung zu amastigoten Stadien, die, *zumindest bei L. donovani*, vermutlich durch die Schlüsselreize Temperaturerhöhung (37°C im Vergleich zum Vektor: 25°C) und den sauren pH-Wert von 5,5 induziert wird. Dabei scheint das LPG der metazyklischen Stadien durch einen noch unbekanntem Mechanismus die Fusion vom Phagosom und Lysosom zu verzögern, so dass den Parasiten Zeit für die Stadiendifferenzierung zur angepassten Amastigote gegeben wird (Desjardins und Descoteaux, 1997). Die Proliferation der Amastigoten erfolgt durch Zweiteilung bis zur Lyse der Wirtsmakrophagen. Dabei sind sie in der Lage, den leishmaniziden Mechanismen der Makrophagen zu entkommen. Eine signifikante Rolle scheinen dabei verschiedene Glykokonjugate zu spielen. Beispielsweise führte die Inaktivierung der Oberflächenprotease gp63 (Leishmanolysin) im Phagolysosom zu einer Lyse der Leishmanien (Seay *et al.*, 1996).

LPG auf der Oberfläche promastigoter Stadien stellt offenbar eine Barriere gegen den Angriff hydrolytischer Enzyme aus dem Lysosom der Makrophagen dar (Descoteaux *et al.*, 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass LPG einen inhibierenden Einfluss auf die Proteinkinase C (PKC) hat, deren Aufgaben in der Einleitung des oxidativen *burst* sowie in der Induktion *c-fos* abhängiger Genexpression liegt.

Die Hauptglykokonjugate auf der Oberfläche amastigoter Stadien (GIPLs: Glykosylinositol Phospholipide) zeigten einen inhibierenden Einfluss auf die Expression von iNOS (induzierbare Stickoxid-Synthase), die für die Produktion von antimikrobiellem NO (Stickoxid) verantwortlich ist (Proudfoot *et al.*, 1995).

Einen Schutz im Phagolysosom des Makrophagen scheint auch die Opsonisierung der Parasiten mit C3b und C3bi zu vermitteln: Die Überlebensrate wurde um das 10-fache gesteigert, indem so der oxidative *burst* unterdrückt werden konnte (Mosser und Edelson, 1987). Auch Passwell *et al.* (1994) zeigten, dass die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>-Radikalen nach Infektion mit *L. major*, *L. donovani* oder *L. mexicana* stark reduziert war.

Weiterhin wurde beschrieben, dass die Infektion von Makrophagen mit *Leishmania* zu einem Schutz gegen den programmierten Zelltod (Apoptose) führt (Akarid *et al.*, 2004).

Neben Makrophagen wurden eine Reihe weiterer potentieller Wirtszellen für *Leishmania* beschrieben: Nach der Inokulation der Parasiten durch den Vektor erfolgt eine lokale Einwanderung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, die auf die Wirkung eines chemotaktischen Faktors promastigoter Leishmanien (*L. major*, *L. aetiopica*, *L. donovani*) zurückzuführen ist (van Zandbergen *et al.*, 2002). Es kann daraufhin eine Opsonin-abhängige oder unabhängige Internalisierung der Parasiten durch neutrophile Granulozyten erfolgen,

wobei jedoch nur die Opsonin-unabhängige Aufnahme zu einer erfolgreichen Parasitierung der Zellen führt (Laufs *et al.*, 2002). Auch für dendritische Zellen (DCs) wurde ein ähnlicher Mechanismus gezeigt: Die Aufnahme opsonisierter Parasiten führte zu einer schnellen Reifung der DCs, während eine Infektion mit nicht-opsonisierten Leishmanien eine Etablierung der Infektion erlaubte, und eine effiziente T-Zell-Antwort verhinderte (Prina *et al.*, 2003). Von Bogdan *et al.* (2000) wurden außerdem Fibroblasten als sogenannte *safe targets* für eine persistierende *Leishmania* Infektion beschrieben.

Die Replikation der Parasiten erfolgt bis zur Lyse ihrer Wirtszellen, die zu einer Freisetzung der Leishmanien führt. Alternativ wird von Solbach *et al.* (2000) postuliert, dass die Freisetzung durch eine Fusion der parasitophoren Vakuole mit der Plasmamembran ermöglicht wird. Die frei vorliegenden Leishmanien werden erneut durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von Wirtszellen aufgenommen. Beim erneuten Biss einer weiblichen Sandmücke gelangen die Parasiten zurück in den Vektor, und der Lebenszyklus schließt mit der Differenzierung zum promastigoten Stadium im Darmlumen der Mücke.

## 1.2 Das Th1/Th2-Konzept

T-Lymphozyten werden anhand ihrer Funktion in zwei Untergruppen unterteilt: CD8+ T-Zellen kommt eine zytolytische Effektorfunktion zu (zytotoxische T-Zellen). Sie sind gegen Zellen gerichtet, die Antigene zytosolischer Pathogene über den MHC Klasse I Komplex präsentieren (*major histocompatibility complex I*), und lösen in ihren Zielzellen durch die Ausschüttung zytotoxischer Effektorproteine den programmierten Zelltod (Apoptose) aus.

CD4+ T-Zellen werden auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Sie induzieren und unterstützen eine Vielzahl von Reaktionen des Immunsystems wie die Einleitung der humoralen Immunantwort durch B-Lymphozyten, die Aktivierung von Makrophagen, und die Inflammation von infiziertem Gewebe. Diese differenzierten Reaktionen werden von verschiedenen Subpopulationen der CD4+ T-Helferzellen induziert, den sogenannten Typ 1 oder 2 T-Helfer-Zellen (Th1 bzw. Th2). Dabei wurden die verschiedenen Untergruppen von CD4+ Zellen erstmals in Zusammenhang mit *Leishmania*-Infektionen von verschiedenen Maus-Stämmen beschrieben. Eine BALB/c Maus ist üblicherweise anfällig für eine Infektion mit *Leishmania major*, während C57BL/6- und CBA Mäuse in der Regel eine Infektion kontrollieren können, und nach der Infektion eine protektive Immunität vorweisen. Von Mosmann *et al.* (1986) wurde beschrieben, dass sich die unterschiedlichen, aber aus einer gemeinsamen Vorläuferzelllinie entstehenden Subtypen der CD4+ T-Zellen in ihrer Zytokinproduktion- und Sezernierung unterscheiden. Bis heute ist eine Vielzahl von Zytokinen beschrieben, die charakteristisch für die Untergruppen der CD4+ T-Zellen ist.

Die sogenannten Th1-Zellen zeichnen sich durch eine Produktion und Sezernierung von Interleukin 2 (IL 2) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) aus. IL 2 ist dabei wenig spezifisch in seiner Wirkung, und unterstützt die Proliferation von Th1- und Th2-Zellen. IFN $\gamma$  dagegen blockiert die TH2-Proliferation, und hat dabei keinen Effekt auf Th1-Zellen. Weiterhin ist IFN $\gamma$  für die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich, die daraufhin eine zelluläre Immunantwort auslösen. IFN $\gamma$  induziert außerdem einen *switch* der Ig-Subklassen hin zu Isotypen, die Komplementkomponenten effektiv fixieren können. Ein weiteres Zytokin, das für eine Differenzierung zu einer Th1-Antwort verantwortlich ist, ist IL 12, das jedoch nicht von T-Zellen selber produziert wird. IL 12 wird von Antigen-präsentierenden-Zellen (APZs) wie dendritischen Zellen (DCs) oder Makrophagen sezerniert, und fördert die Proliferation von

Th1-Zellen (Hsieh *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995), da Th2-Zellen durch mangelnde Expression der  $\beta 2$ -Untereinheit des IL 12 Rezeptors nicht auf IL 12 reagieren.

Charakteristisch für die Differenzierung zu einer Th2-Zelle ist die Produktion und Sezernierung von IL 4, 5, 6 und 10. Dabei spielt das IL 4 die wohl wichtigste Rolle, da es die Proliferation der eigenen T-Zell Subpopulation fördert, dagegen aber keine Wirkung auf Th1-Zellen hat. IL 4 stimuliert darüber hinaus wie auch IL 5 und IL 6 die Proliferation von B-Zellen, und induziert einen *switch* der Ig Subtypen von IgM zu IgG1 und IgE, die im Gegensatz zu den Th1-induzierten Subtypen Komplement nur schwach binden können. Die starke Induktion der B-Zellen durch IL 4 leitet demnach die humorale Immunantwort ein. Das Th2-spezifische IL 10 unterdrückt die Proliferation von Th1-Zellen und damit die Sezernierung von IFN $\gamma$ . Von Hsieh *et al.* (1993) wird postuliert, dass die Ursache dafür eine Unterdrückung der IL 12-Sekretion von Makrophagen sein könnte, die üblicherweise in der Ausprägung eines Th1-Phänotyps resultieren würde.

Ein hervorzuhebender Unterschied zwischen den Th1- und Th2-Subpopulationen ist also die Fähigkeit der Th2-Zellen, ihre eigene Proliferation durch IL 4 Sekretion stark zu fördern, während IL 12, das die Proliferation von Th1-Zellen induziert, nicht von Th1-Zellen selber gebildet werden kann. Die Ausdifferenzierung und Expansion einer Th1-Zelllinie ist folglich von der Induktion durch andere Zellen abhängig.

Für die Differenzierung einer Th0-Zelle zum Th1- oder Th2-Phänotyp scheint demnach das Zytokinmuster zu Beginn des T-Zell- *priming* von entscheidender Bedeutung zu sein. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass die Präsenz von IL 4 klar über die von IL 12 dominiert (Schmitt *et al.*, 1994), kann der entscheidende Faktor auf Zytokinebene wohl auf das Vorhandensein von IL 4 reduziert werden. Dieses kann während der frühen Infektion von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten oder  $\gamma\delta$  T-Zellen sezerniert werden, und kann in diesem frühen Stadium der Infektion durch die Anregung der IL 12 Produktion von DCs auch eine Th1-Antwort auslösen (Biedermann *et al.*, 2001). Demnach müssen neben dem vorherrschenden Zytokinmuster noch weitere Faktoren an der Entscheidung beteiligt sein, ob eine Differenzierung zum Th1- oder Th2-Phänotyp stattfindet.

Der Einfluss von verschiedenen APZs auf die Entwicklung der Th0-Zellen wird dabei kontrovers diskutiert. So zeigten beispielsweise Gajewski *et al.* (1991), dass Th1-Zellen während einer Koinkubation mit B-Lymphozyten schlechter proliferierten als Th2-Zellen, und dass umgekehrt eine Inkubation von Th1-Zellen mit adherenten APZs eine stark erhöhte Proliferationsrate auslösen kann. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass beide T-Zell Subpopulationen maximale Zytokinproduktion vorweisen, wenn sie durch B-Zellen stimuliert werden (Chang *et al.*, 1990).

### **1.3.1 *Leishmania* Infektion und Immunantwort im Tiermodell**

Zur Untersuchung bestimmter Eigenschaften der Parasiten sowie zur Stammerhaltung werden Infektionen von Inzucht-Mausstämmen durchgeführt, die modellhaft für die Infektion eines Säuerwirtes sind. Dabei steht eine Vielzahl von Mausstämmen zur Verfügung. Hervorzuheben sind dabei die BALB/c- und die C57BL/6-Mäuse, die sich grundlegend in ihrer Immunantwort nach Infektion mit *Leishmania major* unterscheiden. Infektionen von BALB/c Mäusen resultieren immer in einer Etablierung der Infektion, einhergehend mit einer Disseminierung der Parasiten in lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Verantwortlich für die beobachtete Anfälligkeit ist die Etablierung einer Th2-Antwort, wie in einer Studie von Launois *et al.* (1999) gezeigt wurde. Demnach ist bei einer Infektion von BALB/c Mäusen bereits in den ersten 16 Stunden nach der Infektion ein stark

erhöhter Spiegel an IL 4 mRNA im drainierenden Lymphknoten zu verzeichnen, während bei C57BL/6 Mäusen signifikant weniger IL 4 mRNA nachweisbar war. Weitere Versuche zeigten, dass LACK (*Leishmania antigenic caseine kinase*)-spezifische V $\beta$ 4 V $\alpha$ 8 CD4+ T-Zellen die Quelle des erhöhten IL 4 mRNA-Spiegels waren, und dass nach einer Depletierung dieser Zellen kein erhöhter IL 4 mRNA Spiegel und damit keine Th2-Antwort mehr zu beobachten war (Launois *et al.*, 1997). Ein früher *burst* in der IL 4 Produktion während der ersten 16 Stunden nach Infektion führt zudem zu einer schnellen Unfähigkeit der CD4+ Vorläuferzellen, auf IL 12, dem Th1-spezifischen Zytokin zu reagieren (Launois *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu können C57BL/6 Mäuse eine Infektion mit *L. major* kontrollieren. Dieses ist verbunden mit der Fähigkeit, die IL 4-Produktion 7 bis 14 Tage nach der Infektion nach einem frühen *burst* wieder auf ein Minimum zu reduzieren, während bei BALB/c Mäusen der Spiegel von IL 4 mRNA vermutlich aufgrund eines genetischen Defekts stark erhöht bleibt. Gleichzeitig ist während dieser Phase der Infektion in den resistenten C57BL/6 Mäusen ein Anstieg des IFN $\gamma$  mRNA Spiegels zu beobachten, der in BALB/c Mäusen kontinuierlich reduziert wird (Reiner *et al.*, 1994). Es findet eine Differenzierung der Th0-Zellen zu Th1-Zellen statt, die u.a. an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt sind.

Über die Gründe der unterschiedlichen Differenzierung von Th0-Zellen in BALB/c bzw. C57BL/6 Mäusen nach einer Infektion mit *L. major* ist bis heute wenig bekannt.

Von Gorham *et al.* wurde 1996 gezeigt, dass ein Abschnitt auf Chromosom 11 des Mausgenoms einen Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen auf IL 12 hat. Dabei wurden in dieser Studie Gene für einen T-Zell Rezeptor in Th1- bzw. Th2-Antworten-entwickelnde Mäuse eingebracht (B10.D2 bzw. BALB/c), so dass T-Zell Populationen mit identischem Rezeptor und identischer Antigenpezifität vor unterschiedlichem genetischen Hintergrund verglichen werden konnten. Dabei stellte sich heraus, dass T-Zellen aus B10.D2-Mäusen ihre Fähigkeit auf IL 12 zu reagieren, länger beibehielten als T-Zellen aus BALB/c Mäusen, und damit eine höhere Tendenz zur Th1-Differenzierung vorwiesen. Die für dieses Phänomen verantwortliche Region konnte auf die oben erwähnte Region auf Chromosom 11 kartiert werden, und enthält ein *cluster* für T-Zell-Differenzierungsgene wie IL 4, IL 5, IL 3 und IFN $\gamma$  *regulatory factor* 1.

Eine weitere genetische Variation zwischen Th1- und Th2-entwickelnden Mausstämmen liegt in der Sequenz für den IL 4 Rezeptor (IL 4R). Dabei wurde eine Substitution von 18 Basen in der IL 4R-Sequenz von BALB/c Mäusen beobachtet, die in einer reduzierten IL4 Neutralisierung und einer erhöhten IL 4 Dissoziation resultiert (Schulte *et al.*, 1997).

### 1.3 Hitzeschock

#### 1.4.1 Die Hitzeschock-Antwort im Allgemeinen

Die Hitzeschock Antwort kann als zelluläre Notfallreaktion beschrieben werden. Dabei handelt es sich um Hitzestress-induzierte, schnelle und effiziente Expression von Hitzeschockproteinen (HSPs), die auch als molekulare Chaperone bezeichnet werden. Die Bezeichnung „Hitzeschockantwort“ resultiert aus der ersten Beobachtung der Hitzeschockantwort in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila*-Larven, welche eine veränderte Ausbildung aktiver Bereiche ihrer polytären Riesenchromsomen erkennen lassen (Ritossa, 1963). In den meisten eukaryotischen Zellen werden die Hitzeschockproteine jedoch auch als Reaktion auf andere Stressoren wie Ethanol, Schwermetallionen oder Virusinfektionen exprimiert (Lindquist, 1986).

Stressproteine gehören zu einer Multigen-Familie, und umfassen Proteine unterschiedlichster Größe (10-150 kDa). Die Bezeichnung erfolgt nach ihrem Molekulargewicht (Whitley *et al.*, 1999). Ihre Aufgaben bestehen in der Rückfaltung denaturierter Proteine in ihre native Konformation und in der Degradierung fehlerhafter bzw. überflüssiger Proteine. Dabei erkennen Chaperone hydrophobe Aminosäuresequenzen, die in nicht-nativen Proteinen an deren Oberfläche vorliegen. Mit diesen gehen die Chaperonen eine nicht-kovalente Bindung ein, was eine Stabilisierung denaturierter Proteine und zur Folge hat und gleichzeitig verhindert, dass unlösliche Proteinaggregate entstehen. Unter ATP-Verbrauch durchlaufen die Chaperone Konformationsänderungen, die es dem denaturierten Substratprotein erlauben, sukzessive die native Konformation wiederzuerlangen (Bukau *et al.*, 1998). Darüber hinaus übernehmen konstitutiv exprimierte Klassen der Hitzeschockproteine Aufgaben in der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen, indem Komponenten von Signaltransduktionsmechanismen oder regulatorische Proteine bis zum Erhalt eines spezifischen Signals in der inaktiven Form gehalten werden (Rutherford und Zuker, 1994). Auch in der posttranslationalen Faltung naszierender Proteine spielen konstitutiv exprimierte Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle (Hartl *et al.*, 1996).

#### **1.4.2 Die Hitzeschock-Antwort in *Leishmania***

In *Leishmania* wurde eine Hitzeschockantwort erstmals von Hunter *et al.* (1984) und Lawrence *et al.* (1985) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Parasiten der Spezies *L. tropica*, *L. enriettii* und *L. donovani* als Antwort auf eine Inkubation bei 37°C sowie als Reaktion auf die Applikation von Natriumarsenit eine Proteinspezies der Größe 88-, 74- und 54kDa bzw. der Größe 94-, 78- und 56kDa exprimierten. Von Clos *et al.* (1998) wurde dagegen eine Induktion der Hitzeschockantwort in *L. donovani* nach Einwirkung diverser anderer Stressoren wie Ethanol, saurer pH, Cadmium- und Kupfer- und Arsenionen, sowie Pentostam nicht beobachtet.

Da Leishmanien während ihrer Übertragung vom poikilothermen Insektenvektor auf ihren homeothermen Säugerwirt einer Erhöhung der Umgebungstemperatur ausgesetzt werden, postulierten van der Ploeg *et al.* bereits 1985 eine Beteiligung der Hitzeschockantwort an der Stadiendifferenzierung zur Amastigote, und damit an die Anpassung der Parasiten an die veränderte Umgebung. Tatsächlich wurde von Bates *et al.* (1992) gezeigt, dass eine Erhöhung der Umgebungstemperatur für die Stadiendifferenzierung von *L. mexicana* zum amastigoten Stadium ausreichend ist.

Im Unterschied zu allen anderen bisher untersuchten Organismen findet die Regulation der Hitzeschockantwort in *Leishmania* und anderen Kinetoplastida ausschließlich auf posttranskriptionaler Ebene statt, wie anhand der Expression von HSP70 und HSP90 gezeigt wurde: In *L. major* und *L. donovani* wird nach einem Hitzestress nur eine äußerst geringe Zunahme der mRNA Menge beobachtet, und in *nuclear run on* Experimenten waren keine induzierten mRNA Synthesen zu verzeichnen. Die gesteigerte Proteinexpression war also nachweislich auf einen posttranslationalen Mechanismus zurückzuführen (Brandau *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Miller *et al.* (1988) untermauert, in der eine *in vitro* Translation von mRNA Hitze- behandelte- und unbehandelte *L. mexicana*-Parasiten keine Unterschiede der mRNA Menge von Hitzeschockproteinen ergab.

### 1.4.3 Die Hitzeschockproteine

#### 1.4.3.1 HSP60

Chaperonine der HSP60 Familie (prokaryotisches GroEL) bilden ringförmige Einheiten aus. Zwei dieser Ringe lagern sich in Prokaryoten zu einer Fass-artigen Struktur zusammen, deren Inneres das aktive Zentrum des Komplexes darstellt. In Eukaryoten ist an der Ausbildung dieser Struktur nur ein Ring beteiligt. Das Ko-Chaperon HSP10 bzw. prokaryotisches GroES bildet eine „Deckel-artige“ Struktur mit einer der beiden GroEL-Untereinheiten aus. Über hydrophobe Wechselwirkungen werden denaturierte Proteine im Innern der asymmetrischen GroEL-Strukturen gebunden. Erfolgt eine Assoziation der Peptid-tragenden GroEL-Untereinheit mit GroES in Anwesenheit von ATP, führen strukturelle Konformationsänderungen in GroEL zu einer Lösung der gebunden Peptide von den apikalen Enden der Untereinheit. An dieser Stelle erfolgt die erneute Faltung des Substratproteins in eine native Konformation. Die Hydrolyse von ATP in der besetzten Untereinheit sowie die Bindung von ATP im unbesetzten GroEL-Ring führen zur Dissoziation von GroES und zur Freisetzung des Substrates. HSP60 spielt damit eine unverzichtbare Rolle bei der Faltung denaturierter Proteine.

Von Rey-Ladino und Reiner (1993) wurde nach einem Hitzeschock in *L. donovani* die *de novo*-Synthese einer 65- sowie einer 76 kDa-Proteinspezies beschrieben. In Studien von Schlüter *et al.* (2000) konnten in *L. donovani* zwei HSP60-Gene identifiziert werden (*cpn60.1* und *cpn60.2*), von denen jedoch nur Cpn60.2 konstitutiv im promastigoten Stadium exprimiert wird, und eine 2,5-fache Expressionssteigerung in axenischen Amastigoten erfährt. Die Lokalisation des Proteins in der mitochondrialen Matrix führt zu der Annahme, dass es sich bei CPN60.2 um das *Leishmania*-Homolog eines mitochondrialen, eukaryotischen Hsp60 handelt (Schlüter *et al.*, 2000). Auch in *L. major* wurde ein *hsp60* Gen charakterisiert (Rey-Ladino *et al.*, 1997).

#### 1.4.3.2 HSP70

Mitglieder der HSP70 Proteinfamilie sind hochkonserviert, und bestehen aus einer N-terminalen ATPase-Domäne, einer mittleren Substratbindungsstelle und einer C-terminalen Domäne unbekannter Funktion. Eukaryotisches HSP70 ist dem bakteriellen DnaK homolog, welches zusammen mit DnaJ (HSP40) und GrpE eine funktionelle Einheit bildet. Dabei handelt es sich bei DnaJ um einen Cofaktor, der wie DnaK hydrophobe Segmente eines Proteins erkennt, bindet und stabilisiert sowie die ATPase-Aktivität von DnaK stimuliert, während GrpE einen ADP/ATP-Nukleotidaustauscher darstellt. Auch in eukaryotischen Fibroblasten konnte nachgewiesen werden, dass HSP40 und HSP70 eine funktionelle Einheit bilden (Michels *et al.*, 1999).

Von Bukau und Horwich (1998) wird ein Modell postuliert, indem DnaJ transient ein Substrat bindet, und zusammen mit diesem einen Komplex mit der ATP-Form von DnaK bildet. Die Bindung von DnaJ sowie der Transfer des Substrats von DnaJ in die Substratbindungstasche von DnaK sind Voraussetzung für die Hydrolyse von ATP, die zu einer stabilen Bindung zwischen DnaK und Substrat führt. Gleichzeitig wird DnaJ wieder freigesetzt. Eine Assoziation von GrpE resultiert in den Austausch von ADP in ATP, während im selben Moment das Substrat aus der Bindungstasche von DnaK entlassen wird. Alternativ kann die Bindung von Substratprotein an DnaK auch ohne Beteiligung von DnaJ erfolgen. Durch die Bindung von Substratprotein an DnaK wird dieses stabilisiert und so vor Aggregation geschützt. Durch diesen Mechanismus spielen HSP70 bzw. DnaK Proteine eine wichtige

Rolle bei der Faltung neu-translatierter Proteine sowie bei der Translokation von Protein-Spezies durch Membranen. Auch bei der Degradierung instabiler und fehlgefalteter Proteine kommt HSP70 zum Einsatz. In der Hefe und anderen Organismen spielen HSP70 Mitglieder eine Rolle bei der Ausbildung von Thermotoleranz (Sanchez *et al.*, 1993).

In *L. major* wurden 4 tandemartig arrangierte *hsp70* Gene identifiziert, deren Expression durch Applikation eines Hitzestresses von 37°C extrem gesteigert wurde. Eine weitere Kopie am gleichen Genlocus war jedoch nicht davon betroffen (Lee *et al.*, 1988). 7 ebenfalls tandemartig angeordnete *hsp70* Gene wurden in *L. amazonensis* beschrieben. Auch hier wurde eine weitere Kopie außerhalb des eigentlichen *hsp70* Genlocus identifiziert (Bock *et al.*, 1993). Ein 65 kDa Protein mit Sequenzhomologie zu HSP70 und mitochondrialer Lokalisation wurde in *L. major* von Searle *et al.* (1993) beschrieben.

#### 1.4.3.3 HSP90

HSP90 ist eines der häufigsten Proteine in eukaryotischen Zellen. Selbst in ungestressten Zellen kann es einen Anteil von 1% am Gesamtproteingehalt der Zellen betragen. Nach einem Hitzestress induzieren prokaryotische und eukaryotische Zellen die Expression von HSP90 um das 10-fache (Buchner *et al.*, 1999).

In HSP90 Monomeren sind zwei hochkonservierte Regionen durch einen geladenen *linker* variabler Länge verbunden. Das native Protein besteht aus zwei Monomeren, die über ihre C-Termini eine Bindung eingehen. Ein HSP90-Dimer stellt ein elongiertes Molekül dar, das jedoch flexibel scheint, und verschiedene Konformationen einnehmen kann. Ein Hitzeschock scheint eine Annäherung der beiden N-Termini zu induzieren (Buchner *et al.*, 1999).

Mitglieder der HSP90 Familie sind in dynamischen Komplexen wirksam, die aus verschiedenen Ko-Chaperonen zusammengesetzt sind. Sie halten wichtige regulatorische Proteine wie Steroidhormonrezeptoren oder Zellzyklus-abhängige Kinasen in inaktivem Zustand. Am Beispiel eines Steroidhormonrezeptors wurde ein Modell für den Wirkmechanismus des HSP90 Komplexes postuliert (*reviewed* in Buchner, 1999; Jakob, 1996; Rutherford und Zuker, 1994): anfängliche Interaktionen finden zwischen HSP70, seinem Ko-Chaperon HSP40 und dem HSP70 *interacting protein* (HIP) statt. Das *scaffold* Protein HOP (HSP70/HSP90 *organizing protein*) verbindet ein HSP90 Dimer mit dem HSP70 Komplex zu einem intermediären Komplex, welcher einen Steroidhormonrezeptor in seiner inaktiven Form bindet. Dieser Komplex wird durch die Dissoziation des HSP70-Komplexes inklusive HOP und durch gleichzeitige Anlagerung von p23 und eines Immunophilins zu einem reifen Komplex, der sein reifes Substrat spontan entlassen kann. Der Steroidhormonrezeptor kann in Abwesenheit von Hormonen erneut mit intermediären Chaperonen-Komplexen assoziieren, oder durch die Bindung von Steroidhormonen dimerisieren, und so in seiner Funktion als Transkriptionsregulator an DNA Sequenzen binden.

Von Rutherford und Lindquist (1998) wurde eine Funktion von HSP90 in der morphologischen Evolution postuliert. Heterozygote Deletionen von HSP90 in *Drosophila melanogaster* führten in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund zu einer Reihe von morphologischen Variationen, die auf die F1-Generation vererbbar waren. Möglicherweise puffert HSP90 eine Reihe kryptischer Genmutationen, indem es seine mutierten Substratproteine in eine native Konformation zwingt. Da ein Hitzestress einen ähnlichen Effekt hat wie heterozygote Gendeletionen, nämlich den Abzug von verfügbaren HSP90,

könnten auch auf diesem Weg in Stress-Situationen kryptische Genmutationen zum Tragen kommen.

Ein hochkonservierter *hsp90* (*hsp83*) Locus wurde in *L. major*, *L. donovani* und *L. mexicana amazonensis* beschrieben (Hübel und Clos, 1996). Im ungestressten, promastigoten Stadium von *L. major* und *L. donovani* beträgt der Anteil von HSP90 am Gesamtproteingehalt bereits 2,8% (Brandau *et al.*, 1995). Einen Hinweis auf die Funktion von HSP90 in *Leishmania donovani* lieferten Wiesgigl und Clos (2001): Eine Geldanamycin-induzierte Inhibierung von HSP90 führte zu einer ähnlichen morphologischen Differenzierung der Parasiten wie es die Applikation eines Hitzeschocks in Verbindung mit einer Ansäuerung des Kulturmediums zur Folge hat. In diesen Zellstadien wurde außerdem die Expression der Amstigoten-spezifischen A2-Proteine nachgewiesen. Weiterhin resultierte die Inhibierung von HSP90 in einem Wachstumsarrest und in einer Induktion der HSP-Expression. Die Autoren postulieren eine Rolle bei der Stadiendifferenzierung vom promastigoten zum amastigoten Stadium.

#### 1.4.3.4 HSP100

Die Mitglieder der HSP100-Familie werden in zwei Klassen eingeteilt, die sich strukturell voneinander unterscheiden. Die erste Klasse zeichnet sich durch zwei ATP-Bindungsregionen aus, die durch einen variablen Mittelteil voneinander getrennt werden. Dieser Klasse werden die Proteine ClpA, ClpB, ClpC und ClpD zugeordnet. Die zweite Klasse umfasst die Proteine ClpM, ClpN, ClpX und ClpY, und weist nur eine N-terminale ATP-Bindungsstelle auf (Schirmer *et al.*, 1996).

1990 wurde ein entsprechendes Chaperon (HSP104) in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Sanchez *et al.*, 1990), das den ClpB Proteinen der Klasse 1-Proteasen homolog ist. HSP104 ist das größte, hitzeinduzierbare Protein in der Hefezelle (Sanchez *et al.*, 1990), anhand dessen die ersten Untersuchungen zur Funktion von Mitgliedern der HSP100 Familie vorgenommen wurden. Seine spezifische Funktion scheint in der Vermittlung von Thermotoleranz zu liegen, wie von Sanchez *et al.* (1990) gezeigt wurde. Dabei wurde stark verringerte Überlebensrate bei  $\Delta hsp100$  Mutanten beobachtet, als diese nach einer Vorbehandlung bei leichtem Hitzestress einer nicht-permissiven Temperatur ausgesetzt wurden. Erste Hinweise auf die Funktion von HSP104 lieferten Parsell *et al.* (1994) mit dem Ergebnis, dass HSP104 nicht am Abbau denaturierter Luziferase beteiligt war. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Wildtyp Zellen nach einem Hitzeschock die Luziferase Aktivität wiederherstellen konnten, während diese in  $\Delta hsp100$  Mutanten inaktiv blieb. Vermutlich ermöglicht HSP104 in der Hefe eine Resolubilisierung von denaturiertem Protein aus unlöslichen Proteinaggregaten (Parsell *et al.*, 1994).

Von Vogel *et al.* (1995) konnte erstmals eine Beteiligung von HSP104 in einem intrazellulären, biologischen Prozess nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Expression von HSP104 nach einem Hitzeschock zur Wiederherstellung eines funktionstüchtigen *Splicing*-Apparates in der Hefe führte. Weiterhin wurde erstmals eine kooperative Wirkung von HSP70 und HSP104 postuliert, da eine Applikation beider Proteinspezies in ihrer Optimalkonzentration eine größere Wirkung erzielten als eine separate Applikation.

Einen funktionellen Zusammenhang zwischen HSP70 und HSP104 postulierten auch Sanchez *et al.* (1993), indem sie zeigten, dass unter bestimmten Bedingungen beide Proteine die Rolle des jeweils anderen übernehmen können. In der Hefe war beispielsweise die Überlebensrate nach einer nicht-permissiven Temperatur um das 100-fache reduziert, wenn neben dem Gen für HSP104 auch noch die Hitze-induzierbaren Gene für HSP70 (SSA1, -3 und -4)

ausgeschaltet waren. Die verringerte Thermotoleranz konnte durch eine Überexpression des Hitze-induzierbaren *hsp70*-Gens (*ssa1*) in einer  $\Delta$ *hsp104* Mutante wieder ausgeglichen werden, wenn auch nur in der frühen Phase der Temperaturerhöhung. Umgekehrt spielte HSP104 nur dann eine Rolle beim Wachstum, wenn die konstitutiv exprimierten Mitglieder der HSP70 Familie (*Ssa1* und *Ssa2*) ausgeschaltet wurden.

In einer Studie von Glover und Lindquist (1998) wurde gezeigt, dass HSP104 in Kooperation mit dem Hefe-Homolog für HSP40 (YDJ1) und HSP70 (SSA) eine Resolubilisierung denaturierter und aggregierter Proteine ermöglicht.

Auch in anderen eukaryotischen Zellen wurden HSP100 Homologe identifiziert und charakterisiert. In *Arabidopsis thaliana* scheint HSP101 eine vergleichbare Rolle in der Thermotoleranz zu spielen wie HSP104 aus der Hefe (Queitsch *et al.*, 2000). Auch in *Phaseolus lunatus* (Lima Bean) konnte ein Hitze-induzierbares Homolog von HSP100 beschrieben werden (Keeler *et al.*, 2000).

#### **1.4.3.4.1 HSP100 und degenerative Erkrankungen: Prion-Proteine und Huntingtons Disease**

In den letzten Jahren wurde die Beteiligung von ClpB Proteinen an neurodegenerativen Erkrankungen untersucht, die ihre Ursache in der Konformationsänderung nativer Proteine bzw. in der Ablagerung von unlöslichen Proteinplaques zu haben scheinen.

Prione sind infektiöse Proteine, die sogenannte TSEs (*transmissible spongiform encephalopathies*) wie das Creutzfeld-Jakob-Syndrom oder BSE induzieren. Nicht vollständig geklärt ist die Frage, ob die mit der Krankheit einhergehenden amyloiden Prion-Proteinablagerungen in den Neuronen Ursache oder lediglich Begleiterscheinungen der degenerativen Erkrankungen sind (Prusiner, 1994). Anhand eines Modellsystems in der Hefe wurde gezeigt, dass die Konformationsänderung des Translations-Terminationsfaktor Sup35 durch eine Expansion eines Glutamin-reichen Abschnitts induziert werden kann, und zu einem Prion-Phänotyp (PSI+) führt. Von Chernoff *et al.* (1995) wurde beobachtet, dass bei der Ausbildung des PSI+ Phänotyps die Konzentration von ClpB Proteinen eine fundamentale Rolle spielt: Eine Überexpression von HSP104 führte zu einer vorübergehenden Aufhebung von PSI+, und eine Deletion von *hsp104* resultierte in einer dauerhaften Unterdrückung von PSI+. Möglicherweise spielt HSP104 eine Rolle bei der Konformationsänderung von Sup35 zum infektiösen Prion-Protein, was jedoch durch eine Überexpression desselben Proteins wieder rückgängig gemacht werden kann.

Eine andere Klasse von neurodegenerativen Erkrankungen, zu der Chorea Huntington und verschiedene spinocerebrale Ataxien zählen, wird durch Proteine hervorgerufen, die in ihrer N-terminalen Sequenz eine variable Zahl von Glutaminresten tragen. Bei der Überschreitung einer kritischen Zahl, die zwischen 35 und 42 Glutaminen zu liegen scheint, manifestiert sich eine Erkrankung in Form von amorphen, meist intranukleären Ablagerungen in neuronalen Zellen, die mit Neurodegeneration bzw. geistiger Demenz einhergeht. Anders als bei Prion-Proteinen scheint vermutlich nicht die Konformation des Proteins entscheidend für die Ausbildung der Erkrankung zu sein, sondern die Abspaltung und Ablagerung des Glutamin-reichen, N-terminalen Fragmentes. Auch das Aggregationsverhalten sowie die Ablagerung von Huntingtin-Protein wurden im Hefemodell untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass auch in diesem Fall eine Überexpression oder eine Deletion von *hsp104* zu einem vollständigen Verlust der Aggregatbildung führt (Krobitsch und Lindquist, 2000).

#### 1.4.3.4.2 HSP100 in *Leishmania*:

In *Leishmania major* und *Leishmania donovani* konnte jeweils ein Gen für ein HSP100-Homolog beschrieben werden, das aufgrund seiner Sequenzhomologien der ClpB Familie zugeordnet wurde (Hübel *et al.*, 1995; Krobitsch *et al.*, 1998). Wie seine homologen Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* ist auch die Expression des *Leishmania* ClpB durch Hitze induzierbar. In *L. donovani* liegt ClpB in Lösung wahrscheinlich als homotrimerer Komplex vor, und ist in Hitze-behandelten Promastigoten im Zytoplasma in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert (Krobitsch *et al.*, 1998).

Über die Funktion von HSP100 bzw. ClpB in *Leishmania* ist wenig bekannt. Die Auswirkung von ClpB auf die Thermotoleranz der Parasiten erscheint kontrovers: In einer Studie von Krobitsch *et al.* (1999) wurde ein Einfluss von ClpB in *L. donovani* auf die Thermotoleranz angezweifelt, da eine Vorbehandlung von Wildtyp und  $\Delta clpB$  Genaustauschmutanten bei moderaten Temperaturen nicht zu Unterschieden in der Toleranz nicht-permissiver Temperaturen führte. Für *L. major* dagegen wurde eine Erhöhung der Thermotoleranz durch die Expression von HSP100 postuliert, nachdem in einer *L. major*  $\Delta clpB$  Mutante eine eingeschränkte Proliferationsrate unter erhöhten Temperaturen (35°C) beobachtet wurde (Hübel *et al.*, 1997).

Der Austausch beider *clpB* Allele in *L. donovani* und führte weder zu veränderten Proliferationsraten im promastigoten Stadium bei 25°C oder 37°C (Krobitsch *et al.*, 1999), noch zu einer Beeinträchtigung der morphologischen Differenzierung zu axenischen Amastigoten (Krobitsch *et al.*, 1998). Allerdings zeigten die  $\Delta clpB$  Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp signifikant beschleunigte Differenzierung von der axenischen Amastigote zum promastigoten Stadium. Die Autoren postulieren daher, dass es sich bei ClpB um einen Antagonisten der Promastigotendifferenzierung handelt (Krobitsch *et al.*, 1999). Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang eine stark reduzierte Expression aller Mitglieder der A2-Proteinfamilie in amastigoten  $\Delta clpB$  Parasiten (Krobitsch *et al.*, 1998), deren Mitglieder als Virulenzfaktoren beschrieben worden sind (Zhang *et al.*, 1997). Wiesgigl und Clos (2001) postulieren daher antagonistische Rollen für HSP90 und ClpB während der Stadiendifferenzierung: während HSP90 das Promastigotenstadium aufrecht erhält (eine Inhibierung führt zu einer morphologischen Differenzierung und zur Expression mindestens einer amastigoten-spezifischen Proteinfamilie), ist ClpB ein Protein, das das Amastigotenstadium aufrecht erhält (da eine Deletion beider *clpB* Allele in eine schnelle Redifferenzierung von der Amastigote zur Promastigote, und in stark reduzierter Expression der Amastigoten-spezifischen A2-Proteinfamilie resultiert). Laut Wiesgigl und Clos (2001) besteht darin eine Möglichkeit primitiver Eukaryoten, regulatorische Wege über die balancierte Expression von Hitzeschockproteinen zu ersetzen.

In *in vitro* Makrophageninfektionen wurde zudem gezeigt, dass  $\Delta clpB$  Parasiten eine aberrante Morphologie aufwiesen, während jedoch die Anzahl von Wildtyp- und  $\Delta clpB$ -Parasiten innerhalb der Makrophagen ähnlich war (Krobitsch *et al.*, 1999).

Ein deutlicher Virulenzverlust wurde *in vivo* und *in vitro* auch an *L. major*  $\Delta clpB$  Deletionsmutanten beobachtet. In Makrophagen-Infektionsexperimenten zeigte lediglich ein geringer Prozentsatz der Makrophagen intrazelluläre Parasiten, die zudem eine untypische Morphologie aufwiesen (Hübel *et al.*, 1997). Weiterhin wurde eine verspätete bzw. fehlende Läsionsentwicklung bei infizierten BALB/c Mäusen beobachtet (Hübel *et al.*, 1997).

## 1.5 Funktionelle Komplementation

### 1.5.1 Prinzip der funktionellen Komplementation

Leishmanien werden vielfach als einfach zu handhabender, eukaryotischer Modellorganismus eingesetzt. Das Fehlen eines sexuellen Vermehrungszyklusses und die damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Anwendung klassischer, genetischer Kreuzungsstudien wurden durch die Entwicklung von Methoden zur Anwendung reverser Genetik kompensiert. Dazu gehören beispielsweise die stabile Etablierung episomaler Gene sowie die Entwicklung eines Transfektionsprotokolls zum Einbringen linearer DNA, welche durch homologe Rekombination in das Genom von *Leishmania* integriert werden kann. Auf diese Weise können Deletionsmutanten erzeugt werden, die nachfolgend einer *loss of function* Analyse unterzogen werden können. Solche Untersuchungen wurden in der Vergangenheit für viele Gene durchgeführt, und vielen Genen konnte auf diese Weise eine Funktion zugeordnet werden.

Allerdings ist auch diese sogenannte reverse Genetik nicht frei von Schwierigkeiten: Gendeletionen werden oft durch den Umstand erschwert, dass in den trypanosomatiden Parasiten viele Gene tandemartig in multi-Geneinheiten arrangiert sind, was ein Ausschalten aller Kopien oft unmöglich macht.

Zudem ist zunächst eine erste Identifizierung des zu untersuchenden Gens nötig, d.h. nur die Funktion bereits bekannter Gene kann auf diese Weise untersucht werden. Dabei sollte bei der Auswahl der zu untersuchenden Gene bedacht werden, dass die aus Datenbanken abgeleitete Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Eukaryoten nicht zwangsläufig eine Analogie der Funktion bedeuten muss, wie am Beispiel von ClpB Proteinen gezeigt wurde: In verschiedenen *Leishmania* spp. wurde das Homolog einer ClpB Protease identifiziert, das wie homologe Proteine in *S. cerevisiae* (HSP104) und *E.coli* (ClpB) durch einen Hitzeschock induzierbar war (Hübel *et al.*, 1995). Während jedoch HSP104 aus der Hefe für eine Erhöhung der Thermotoleranz in Hitze-gestressten Zellen verantwortlich war, konnte in der ClpB Deletionsmutante von *L. donovani* keine verminderte Thermotoleranz, und damit keine analoge Funktion für die ClpB Protease von *L. donovani* festgestellt werden (Krobitsch *et al.*, 1999).

Weiterhin kann eine *loss of function* Analyse oft zu uneindeutigen Ergebnissen führen, wenn es sich bei dem zu untersuchenden Gen um ein Schlüsselgen handelt, das für ein übergeordnetes Regulationsprotein codiert.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden befasst sich der Ansatz „*forward genetics*“ mit der Identifizierung von Genen, die einen definierten Phänotyp modifizieren. Durch funktionelle Komplementation von (Deletions-) Mutanten werden Gene oder Genfamilien identifiziert, deren Expression den Phänotyp einer beliebigen Mutante komplementieren. Auf diese Weise sind bereits einige molekulargenetische Beweise für die Funktion von Genen bzw. deren Genprodukte erbracht worden:

Das Oberflächenprotein gp63 von *Leishmania* wurde als Oberflächenligand für die Rezeptor-vermittelte Endozytose durch Makrophagen beschrieben. In einer avirulenten, gp63-defizienten Variante von *L. amazonensis* konnte durch das Einbringen eines Episoms mit einem Gen für gp63 die Kompetenz gesteigert werden, an Makrophagen zu binden (Liu *et al.*, 1992). Auch Lincoln *et al.* (2004) bewiesen durch funktionelle Komplementation, dass eine Expression des Oberflächenmarker PSA (*promastigote specific antigen*) in einem PSA-defizienten Stamm von *L. chagasi* zu einer 4-fachen Steigerung der Resistenz gegen Komplement-vermittelte Lyse führte.

Dieser Komplementierung eines Genotyps durch das Wiedereinbringen eines nachweislich deletierten oder stark herabregulierten Gens steht die Identifizierung unbekannter Gene oder Genfamilien gegenüber, die eine Komplementierung eines Deletionsphänotyps verursachen. Zu diesem Zweck wurde der Cosmid *shuttle* Vektor pcosTL entwickelt (Kelly *et al.*, 1994), der eine einfache und effiziente Verpackung fragmentierter *Leishmania* DNA in  $\lambda$ -Phagen ermöglicht. Zudem kann Cosmid DNA nach Reisolierung aus komplementierten, rekombinanten Leishmanien zur Transformation von *E. coli* eingesetzt werden, was eine nachfolgende Einzelklonanalyse ermöglicht.

Durch den Einsatz einer solchen Komplementationsanalyse wurden u.a. Gene identifiziert, die für die Synthese des Virulenzfaktors Lipophosphoglykan (LPG) eine Rolle spielen (Ryan *et al.*, 1993). In dieser Studie führte eine ungerichtete Mutagenese zu avirulenten, LPG-defizienten Leishmanien. Dabei wurde ein Klon isoliert, der sich durch einen Defekt in der Synthese des Glykan-Kerns von LPG auszeichnete. (LPG-). Durch Transfektion mit einer WT-Cosmidbank konnten rekombinante, komplementierte Parasiten gewonnen werden, die wieder eine Synthese von LPG vorweisen konnten. Die Reisolierung von Cosmiden aus diesen Stämmen und ihre anschließende Analyse führten u.a. zur Identifizierung des Gens LPG1, das vermutlich für eine Glykosyltransferase codiert. Diese katalysiert wahrscheinlich die Bindung des einzigen Galactofuranosemoleküls innerhalb des Glykan-Kerns, und führt damit wieder zur Synthese von vollständigem und funktionstüchtigem LPG.

Durch die funktionelle Komplementierung einer zweiten Mutante, die LPG-Moleküle ohne die charakteristischen Phosphodisaccharid-*repeat units* synthetisierte, wurde außerdem ein Gen identifiziert, das für ein Golgi-Membran Protein codiert (LPG2). Dieses Protein ist vermutlich an dem Transport eines LPG-Vorläufers oder eines synthetischen Enzyms in den Teil des Golgi-Apparates beteiligt, in dem die Zusammensetzung von LPG vervollständigt wird (Descoteaux *et al.*, 1995, Beverley *et al.*, 1995). Ein drittes Gen (LPG3), das LPG-defiziente Parasiten komplementiert, codiert für das *Leishmania*-Homolog des ER (endoplasmatisches Retikulum)-Chaperons GRP94.

### 1.5.2 Funktionelle Komplementation versus Kompensation

Bei der funktionellen Komplementation wird eine Deletionsmutante entweder mit dem deletierten Gen komplementiert, oder aber mit einem Gen, welches dieselbe Aufgabe wie das deletierte Gen erfüllt. Dem gegenüber steht die Kompensation, die einen Prozess bezeichnet, bei dem der ursprüngliche Phänotyp durch einen Umweg wiederhergestellt wird. Dabei wird das deletierte Gen oder ein Gen mit entsprechender Funktion nicht wieder in die Zelle eingebracht, sondern ein Prozess in Gang gesetzt, der das Fehlen des entsprechenden Gens über einen anderen Mechanismus kompensiert.

Ein Beispiel für eine solche Kompensation wurde von Späth *et al.* (2004) beschrieben: Das Gen LPG2 codiert für einen Golgi-GDP-Mannose-Transporter. LPG2-Deletionsmutanten sind nicht in der Lage, neben weiteren Phosphoglykanen funktionelles Lipophosphoglykan (LPG) zu synthetisieren, und zeigen einhergehend eine stark reduzierte Lebens- bzw. Replikationsfähigkeit in Makrophagen sowie einen apathogenen Phänotyp in Mausinfektionsexperimenten (Späth *et al.*, 2003). Während einer Infektionsstudie wurden jedoch LPG2-defiziente *L. major* Parasiten beobachtet, die zu einer im Vergleich zum Wildtyp verspäteten, aber progressiven Läsionsbildung in der Lage waren (Späth *et al.*, 2004). Eine funktionelle Komplementation durch Aktivierung eines alternativen GDP-Mannosetransporters wurde ausgeschlossen, da die Revertanten (lpg2-REV) wie ihre Ursprungszelllinie (lpg2-) keine Phosphoglykane synthetisierten. Folglich hat eine

Kompensation, d.h. ein alternativer Mechanismus zu der Fähigkeit geführt, in BALB/c Mäusen wieder eine Läsionsbildung zu induzieren.

In einer Studie von Pinelli *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass *L. infantum* infizierte Hunde-Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) die Proliferation von T-Lymphozyten sowie deren Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-Produktion reduzierten. Dieses resultierte aus einer verminderten Fähigkeit zur Stimulation der T-Zelle durch die APZ aufgrund einer reduzierten Expression des ko-stimulatorischen Moleküls B7. Eine Kompensation der mangelnden B7-Expression auf der Oberfläche der APZ konnte durch eine Inkubation der T-Lymphozyten mit der APZ und einer B7-exprimierenden Fibroblastenzelllinie erreicht werden. Somit hat keine funktionelle Komplementation der APZ durch Wiederherstellung der B7-Expression zur Optimierung der Proliferationsrate und IFN $\gamma$ -Produktion der T-Zellen geführt, sondern eine kompensatorische B7-Expression einer anderen Zelllinie.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Leishmanien durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus, in dessen Verlauf die Parasiten vom promastigoten zum amastigoten Stadium differenzieren. Während der Übertragung vom Insektenvektor auf den Säugwirt erfahren die Leishmanien eine Erhöhung der Umgebungstemperatur, die in einer Induktion der Hitzeschockantwort resultiert. Dabei werden HSP70 und HSP90 bereits in der Promastigote konstitutiv exprimiert, und erfahren vor dieser bereits hohen Hintergrundexpression nur eine leichte und vor allen Dingen transiente Expressionssteigerung (Brandau *et al.*, 1995). Das *Leishmania* HSP100 dagegen wird in der Promastigote nur in marginalen Mengen exprimiert, und erfährt eine deutliche Expressionssteigerung während der Stadiendifferenzierung, die im Amastigoten-Stadium erhalten bleibt (Hübel *et al.*, 1997). Durch die Deletion der beiden für HSP100 codierenden *clpB* Allele wurde gezeigt, dass die Expression von HSP100 für die Virulenz von *L. major* von entscheidender Bedeutung ist, und dass ein Selektionsdruck auf die Expression dieses Proteins im Amastigoten-Stadium besteht (Hübel *et al.*, 1997). Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, Einblicke in die Funktion von HSP100 zu erhalten.

Im Verlauf einer Routine-Mauspassage wurde eine sogenannte *L. major*  $\Delta clpB$  *escape*-Variante isoliert, die trotz des Verlustes der beiden *clpB* Allele Infektionen in BALB/c Mäusen verursachte. Die Untersuchung dieser *escape*-Variante im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Identifizierung des Mechanismus führen, anhand dessen der Verlust von HSP100 überbrückt werden konnte. Die Untersuchung dieses komplementierenden oder kompensierenden Mechanismus sollte Aufschluss darüber geben, welche molekulare Funktion HSP100 in *Leishmania* ausübt. Dazu sollten sowohl der Einfluss der *escape*-Parasiten bzw. des *escape*-Mechanismus auf die Immunreaktion des Wirtes (beispielhaft im Tiermodell der BALB/c Maus) als auch die virulenten *escape*-Parasiten selbst untersucht werden.

Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte bereits gezeigt werden, dass HSP70 und HSP104 zu einem gewissen Grad die Aufgaben des jeweils anderen Proteins übernehmen können. Da bereits bekannt ist, dass Leishmanien unter Selektionsdruck dazu neigen, relevante Gene zu amplifizieren bzw. die Expression des Genproduktes zu erhöhen, sollte in Proteom-Studien untersucht werden, ob auch in *Leishmania* der Verlust von HSP100 durch die verstärkte Expression anderer, funktionell homologer Gene überbrückt werden konnte.

Eine genetische Komplementationsstudie sollte weiterhin darüber Aufschluss geben, ob das Fehlen von HSP100 durch gezielte Überexpression relevanter Genomabschnitte kompensiert werden kann. Dazu sollte eine Cosmid-Genbank hergestellt und in *L. major*  $\Delta clpB$  transfiziert werden, um anschließend in Mausinfektionsexperimenten auf virulente Parasiten zu selektieren. Eine Untersuchung der Virulenz-vermittelnden Cosmide sollte dann zur Identifizierung relevanter offener Leserahmen führen, deren Überexpression den Funktionsverlust von HSP100 aufheben können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Adenin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Ampicillin	Grünenthal, Aachen
ASB 14	Calbiochem, San Diego, U.S.A.
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
BCIP	Biomol, Hamburg
6-Biopterin	Fluka, Buchs, Schweiz
Bleocin	Calbiochem, San Diego, U.S.A.
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, St. Louis, U.S.A.
CHAPS	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt
CTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dry Strip Cover Fluid	PlusOne, Pharmacia, Uppsala, Schweden
DTT	Biomol, Hamburg
E 64	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA	Serva, Heidelberg
EGTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
FCS	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticinsulfat (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
Giensa	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Agar Scientific, Stansted, England
Glycin	Biomol, Hamburg
Glycerin	PlusOne, Pharmacia, Uppsala, Schweden
GTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Haemin	Serva, Heidelberg

Harnstoff	PlusOne, Pharmacia, Uppsala, Schweden
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Biomol, Hamburg
Hexanukleotidgemisch	Roche Diagnostics, Mannheim
Hygromycin	PAA, Cölbe
Iodoacetamid	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Calbiochem, La Jolla, U.S.A.
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Merck, Darmstadt
L.R. White	London Resign Company, Berkshire, England
M199-Medium	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Magermilchpulver	TSI, Zeven
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maltose	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Serva, Heidelberg
NBT	Biomol, Hamburg
Nourseothricin	Werner BioAgents, Jena
Ortho-Phenantrolin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penstrept	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Puromycin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Silbernitrat	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	PlusOne, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
TTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Tween 20	Sigma, St. Louis, U.S.A.
UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylenylanol	Merck, Darmstadt

**2.1.2. Kits**

DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Easy Pure DNA Purification Kit	Biozym, Hess. Oldendorf
Gigapack®III Gold Packaging Extract	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Master Amp™ PCR Optimization Kit	Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
Master Amp™ Extra Long PCR Kit	Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
Master Amp™ PCR Failsafe Kit	Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.
Puregene DNA Purification Kit	Gentra Systems, Minneapolis, U.S.A.
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Super Sensitive Immunodetection Kit	Biogenex, San Ramon, U.S.A.
Luminescent Substrate Kit	Pierce Technology, Inc., Rockford, U.S.A.

**2.1.3 Membranen**

PVDF-Membran	Pall Europe. Portsmouth, England
Qiabranen Nylonmembranen	Qiagen, Hilden
Protran BA 85	Schleicher und Schuell, Dassel

**2.1.4 Marker**

DNA-Längenstandards:	
1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Lambda DNA	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Lambda DNA-HindIII-Marker	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>S. cerevisiae</i> strain YPH80	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.

## Protein-Längenstandards:

Prestained Protein Ladder,	
10-180kDa	Fermentas, Vilnius, Litauen
Page Ruler™ Protein Ladder,	
10-200kDa	Fermentas, Vilnius, Litauen

**2.1.5 Enzyme**

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
RNase A	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Taq-Polymerase	Promega, Madison, U.S.A.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, U.S.A. Fermentas, Vilnius, Litauen

**2.1.6 Antikörper**

anti-HSP100 IgY	Sven Brandau, BNI, Hamburg
anti-L8C4	Keith Gull, Oxford University, England
anti-L13D6	Keith Gull, Oxford University, England
anti-Huhn-IgG-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-AP-Konjugat	Dianova, Hamburg

anti-Maus-Cy3 Konjugat	Dianova, Hamburg
anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche Diagnostics, Mannheim
FACS-Analysen:	
anti-CD4-PE (Phycoerythrin)	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg
anti- $\gamma\delta$ -T-Zellen-FITC	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg
NK-Zellen-PE	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-CD19-FITC	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-CD11c	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-CD3-FITC	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg
anti-CD11b-PE	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg
anti-CD25-PE	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg
anti-CD86-PE	Caltag Laboratories Intl. GmbH, Hamburg

### 2.1.7. Geräte und Sonstiges

Immobiline™ Dry Strips	Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden
Ettan IPGphor	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
CASY-Zellcounter & Analyzer	Schärfe System, Reutlingen
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
GenePulser™	BioRad, München
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Röntgenfilme Biomax MR	Eastman Kodak, Rochester, U.S.A.
Stratalinker	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
3 MM Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Rotaphor Typ 5	Biometra, Göttingen
Histokinette	E. Vieth, Mikrotome GmbH, Wiesmoor
J2-21 Zentrifuge	Beckmann, Palo Alto, U.S.A.
J2-HS Zentrifuge	Beckmann, Palo Alto, U.S.A.
Invertoskop ID03	Zeiss, Oberkochen
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.8 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$ Subcloning Efficiency	
Competent Cells	Gibco BRL
DH5 $\alpha$ Library Efficiency Cells	Gibco BRL

### 2.1.9 *Leishmania*-Stämme

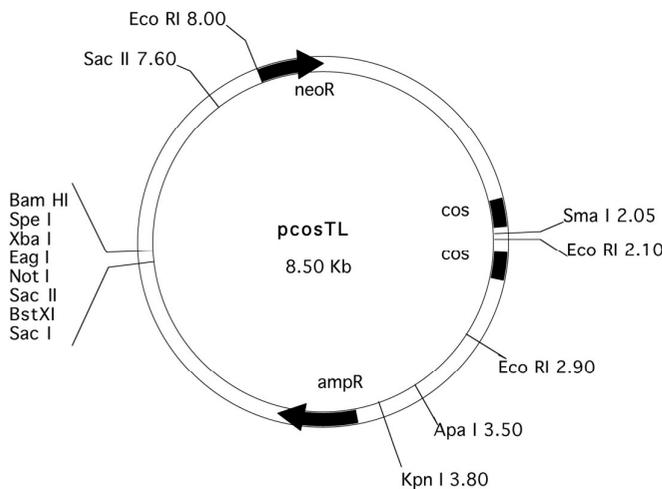
Alle Versuche wurden mit dem von der WHO empfohlenen *Leishmania major* Referenzstamm MHOM/SU/73/5ASKH durchgeführt. Der Stamm wurde uns

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

### 2.1.10 Vektoren und Plasmide

#### pCosTL:

Der Cosmid Vektor wurde von J. M. Kelly (Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um einen *cosmid shuttle vector* mit einer Größe von 8,5 kb, der für das Einbringen großer DNA-Fragmente in *Trypanosoma* und *Leishmania* konstruiert wurde (Kelly *et al.*, 1994). Auf der in Abbildung I gezeigten Plasmidkarte sind die relevanten Sequenzabschnitte markiert: Die Klonierung langer DNA-Abschnitte erfolgte im Fall der Cosmid-DNA-Bank in die BamHI *site* in der multiplen Klonierungsstelle. Über die *cos sites* wurde der linearisierte Vektor in Phagenpartickel verpackt. Die Selektion auf rekombinante Bakterien erfolgte über die Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Lactamase), und auf rekombinante Leishmanien über die Neomycinresistenz (Neomycinphosphotransferase).



**Abbildung I: Vektorkarte pCosTL.** Die Schwarzen Pfeile deuten die Neomycin- und Ampicillin-Resistenzgene an (neoR und ampR). Die *cos sites* (cos) können durch SmaI- oder EcoRI-Restriktionsverdau getrennt werden. Weitere Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls mit Angabe der Position in der Vektorsequenz gekennzeichnet.

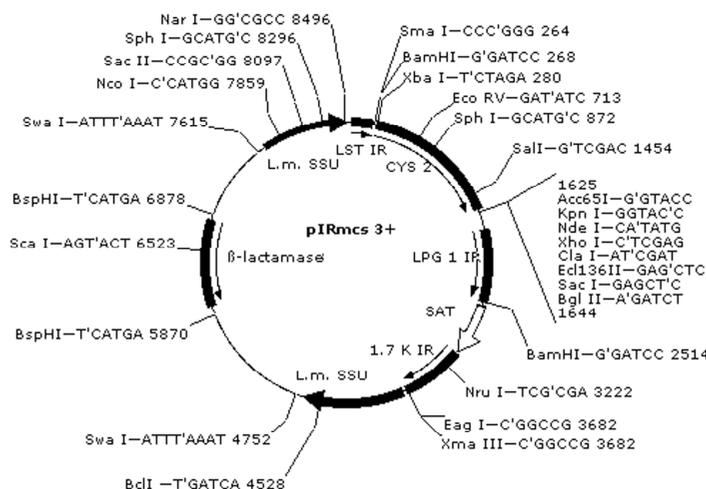
#### pIRmcs3+

Dieser Vektor ist ein Derivat des Plasmids pIRSAT, das von S. Beverley (Washington University Medical School, St. Louis) zur Verfügung gestellt wurde.

Durch J. Clos (BNI Hamburg) wurde die HindIII *site* im Vektorrückgrat entfernt (unveröffentlicht), so dass pIRSAT3 entstand. Mcs3+ bezeichnet dabei die Orientierung der multiplen Klonierungsstelle.

Der Vektor erlaubt eine stadienspezifische Expression im promastigoten oder amastigoten Stadium durch zwei unterschiedliche, von verschiedenen flankierenden Sequenzen regulierte Klonierungsstellen. Dabei wird die Promastigoten-spezifische Klonierungsstelle von der 3'UTR des promastigoten spezifischen LPGs reguliert. Die 3'UTR einer Amastigoten-spezifischen Cysteinproteinase aus *L. mexicana mexicana* kontrolliert die Expression aus der Amastigoten-spezifischen Expressionsstelle. Durch eine Restriktionsverdau mit SwaI wird der Vektor linearisiert, und kann durch homologe Rekombination stabil in den *small subunit rRNA locus* ins Genom integriert werden. Die Transkription dieses *locus* durch die RNA-Polymerase I gewährleistet eine effiziente Expression der rekombinanten Gene.

Die Selektion rekombinanter Leishmanien erfolgt mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Nourseothricin (SAT), die Selektion in den Bakterien mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin.



**Abbildung II: Vektorkarte pIRmcs3+.** 1625 bp-1644 bp: multiple Klonierungsstelle (mcs) für die Promastigoten-spezifische Expressions-*site* unter der Kontrolle von LPG1 IR (Lipophosphoglykan 1 intergenische Region). 264 bp-280 bp: mcs für die Amastigoten-spezifische Expressions-*site* unter der Kontrolle von CYS 2 (Cystein-Proteinase 2). SAT: Noursithricin-Resistenzgen für Selektion in Leishmanien; L.m. SSU: *L. major small Subunit*,  $\beta$ -Lactamase. Ampicillin-Resistenzgen für Selektion in *E. coli*. Restriktionsschnittstellen sind mit Angabe der Erkennungssequenz und Lokalisatin (in bp) angegeben.

### 2.2.11 Oligonukleotidstarter

Amplifikation des offenen Leserasters von pfr1d:

# 7528, PFR1D-BclI: 5`-GGGTGATCACAGCTCCAGCTGCGCGCTC-3`

# 7529, PFR1D-KpnI: 5`-GGGGTACCATGATGACCCCTGAAGATG-3`

Ansequenzierung von pCosTL:

CH2: 5`-CCGTGTGATATCAGATGGCCC-3`

M13R (revers): 5`-GGAAACAGCTATGACCATG-3`

real time PCR :

5`-Oligonukleotid: 5`-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3`

3`-Oligonukleotid: 3`-TGGGTATGGAATCCTGTGGCATCC-3`

real time-Probe: 5`-(FAM)TATGCTC(TAMRA)TCCCTCACGCCATCCTGCGT-3`

### 2.1.12 häufig verwendete Puffer

1x PBS	2,6 mM Kaliumchlorid
	1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	136 mM Natriumchlorid
	8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl

	1 mM EDTA
low TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
1x TBE-Puffer	89 mM Tris-Borat 2 mM EDTA
1x TBA-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM Natriumchlorid
FACS-Puffer	1xPBS 1% FCS 0,1% Natriumazid

### 2.1.13 häufig verwendete Medien

M199 pH 7,0:	1x M199-Medium 20 % Hitze-inaktiviertes FCS 0,2 % Natriumhydrogencarbonat 20 µg/ ml Gentamicin 2 mM L-Glutamin
Modifiziertes M199 pH 7,0:	1x M199-Medium 20 % Hitze-inaktiviertes FCS 40 mM HEPES (pH 7,4) 0,2 % Natriumhydrogencarbonat 100 µM Adenin 1,2 µg/ml 6-Biopterin 10 µg/ml Haemin 20 µg/ml Gentamicin 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium:	30 % M199-Medium 50 % Hitze-inaktiviertes FCS 20 % DMSO
DC Kulturmedium	1x RPMI Medium 10 % FCS 2 mM L-Glutamin
LB-Medium	2 % LB Broth

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur von promastigoten Leishmanien

Das promastigote Stadium von *Leishmania*-Zellen wurde in M199 pH 7,0 bei 25°C in Polystyren-Zellkulturflaschen (Greiner) kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde dem Medium ein Antibiotikum in entsprechender Konzentration zugefügt. Sobald die Zellen

die spätlogarithmische bzw. stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, wurden sie mit einer Verdünnung von 1:1000 (*L. donovani*) oder 1:500 (*L. major*) in frisches M199 pH 7,0 eingesäht, um ein fortlaufend exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Die Zelldichte wurde dabei anhand einer Doppelbestimmung mit einem CASY 1-Cell Counter & Analyser (Schärfe System) bestimmt.

### 2.2.2 Einfrieren von *Leishmania*-Stammkulturen

Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden sedimentiert (720xg, 10 Minuten, 4°C) und in einem Gemisch aus 500 µl M199 pH 7,0 und 500 µl Einfriermedium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von  $1-2 \times 10^8$  /ml eingestellt wurde. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Cryoröhrchen (Nunc) überführt, für wenigstens 2 Stunden (oder maximal über Nacht) bei -70°C gelagert, und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.2.3 Transfektion von *Leishmanien* durch Elektroporation

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

Bei der Elektroporation wird eine Zellsuspension zusammen mit der zu transfizierenden DNA kurzen, elektrischen Impulsen ausgesetzt. Dadurch entstehen Poren in den Zellmembranen, durch die die DNA von den Zellen aufgenommen wird. Die Methode zur Transfektion von *Leishmania* wurde von Kapler *et al.* (1990) etabliert.

Zur Transfektion wurden Zellen der logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Diese wurden sedimentiert (720xg, 10 Minuten, 4°C), zweimal mit eiskaltem PBS und einmal mit Elektroporationspuffer gewaschen. Das Sediment wurde anschließend so in Elektroporationspuffer resuspendiert, dass eine Zelldichte von  $1 \times 10^8$  eingestellt wurde. 400 µl (entspricht  $4 \times 10^7$  Zellen) dieser Zellsuspension wurden zusammen mit der DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm) gegeben. Für eine Integration von linearer DNA durch homologe Rekombiantion wurde jedem Ansatz 2 µg DNA zugegeben, für eine episomale Etablierung der DNA wurden 50 µg benötigt. Als Kontrolle wurde 1 Ansatz ohne DNA („Mock“) transfiziert. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser™ (Biorad) durch dreimalige Stromstöße bei 1,5 kV (3750V/cm), 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm. Die Zeitkonstante betrug zwischen 0,5 und 1 ms. Anschließend wurden die Ansätze für 10 Minuten auf Eis gelagert, bevor die in 10 ml modifiziertes M199 pH 7,0 (mit 1x Penicillin/Streptomycin, von 100x Stock, Invitrogen) überführt und für 24 Stunden bei 25°C inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurden die Zellen sedimentiert (720xg, 10 Minuten, Raumtemperatur) und in 10 ml frischem, modifiziertem M199 pH 7,0 aufgenommen. Dem Medium wurden dann zur Selektion rekombinanter Zellen je nach transfiziertem Vektor-Konstrukt Antibiotika in entsprechender Konzentration zugegeben: G418: 50 µg/ml, Nourseothricin. 150 µg/ml, Puromycin: 45 µM, Hygromycin: 50 µg/ml.

Die Selektion auf rekombinante *Leishmanien* war abgeschlossen, sobald die Kontroll-Zellen (Transfektion ohne DNA) tot waren.

#### 2.2.4 Vereinzeln von Zellpopulationen

Die Vereinzeln von Zellpopulationen zu Einzelklonen erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten (Nunc). Dazu wurde zunächst die Zellpopulation auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$ /ml eingestellt. In einer seriellen Verdünnung wurden die Parasiten dann nacheinander zu einer Zelldichte von  $10^6$ /ml,  $10^5$ /ml,  $10^4$ /ml,  $10^3$ /ml,  $10^2$ /ml und 5 Zellen/ml in modifiziertes M199 mit 1xPenicillin/Streptomycin (100x Penstrept, Sigma) sowie ggf. dem Selektionsantibiotikum eingesät. Da sich nun eine rechnerische Konzentration von 1 Zelle pro 200  $\mu$ l Medium ergab, wurden die wells einer Mikrotiterplatte mit 200  $\mu$ l der letzten Verdünnungsstufe beimpft. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm umschlossen und bei 25°C inkubiert, bis ein Anwachsen der Einzelklone zu verzeichnen war. Waren ein Drittel bis die Hälfte aller wells der Mikrotiterplatte bewachsen, wurde davon ausgegangen, dass es sich um vereinzelt Zellklone handelt. Diese wurden dann aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in Kulturflaschen überführt, und als Einzelklone weiterkultiviert.

#### 2.2.5 Vorbereitung von Leishmanien für eine *in vivo* oder *in vitro* Infektion

Sowohl für eine *in vivo* als auch für eine *in vitro* Infektion wurden Leishmanien aus der spätstationären Wachstumsphase eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in modifiziertem M199 pH 7,0 gehalten. Unter täglichem Mediumwechsel 2-3 Tage vor der Infektion wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von  $2-5 \times 10^7$  kultiviert. Die gewünschte Zellzahl wurde sedimentiert (720xg, 4°C, 10 Minuten) und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Für eine *in vivo* Infektion wurden die Leishmanien üblicherweise mit einer Konzentration von  $2-5 \times 10^7/20 \mu$ l PBS aufgenommen, für eine *in vitro* Makrophageninfektion in modifiziertem M199 Medium ( $1 \times 10^6$ /ml)

#### 2.2.6 Isolierung von Peritonealmakrophagen und *in vitro* Infektion

Zur *in vitro* Infektion wurden Peritonealmakrophagen aus NMRI Mäusen eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Fell vom Bauchraum getöteter Mäuse entfernt. Durch das Bauchfell wurde mit einer Kanüle 5 ml PBS pH 7,0 in den Bauchraum gespritzt, und durch leichtes Massieren des Bauchraums die adhärennten Makrophagen von Organen gelöst. Nach ca. 2 Minuten wurde das PBS mit einer Kanüle aus dem Bauchraum zurückgewonnen und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Diese Prozedur wurde bis zu dreimal wiederholt, bevor ca. 2  $\mu$ l dieser Makrophagensuspension auf einem Objektträger ausgestrichen und mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht wurden. Im Fall einer bakteriellen Kontamination wurden die Makrophagen verworfen, da bereits sehr geringe Mengen von bakteriellen LPS ausreichen, um Makrophagen zu aktivieren. Eine Kontamination mit Erythrozyten wurde durch eine Behandlung mit Erythrozyten-Lysepuffer bereinigt. Dazu wurden die Makrophagen zunächst sedimentiert (690xg, 4°C, 10 Minuten). Das Sediment wurde in frisch angesetzten Lysepuffer (0,144 M Ammoniumchlorid; 0,17 M Tris) resuspendiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch erhebliches Verdünnen des Lysepuffers durch Zugabe von 2 Volumen PBS gestoppt und die Makrophagen erneut sedimentiert (690xg, 4°C, 10 Minuten). Das Sediment wurde zweimal mit Medium gewaschen, bevor die Makrophagen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt wurden. Je 200  $\mu$ l dieser Makrophagensuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) wurde in eine Kammer eines Objektträgers überführt, und zum Anheften der Makrophagen entweder über Nacht, wenigstens jedoch 2 Stunden bei 37°C gehalten.

Leishmanien wurden wie unter 2.2.5 beschrieben auf eine Infektion vorbereitet und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in modifiziertem M199 pH 7,0 mit Penicillin/Streptomycin eingestellt. Je 200  $\mu$ l der Makrophagensuspension ( $2 \times 10^5$ ) wurde in eine Kammer der

*chamber slides* pipettiert, so dass die Makrophagen theoretisch mit einer *moi* (*multiplicity of infection*) von 1 infiziert wurden. Die *chamber slides* wurden für 4 Stunden bei 35°C unter CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, um noch freie promastigote Leishmanien zu entfernen. Nach einem Waschschriff mit je 500 µl modifiziertem M199 Medium wurden die Zellen mit 400 µl modifiziertem M199 Medium überschichtet und für 24 bzw. 48 Stunden bei 35°C inkubiert.

Zu den zu untersuchenden Zeitpunkten nach Infektionsbeginn wurde der Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit PBS pH 5,5 gewaschen, getrocknet und 2 Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Die Objektträger wurden anschließend mit Giemsa gefärbt (siehe 2.2.40) und mikroskopisch untersucht.

### **2.2.7 In vivo Infektion von BALB/c Mäusen**

Für eine Infektion von BALB/c Mäusen wurden die Zellen wie unter 2.2.5 beschrieben vorbereitet. Üblicherweise wurden  $1-5 \times 10^7$  Zellen subkutan in den hinteren, rechten Fußballen weiblicher BALB/c Mäuse inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde über 10-20 Wochen verfolgt, und in Form von wöchentlicher Fußdickenmessung dokumentiert. Dabei wurde die Läsionsbildung als Differenz der Fußdicke zwischen infiziertem und uninfiziertem Fuß definiert. Sobald die Läsionen ulzerierten wurden die Mäuse getötet, um eine Superinfektion der Läsionen zu verhindern. Der Fuß sowie der drainierende Lymphknoten wurden entfernt, mit dem Stempel einer Spritze homogenisiert und in je 10 ml modifiziertem M199 pH 7,0 mit Penicilin/Streptomycin aufgenommen. Bei einer Kultivierung bei 25°C konnten promastigote Leishmanien angezogen werden, die dann zur weiteren Charakterisierung sowie zur Isolierung von Cosmid-DNA eingesetzt wurden.

### **2.2.8 Subkutane Infektion Die *air pouch* Methode**

Die sogenannte *air pouch* Methode wurde von Laufs *et al.* (2002) beschrieben, und eignet sich, um eine Analyse der ersten einwandernden Immunzellen am Infektionsort vorzunehmen. Dabei wird einer Maus zunächst dorsal ein Luftsack appliziert, in dem mit einer sterilen Kanüle 2 ml Luft subkutan injiziert werden. In diesen Luftsack werden definierte Mengen Leishmanien gespritzt, die wie unter 2.2.5 vorbereitet worden sind. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Mäuse getötet, und die Infiltrate aus dem Luftsack durch mehrmaliges Spülen mit PBS reisoliert. Die weitere Analyse der Infiltrate erfolgte durch FACS Analysen (*fluorescence associated cell sorting*).

### **2.2.9 Reisolation von Parasiten aus infiziertem Gewebe**

Um Parasiten aus Milz, Fußballen und Lymphknoten zu reisolieren, wurden infizierte Mäuse getötet und ihnen die entsprechenden Organe entnommen. Milz und Lymphknoten wurden in sterilen Petrischalen unter Zugabe von 3 ml modifiziertem M199 Medium mit Hilfe eines Stempels zermörsert, und anschließend in 7 ml modifiziertes M199 mit 1x Penicillin/Streptomycin (100x Penstrept, Sigma) überführt (Gesamtvolumen 10 ml). Die Fußläsion am präparierten Fuß wurde mit Hilfe eines Skalpell geöffnet und ebenfalls in 10 ml modifiziertes M199 mit 1x Penicillin/Streptomycin gegeben. Bei der Reisolation rekombinanter Parasiten wurden dem Medium zusätzlich die entsprechende Menge Selektionsantibiotikum zugesetzt, bei Cosmid-tragenden Leishmanien üblicherweise 50 µg/ml G418. Die anwachsenden Parasiten wurden ca. alle 2 Tage so lange in frisches Medium verdünnt, bis Gewebereste und Lymphozyten größtenteils aus der Kultur ausverdünnt waren.

## 2.2.10 Isolierung von DNA

### 2.2.10.1 Isolierung von Cosmid-DNA aus Leishmanien

Lösung 1: 50 mM Glukose  
10 mM EDTA  
25 mM Tris HCl pH 8,0

Lösung 2: 200 mM Natriumhydroxid  
1% SDS

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat  
2 M Essigsäure

Zur Isolation von Comisd-DNA aus Leishmanien wurden 100 ml einer frühstationären Kultur eingesetzt (ca.  $2 \times 10^7$ /ml). Die Zellen wurden zunächst sedimentiert (720xg, 4°C, 10 Minuten), und zweimal mit sterilem PBS pH 7,0 gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in 3 ml Lösung 1 aufgenommen. Nach der Zugabe von 6 ml Lösung 2 wurde das Lysat für 5 Minuten auf einem Rollenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 4,5 ml Lösung 3, und nach kurzem Schütteln einen Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (3200xg, 30 Minuten, 4°C) sedimentiert, und durch eine Filtration des Überstandes durch ein Filterpapier von der DNA-haltigen Lösung getrennt. Ein Rnase-Verdau (40 µg/ml) für mindestens 30 Minuten bei 37°C degradierte die enthaltene RNA. Durch eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung wurden die Proteine aus der Lösung extrahiert. Dazu wurde die Lösung mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt, und 5 Minuten bei 3200xg zentrifugiert (Raumtemperatur). Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde diese erneut mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, und nach 5-minütigem Schütteln erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in einem frischen Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine 30-minütige Zentrifugation bei 3200xg bei Raumtemperatur sedimentierte die Cosmid-DNA. Diese wurde anschließend mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (20 Minuten, 3200xg, Raumtemperatur), und nach kurzem Trocknen in 20-40 µl TE-Puffer gelöst (über Nacht im Kühlschrank, oder mindestens eine Stunde bei 37°C).

### 2.2.10.2 Plasmidisoliation durch alkalische Lyse: Minipräparation

Jeweils 2 ml LB Flüssigmedium mit 100 µg/ml Selektionsantibiotikum wurden mit einer frisch transformierten Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator gehalten. Am folgenden Tag wurden die Kulturen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien sedimentiert (16000xg, 10 Minuten, RT). Das Sediment wurde durch vortexen in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, mit 200 µl Lösung 2 versehen und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 150 µl Lösung 3 wurden die Ansätze gut geschüttelt und 5 Minuten auf Eis gehalten. Eine Zentrifugation (16000xg, 20 Minuten, 4°C) trennte denaturierte Protein vom DNA-haltigem Überstand. Dieser wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol versehen und vorsichtig geschwenkt. Die Sedimentierung der DNA erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 3200xg. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Sediment in 20-30 µl TE Puffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C gelöst. Im Anschluss wurde die gewonnene Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt und das Fragmentmuster in einem Angarosegel analysiert.

### 2.2.10.3 Maxipräparation mit dem Qiagen Maxi-Kit

Zur Gewinnung größerer Mengen DNA wurde eine Plasmidpräparation in größerem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 200 ml LB Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft, wenn eine Plasmidpräparation durchgeführt werden sollte. Sollten Cosmide isoliert werden, wurden 400 ml LB Flüssigmedium beimpft, da Cosmide in den Bakterien in geringerer Kopienzahl vorliegen als Plasmide. Die Kulturen wurden jeweils über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Bakterien sedimentiert, in 8 ml Lösung 1 resuspendiert, mit 16 ml Lösung 2 versetzt, 5 Minuten auf dem Rollenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, und mit 12 ml Lösung 3 10 Minuten auf Eis gehalten. Eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16000xg sedimentierte denaturiertes Protein und Zelltrümmer. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und mit 40 µg/ml Rnase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dessen wurden die Säulchen mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen, und die an das Säulenmaterial gebundene DNA zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit je 10 ml auf 50°C erwärmten QF-Puffer. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versehen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA bei 3200xg (30 Minuten, RT) sedimentiert wurde. Das Sediment wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, anschließend von Ethanolrückständen befreit, und über Nacht in ca. 400 µl TE-Puffer gelöst.

### 2.2.10.4 Isolierung von DNA aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus dem Gewebe *Leishmania*-infizierter Mäuse erfolgte mit Hilfe des Puregene® DNA Purification Kit, Gentra Systems nach dem Protokoll für DNA-Isolierung aus 50-100 mg festem Gewebe.

Nach der Präparation der Lymphknoten wurden diese in einem 1,5 ml-Eppendorf Gefäß mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Die homogenisierten Organe wurden mit 3 ml *Cell Lysis Solution* in ein 15-ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt, unter Zugabe von 300 µg Proteinase K gemischt und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Am folgenden Tag wurden je nach Lysegrad der homogenisierten Lymphknoten weitere 300 µg Proteinase K zugegeben und so lange inkubiert, bis sich die Geweberückstände vollständig gelöst hatten. Unter Zugabe von 60 µg RNase A wurden die Ansätze 30 Minuten bei 37°C gehalten. Durch Zugabe von je 1 ml *Protein Precipitation Solution* und anschließendem kräftigem Mischen (20 Sekunden, Vortex) wurden die Proteine des Homogenats präzipitiert. Eine folgende Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000xg sedimentierte die ausgefallenen Proteine. Der Überstand wurde in eine frisches 15-ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt, in welches zuvor 3 ml Isopropanol vorgelegt wurden. Die Proben wurden durch 50-maliges Schwenken gemischt, und die DNA durch anschließende Zentrifugation für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 2000xg pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde die DNA unter Zugabe von 3 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute Raumtemperatur, 2000xg) wurde der Überstand entfernt, das Pellet 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, und unter Zugabe von 150 µl Hydrationslösung für eine Stunde bei 65°C resuspendiert. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei 4-8°C im Kühlschrank.

### 2.2.10.5 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA

Zur Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA für die Konstruktion einer Cosmid-Genbank wurden  $4 \times 10^9$  Leishmanien eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert

(720xg, 10 Minuten, 4°C) und anschließend zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen. Das Sediment wurde nach dem letzten Waschschrift in 4 ml TE Puffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  /ml eingestellt wurde. Je 2 ml dieser Suspension wurden in jeweils einen 100 ml Erlenmeyerklöben überführt, mit 20 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0; 20 µg/ml RNase A; 0,5 % SDS) versehen, und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktion 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und für weitere 3 Stunden bei 50°C inkubiert. Nachdem das Zellysate auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde eine 3-malige Extraktion mit je 1 Volumen Phenol pH 8,0 durchgeführt. Dazu wurde die mit Phenol versehenen Lysate 10-15 Minuten vorsichtig bei Raumtemperatur geschwenkt, bevor die Phasentrennung durch 15-minütiges Stehenlassen bei Raumtemperatur erfolgte. Die letzte Phasentrennung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur, bevor am folgenden Tag die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde (maximal 12,5 ml pro Reaktionsgefäß). Zur Präzipitierung der DNA wurden der wässrigen Phase 1/5 Volumen 10 M Ammoniumacetat sowie 2 Volumen Ethanol zugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die DNA ausgefällt. Zur Isolierung der DNA aus dem Reaktionsgefäß wurde mit einem Bunsenbrenner die Spitze einer Pasteurpipette erhitzt und zu einem Haken geformt. Unter Zuhilfenahme dieser Pipette wurde die DNA aus der Lösung isoliert und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann in 500 µl TE Puffer für 24 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt, und ihre Qualität in einem Agarosegel überprüft.

## 2.2.11 Herstellung einer Cosmid-DNA-Bank

### 2.2.11.1 Partialverdau von genomischer DNA und Vorbereitung der DNA Fragmente

Die Herstellung einer Cosmidbank erfolgt durch das Klonieren von DNA Fragmenten in einen Cosmid *shuttle* Vektor. Die erforderlichen DNA Fragmente sollten möglichst zufällig und unabhängig von ihrer Sequenz entstehen, und eine Größe von 30-45 kb aufweisen.

Zunächst wurde dazu hochmolekulare, genomische DNA isoliert (siehe 2.2.10.4) und mit *low* TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0) auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt. Durch einen partiellen Restriktionsverdau sollte die DNA in Fragmente der erforderlichen Größe zerlegt werden. In unserem Fall wurde das Enzym Sau3A gewählt, welches die häufig auftretende Tetranukleotidsequenz GATC erkennt und schneidet.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde je 5 µg DNA (25 µl der Ausgangsverdünnung) mit verschiedenen Enzymkonzentrationen verdaut. Die Inkubation bei 37°C wurde nach exakt einer Stunde durch die Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 25 mM und durch Inkubation für 10 Minuten bei 70°C gestoppt. Durch eine anschließende Gelelektrophorese wurden die DNA Fragmente in einem 0,35 %igen Agarosegel aufgetrennt. Auf diese Weise konnte die Enzymkonzentration ermittelt werden, die die DNA Fragmente der gewünschten Größe liefert.

In präparativen Ansätzen wurden insgesamt 80 µg genomische DNA in 40 einzelnen Reaktion mit je 5 µg DNA mit der ermittelten optimalen Enzymkonzentration (0,0825 U/µg DNA) für eine Stunde bei 37°C verdaut. Ein weiterer Ansatz wurde zur Kontrolle unter den gleichen Bedingungen verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nachdem sichergestellt wurde, dass die Banden der erforderlichen Größe im Kontrollansatz vorhanden sind, wurden die präparativen Ansätze in ein Reaktionsgefäß überführt, und mit 1/10 Volumen Ammoniumacetat sowie 3 Volumen Ethanol einer Präzipitation unterzogen. Die gefällte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, und in *Aqua dest.* resuspendiert. In einer anschließenden Dephosphorylierungsreaktion wurden an den 5' Enden der DNA Fragmente

die Phosphatgruppen entfernt (siehe 2.2.11.1). Dadurch sollte eine Concatemerbildung durch kleinere DNA Moleküle unterbunden werden, die im Genom normalerweise nicht benachbart vorliegen. Durch eine solche Concatemerbildung würde die benötigte Fragmentgröße erreicht werden, um in Phagenpartikel verpackt zu werden.

#### **2.2.11.2 Vorbereitung des Vectors pCosTL**

Der vorbereitete Cosmid *shuttle* Vektor pCosTL wurde mir freundlicherweise von K. Mellenthin zur Verfügung gestellt.

Durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease SmaI wurden zunächst die beiden *cos sites* im Vektor getrennt. Eine anschließende Dephosphorylierung sollte eine Religation der entstandenen glatten Enden verhindern. Ein BamHI Verdau des linearisierten Vektors lieferte Vektorarme mit Sau3A kompatible Enden.

#### **2.2.11.3 Ligation der DNA Fragmente mit dem Cosmidvektor pCosTL**

Die Vektorarme können theoretisch über ihre BamHI Enden religieren. Die auf diesem Weg entstehenden Vektorarm-Dimere weisen jedoch nur eine Größe von 8,5 kb auf und würden damit die untere Verpackungsgrenze der Phagenpartikel unterschreiten. Aus diesem Grund kann der Vektor in einem molaren Überschuß eingesetzt werden (molares Verhältnis Vektor: Insert ist gleich 10:1), ohne dass mit einem steigendem Anteil von Cosmiden ohne Insert gerechnet werden muß. In unserem Fall wurden 1 µg Insert mit 2,13 µg Vektor ligiert.

Die Ligationsreaktion wurde 5 mM ATP zugegeben, da eine hohe ATP Konzentration die Ligation der als *blunt ends* vorliegenden *cos sites* bei eventuell unvollständiger Dephosphorylierung verhindern sollte. Aus demselben Grund fand die Ligation bei niedriger Ligase Konzentration statt (1 Weiss Unit).

#### **2.2.11.4 Verpackung des Ligationsansatzes in Phagenpartikel: Vorbereitung der Wirtsbakterien**

Die Replikation der Phagen-DNA erfolgte in *E. coli* (DH5α, Stratagene). Dazu wurde mit einer sterilen Impföse ein Aliquot der Zellen ausgestrichen. Eine Einzelkolonie wurde in einer Übernachtskultur angezogen. Aus dieser frischen Übernachtskultur wurden 5 ml CG Medium angeimpft und mit 0,2 % Maltose sowie 10 mM MgSO<sub>4</sub> supplementiert. Die Kultur wurde unter Schütteln so lange bei 37°C inkubiert, bis eine OD von 0,55 erreicht war. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei RT, 500xg) wurde das Zellsediment in 2 ml MgSO<sub>4</sub> (10 mM) aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar vor Zugabe der Phagensuspension wurde mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> eine OD von 0,5 eingestellt.

#### **2.2.11.5 Verpackung des Ligationsansatzes**

Die Verpackung in Phagenpartikel erfolgte mit dem Gigapack®III Gold Packaging Extract (Stratagene). In je 25 µl Verpackungsextrakt wurden 0,2 µg (4 µl) DNA aus dem Ligationsansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert, und anschließend für 1 Stunde und 50 Minuten bei RT (25°C) inkubiert. Die linearen und von Vektorarmen flankierten DNA Fragmente werden unter diesen Bedingungen in Phagenpartikel verpackt. Dabei werden jedoch nur solche rekombinanten Cosmide in die Phagenköpfe geschleust, deren *cos sites* 38-52 kb auseinanderliegen. Auf diese Weise erfolgt eine Selektion auf Cosmide, die ein Sau3A Fragment der richtigen Größe integriert haben.

Nach der Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  SM Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Chloroform wurde die Reaktion vorsichtig gemischt, und anschließend bei 12000xg 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand mit den rekombinanten Phagen wurde abgenommen, und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei einer Lagerung bei 4°C ist der Phagenextrakt bis zu 4 Wochen haltbar.

#### **2.2.11.6 Infektion der Wirtsbakterien**

Die Bakteriensuspension wurde mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD von 0,5 eingestellt. Von der Phagensuspension wurden eine 1:10 bzw. eine 1:50 Verdünnung (in SM Puffer) hergestellt. Je 25  $\mu\text{l}$  der beiden Verdünnungen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  der Wirtsbakterien 15 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) und anschließend 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml CG Medium wurde die Bakterien 1 Stunde bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt wurden. Nach anschließender Zentrifugation (3 Minuten, 720xg, RT) wurde der Überstand bis auf 200  $\mu\text{l}$  abgenommen, das Bakteriensediment resuspendiert und auf CG Platten mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausplattiert. Nach einer über Nacht-Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt, und die Verpackungseffizienz (*colony forming units* pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA) mit ca.  $1 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA ermittelt. Nach dieser Testverpackung wurden die restlichen 16  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes auf gleiche Weise in 4 Verpackungsansätzen verpackt. Die Verpackungseffizienz von  $1,85 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA wurde anschließend als Mittelwert der Effizienz der Testverpackung und der 4 folgenden Verpackungen ermittelt.

#### **2.2.11.7 Amplifikation der Cosmidbank in *E.coli***

Die Verpackungsansätze 1-5 wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Anhand der durchschnittlichen Verpackungseffizienz wurde die Menge Phagensuspension ermittelt, die  $1 \times 10^4$  cfu liefert. Die entsprechende Menge wurde jeweils mit dem doppelten Volumen Wirtsbakterien (OD 0,5) 15 Minuten bei RT und anschließend für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte in dem vierfachen Volumen CG Medium für eine Stunde bei 37°C, wobei alle 15 Minuten vorsichtig geschüttelt wurde. Nach Sedimentierung der Bakterien (720xg, 10 Minuten, RT) wurde der Überstand bis auf 500  $\mu\text{l}$  abgenommen, die Bakterien resuspendiert und auf CG-Platten mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Kononien mit ca. 1,5 ml CG (mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) und einem *cell scraper* von allen Platte geschwemmt und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellsuspension wurde mit autoklaviertem Glycerin versehen (Endkonzentration 18%) und in 1 ml-Aliquots in cryo Röhrchen (Nunc) abgefüllt. Die Röhrchen wurden zunächst für 90 Minuten bei -20°C gelagert, bevor sie für die Langzeitlagerung in -70°C überführt wurden.

#### **2.2.11.8 Bestimmung des Titers der Cosmid-Genbank**

Zur Titerbestimmung wurden eine  $10^{-6}$  sowie eine  $10^{-7}$  Verdünnung in CG-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin hergestellt, auf einer Ampicillin-haltigen CG-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt, und so der Titer der Cosmid-Genbank in Form von cfu/ml (*colony forming units/ ml*) festgelegt.

### 2.2.11.9 Isolierung von Cosmid-DNA aus der Cosmidbank zur Transfektion in *Leishmania*

Für die präparative Isolierung von Cosmidbank DNA wurden 500 ml Ampicillin-haltiges CG-Medium mit 1 ml der Cosmidbank-tragenden *E.coli* Suspension beimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator gehalten. Am folgenden Tag wurde die Kultur zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge, Rotor JA10, 10 Minuten 5000 upm, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 12 ml Lösung I (50 mM Glukose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach der Zugabe von 24 ml Lösung II (200 mM Natriumhydroxid, 1% SDS) wurden die Bakterien für 20 Minuten bei RT auf dem Rollenschüttler lysiert. Durch die Zugabe von 18 ml Lösung III (3 M Kaliumacetat, 2 M Eisessig) und anschließender Inkubation auf Eis (10 Minuten) wurden die Proteine in der Lösung denaturiert und durch Zentrifugation sedimentiert (Zentrifuge: Beckmann, Rotor: JA10, 8000 upm, 30 Minuten, 0°C). Der Überstand wurde durch einen Rundfilter (Melitta) in frische Reaktionsgefäße filtriert, mit RNase A versehen (40 µg/ml) und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fällung mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) zur Entfernung der denaturierten Proteinreste. Dazu wurde dem Ansatz 1 Volumen des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches zugegeben. Nach 10-minütigem Schwenken bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zentrifugiert (Zentrifuge: Eppendorf 5810R, 1860xg, 30 Minuten, Raumtemperatur) und die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitierung der Cosmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und anschließender Zentrifugation (Zentrifuge: Eppendorf 5810R, 1860xg, 30 Minuten, Raumtemperatur). Das Sediment wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bevor es in 7,5 ml *Aqua dest.* gelöst wurde. Als weiterer Aufreinigungsschritt erfolgte eine erneute Fällung durch die Zugabe von 1 Volumen einer PEG Lösung (13 % PEG6000; 0,8 M NaCl). Nach 1-stündiger Inkubation auf Eis wurde die DNA sedimentiert (Zentrifuge: Eppendorf 5810R, 1860xg, 30 Minuten, 4°C) und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Zentrifuge: Eppendorf 5810R, 1860xg, 30 Minuten, 4°C) wurde das DNA-Sediment getrocknet, und über Nacht bei 37°C in 200 µl TE Puffer gelöst. Am folgenden Tag erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

### 2.2.12 Enzymatische Modifizierung von DNA

#### 2.2.12.1 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Um eine Rezirkularisierung linearisierter DNA Fragmente zu verhindern, kann die 5'-Phosphatgruppe am Ende eines linearen DNA Fragmentes entfernt werden. Dazu wird die DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt.

Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit ca. 0,5 µg/10 µl in 1x Reaktionspuffer verdünnt und mit 0,5 Units/µg DNA alkalischer Phosphatase versehen. Bei einem 5'-Basenüberhang wurde die Reaktion für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 Minuten erneut 0,5 Einheiten Enzym/µg DNA zugegeben wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EGTA bis zu einer Endkonzentration von 5 mM und 10-minütiger Inkubation bei 75°C gestoppt.

Bei einem 3'-Basenüberhang wurde die Reaktion stattdessen für 15-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde frisches Enzym zugegeben, und das Wasserbad langsam auf 55°C hochgeheizt. Nach 1 Stunde wurde die Reaktion wie bereits beschrieben gestoppt.

Die DNA konnte anschließend mittels *Easy Pure DNA Purification Kit* aus einem Agarosegel, oder mittels einer Phenol-Chloroform Fällung aufgereinigt werden.

### 2.2.12.2 Ligation

Bei der Ligation werden lineare DNA Fragmente durch Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppe mit der 3'-Hydroxylgruppe kovalent miteinander verbunden. Die Reaktion wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert.

Vektor- und Insert DNA wurden in einem äquimolaren Verhältnis in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  in 1x T4 Ligasepuffer verdünnt. Die Reaktion wurde mit 1  $\mu\text{l}$  T4 Ligase versetzt und im Fall von überhängenden Enden über Nacht im Kühlschrank oder für vier Stunden bei 16°C inkubiert. Handelte es sich um eine Ligation von Fragmenten mit glatten Enden, wurde die Reaktion 4 Stunden bei Raumtemperatur gehalten.

### 2.2.12.3 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA, indem sie Phosphodiesterbindungen in beiden Helixsträngen an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden. Die Schnittstelle ist dabei abhängig einer für jedes Restriktionsenzym spezifischen Basensequenz, die aus 4-8 Basenpaaren bestehen kann. Restriktionsverdauungen führen entweder zu 3'-oder 5'-überhängenden Enden, oder zu sogenannten glatten Enden der DNA-Fragmente.

Die zu schneidende DNA wurde in 1x Restriktionspuffer (Böhringer oder New England Biolabs) verdünnt und mit ca. 1-2 Units Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA versehen. Bei Bedarf (abhängig vom Enzym) wurde dem Ansatz zusätzlich 1x BSA (100x stock, New England Biolabs) zugefügt. Die Inkubation erfolgte bei analytischen Ansätzen für eine Stunde oder bei präparativen Ansätzen über Nacht bei dem für das spezifische Enzym beschriebenen Temperaturoptimum, zumeist bei 37°C. In wenigen Fällen erfolgte die Inkubation bei 50°C (BclI) oder bei 25°C (SwaI).

### 2.2.13 Transformation

Plasmidvektoren wurden in *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen (Subcloning Efficiency Competent Cells; Gibco BRL) transformiert, Cosmidvektoren in *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen (Library Efficiency Competent Cells Gibco BRL). Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  bzw. 100  $\mu\text{l}$  Zellen auf Eis gehalten und mit 100-200 ng DNA oder 2,5  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 20 Sekunden bei 37°C bzw. für 45 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis gehalten, mit 500  $\mu\text{l}$  LB Medium ohne Selektionsantibiotikum versehen, und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (720xg, 5 Minuten, RT). Der Überstand wurde bis auf 110  $\mu\text{l}$  abgenommen, und das Zellsediment resuspendiert. Jeweils 10 und 100  $\mu\text{l}$  wurden auf LB-Agarplatten mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.14 Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen

DNA Ladepuffer: 85 % Formamid  
10 mM EDTA pH 8,0  
1 mg/ ml Bromphenolblau  
1 mg/ ml Xylenylnol

Bei der Agarosegelelektrophorese nutzt man die durch die Phosphatgruppe im Zucker-Phosphat Rückgrat bedingte negative Ladung der DNA, um ein Gemisch aus verschiedenen großen DNA Fragmenten in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente umgekehrt proportional zum

dekadischen Logarithmus ihrer Größe. Durch die Agarosekonzentration wird die Porengröße eines Gels bestimmt, so dass für die Auftrennung kleiner DNA Fragmente eine hohe Agarosekonzentration, und umgekehrt bei der Auftrennung großer DNA Fragmente eine niedrige Agarosekonzentration von Vorteil ist.

Abhängig von der Größe des Gels wurden 50-150 ml TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose versehen (0,3-1,5%), unter gelegentlichem Schwenken aufgekocht, und mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versehen (10 mg/ml stock). Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen, mit einem Kamm versehen, nach dem Erkalten mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA Proben beladen. Außerdem wurden 2-3  $\mu\text{l}$  eines DNA Längenstandards zur Fragment-Längenbestimmung aufgetragen. Bei einer Spannung von ca. 5 V/cm wurden die DNA Fragmente ca. 1-2 Stunden aufgetrennt, anschließend unter UV Licht durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und digitalisiert.

### **2.2.15 Auftrennung von DNA Fragmenten in der Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE)**

Bei der Feldinversionsgelelektrophorese wird die Polarität der Elektroden periodisch umgekehrt. Die Moleküle im Gel wandern deshalb zunächst vorwärts, dann wieder rückwärts. Eine Netto-Vorwärtsbewegung wird dennoch erreicht, wenn der „Vorwärts-Puls“ länger andauert als der „Rückwärts-Puls“, oder bei Gleichheit der Zeitintervalle eine stärkere Spannung bei der „Vorwärts-Bewegung“ angelegt wird. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen durch die FIGE verspricht eine hohe Auflösung, da mit dem Wechseln der Polarität ein ständiger Wechsel der Laufrichtung einhergeht, für den größere Fragmente proportional mehr Zeit benötigen, und deshalb langsamer im Gel wandern als kleiner DNA-Fragmente.

Für ein FIGE-Gel wurden in der Regel 300 ml 0,5x TBE-Puffer (frisch verdünnt aus 10x stock) mit 3 g Agarose versetzt (1 % Endkonzentration) und unter gelegentlichem Schwenken aufgekocht. Die flüssige Agarose wurde ohne den Zusatz von Ethidiumbromid in eine horizontale Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet, und mit den DNA Proben sowie einem DNA-Längenstandard beladen. Mit einer Spannung von 200 Volt wurde das aus zwei hintereinandergeschalteten Teilen bestehende Programm gestartet.

„Multi-Phase“-Programm für den Größenbereich 5-250kb:

1.: Spannung: 200 V, Einlaufzeit: 10 Minuten, Gesamtlaufzeit: 8 Stunden, Pulsdauer: 1-20 Sekunden, Modus: revers, F/R Ratio: 3.0:1

2.: Spannung: 200 Volt, Einlaufzeit: -, Gesamtlaufzeit: 8 Stunden, Pulsdauer: 0,8-1,5 Sekunden, Modus: revers, F/R Ratio: 3.0:1

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel der Kammer entnommen und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken in einer Ethidiumbromid-Lösung (in 0,5x TBE-Puffer, Endkonzentration 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gefärbt.

### **2.2.16 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Die Pulsfeldgelelektrophorese ist eine Weiterentwicklung der Feldinversionsgelelektrophorese. Der Unterschied besteht darin, dass sich die Polarität der Elektroden nicht wie oben beschrieben periodisch umkehrt, sondern die Richtung der elektrischen Felder in verschiedenen Winkeln relativ zu vertikalen Achse des Gels angelegt werden kann. Entweder sind dazu abwechselnd aktive Elektroden um das Gel herum angeordnet, oder ein beweglicher

Gelträger positioniert sich abwechselnd in verschiedenen Winkeln zu zwei dauerhaft aktiven Elektroden.

Das Prinzip der Auftrennung ist wie für die FIGE beschrieben die permanent nötige neue Ausrichtung der DNA-Moleküle im Gel. Dabei benötigen größere Moleküle proportional länger zum Relaxieren und erneutem Ausrichten als kleinere Moleküle.

### **2.2.16.1 Herstellung von Chromosomen-, „Blöckchen“ für die PFGE**

Um den Chromosomensatz von Leishmanien in der PFGE aufzutrennen, wurden zunächst je  $2,5 \times 10^7$  Zellen pro Einheit sedimentiert und zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen (4°C, 10 Minuten, 1600xg). Je  $2,5 \times 10^7$  Zellen wurden anschließend in 40  $\mu$ l PBS resuspendiert, und mit 40  $\mu$ l einer 1 %-igen Agaroselösung gemischt (Endkonzentration Agarose: 0,5 %). Die Mischung wurde dann zum Aushärten der Agarose in eine *slot*-Vorrichtung pipettiert, und 1 Stunde bei 4°C gelagert. Sobald die Agarose polymerisiert war, wurden die Blöckchen aus der Form in ESP-Puffer überführt (0,5 M EDTA; 1 % Laurylsarcosin; 2 mg/ml Proteinase K) und 2 Tage unter gelegentlichem Schwenken bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der Blöckchen erfolgte anschließend in Proteinase K-freiem ESP-Puffer bei 4°C.

### **2.2.16.2 Auftrennung von DNA in der PFGE**

Zur Auftrennung der Chromosomen wurden 300 ml einer 0,7%-iges Agaroselösung in 0,25x TBE-Puffer hergestellt und in den Gelträger überführt. Nach 1,5-stündiger Auspolymerisierung der Agarose wurden die Chromosomen-enthaltenden Blöckchen in die Vertiefungen der Geltaschen überführt, und mit flüssiger, 0,7 %-iger Agarose überschichtet. Auf der rechten und linken Seite wurde jeweils ein dünnes Stückchen eines in Agarose eingebetteten Hefechromosomensatzes gegeben (New England Biolabs), das ebenfalls mit flüssiger Agarose überschichtet wurde. Das Gel wurde anschließend in 0,25x TBE-Puffer über Nacht im Kühlraum gelagert, und am nächsten Tag in die Gelapparatur (Rotaphor Typ 5, Biometra) überführt. Das Gel wurde mit frisch angesetzten, vorgekühltem Laufpuffer überschichtet (0,25x TBE, 9°C), bevor das 3 x 30 Stunden Programm bei einer Spannung von 250 Volt gestartet wurde:

Actual: 1 1 1; countdown: 30 Stunden; interval actual: 100-240 sec; interval inverse: 0; angle: 235°-245°; volts: 90-120; rotor speed: 7; max temperature: 13°C;

Nach Beendigung des Programms wurde das Gel in einer 2  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid-Lösung in 0,25x TBE für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt.

### **2.2.17 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Easy Pure DNA Purification Kit (Biozym). Die gewünschte DNA Bande wurde unter langwelligem UV Licht sichtbar gemacht, mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel entfernt und in drei Volumen *Salt* Lösung aufgenommen. Eine Inkubation bei 55°C erfolgte solange, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde der Lösung 5  $\mu$ l + 1  $\mu$ l  $\mu$ g erwarteter DNA-Ausbeute einer Silikamatrix (*Bind*-Lösung) zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler wurde die Silikamatrix mit der gebundenen DNA sedimentiert (16000xg, 5 s, RT) und in 1 ml *Wash* Lösung resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation (16000xg, 5 s, RT) wurde der Überstand verworfen und das Sediment getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte unter Zugabe von 20-25  $\mu$ l A.dest. und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (1 Minute,

16000xg, RT) und der DNA-haltige Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde wiederholt, und ein Aliquot des Eluats anschließend in einem Agarosegels auf seine Qualität überprüft.

### 2.2.18 Sequenzieren

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der sogenannten Kettenabbruch Methode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wird zunächst eine PCR durchgeführt, bei der neben den dNTPs (2'-Desoxynukleotide) auch ddNTPs (2'-3'-Desoynukleotide) in die Reaktion eingesetzt werden, die je nach Basenbaustein mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe an den ddNTPs kommt es zum Kettenabbruch bei der Amplifikation des zu sequenzierenden Fragmentes, so dass Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an den Enden mit jeweils dem spezifischen Farbstoff der zuletzt eingebauten Base markiert sind. Nach der Auftrennung dieses Fragmentgemisches in einem denaturierenden Polyacrylamidgel kann durch die Abfolge der Fluoreszenzsignale die Sequenz der DNA bestimmt werden.

Zum Sequenzieren von DNA wurde hochreine DNA aus einer Maxipräparation eingesetzt, oder über Säulen aufgereinigte Minipräparation-DNA. Zu 1 µg DNA wurden 10 pmol des *sense*-oder *antisense*-Oligonukleotid-Starters gegeben sowie 4 µl *Big-Dye Mix* (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems: dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq®-Polymerase FS, MgCl, Tris HCl, pH9,0 ). Die Amplifizierung (Thermocycler, Biometra) erfolgte in 25 Zyklen der Abfolge:

Denaturierung: 10 s, 96°C

Primer-Anlagerung: 5 s, 50°C

Elongation: 4 Min, 60°C

Zur Fällung der DNA wurde die Reaktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit HPLC-A. dest (80µl), Natriumacetat (3 M, pH 4,6; 10 µl) sowie Ethanol (250µl) versehen. Nach Sedimentation der DNA (15 Minuten, 16000xg, RT) wurde diese mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert. Um alle Ethanolrückstände zu entfernen, wurde das DNA Sediment nach Entfernen des Überstandes für 10 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der markierten DNA Fragmente sowie die computergestützte Auswertung der Resultate wurde von Frau S. Ofori bzw. Frau H. von Tien unter Verwendung eines ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer, von Applied Biosystems durchgeführt. Die Proben wurden mit 4 µl Ladepuffer versehen (80 % deionisiertes Formamid, 50 mM EDTA pH 8,0), 2 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung von 1,5 µl jeden Ansatzes erfolgte in einem 6 %-igen Polyacrylamidgel (6 % Polyacrylamid/Bisacrylamid 19:1, 1x TBE, 8,3 M Harnstoff, 0,03 % APS, 1/2500 Volumen TEMED) in 1x TBE-Laufpuffer. Die Auswertung erfolgte mit der Computersoftware Sequencing Analysis, Version 3.0, Applied Biosystems.

### 2.2.19 Amplifikation von DNA Fragmenten durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden unter Zuhilfenahme des Failsafe™ PCR *Pre Selection*-bzw. MasterAmp™ *high fidelity ExtraLong* PCR Kits (Epicentre) durchgeführt. Die Anwendung dieser Kits ermöglicht die Ermittlung der idealen Pufferbedingungen für jede individuelle PCR. Beide Kits enthalten neben einem Puffersatz mit verschiedenen Magnesiumchlorid-

konzentrationen eine DNA Polymerase mit Korrekturlesefunktion, die den fehlerhaften Einbau von dNTPs korrigiert.

Zunächst wurden in einer analytischen PCR der für die spezifische Reaktion ideale Puffer identifiziert: In einem 30  $\mu$ l Ansatz wurden zu der Matritzen-DNA (genomische DNA: 1-2  $\mu$ g, Plasmid- oder Cosmid-DNA: ca. 100-500 ng) üblicherweise 10-20 pmol *sense*- und *antisense* Ologonukleotidstarter sowie 0,3 ml Taq-Polymerase und jeweils 15  $\mu$ l eines 2-fach Puffers gegeben (Failsafe Taq-Polymerase und Puffer 1-12 aus dem Failsafe™ PCR *Pre Selection*-Kit bzw. *high fidelity* Taq-Polymerase und Puffer A-L aus dem MasterAmp™ *high fidelity ExtraLong* PCR Kit). Die PCR erfolgte üblicherweise unter den folgenden Bedingungen:

- 1.: Denaturierung: 1 min 95°C
- 2.: Denaturierung: 1 min 95°C
- 3.: Oligonukleotid-*Annealing*: 1 min 50°C-60°C, üblicherweise 5°C-10°C unter der errechneten Schmelztemperatur
- 4.: Elongation: 1 min pro 1000 bp

Nach dem 4. Schritt wurde die Abfolge der Reaktionen ab Schritt 2 (Denaturierung) 29 mal wiederholt.

Nach einer Analyse der einzelnen Ansätze im Agarosegel wurde der geeignete Puffer ermittelt, und ein präparativer 50  $\mu$ l Ansatz unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Alle Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra) oder in einem Master Cycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt.

### 2.2.20 *Real time* PCR

Die Parasitenlast im Lymphknoten infizierter BALB/c Mäuse wurde durch *real time* PCR bestimmt. Bei dieser Methode kann eine Quantifizierung der zu amplifizierenden DNA erfolgen, indem die exponentielle Phase der Amplifizierungsreaktion untersucht wird. Diese wird umso schneller erreicht, je höher die Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden DNA ist.

Zunächst wurde zur Bestimmung der Parasitenlast die DNA aus den Organen infizierter Mäuse wie unter 2.2.10.3 beschrieben präpariert. Die Bestimmung des Gehaltes an *Leishmania* DNA wurde eine *real time* PCR nach dem FRET System durchgeführt (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), wobei ein *Leishmania*-spezifisches 483bp-Fragment aus ribosomalen Genen amplifiziert wurde. Dazu wurden Fluoreszenz-markierte, sogenannte *real time* Proben mit in die Reaktion gegeben, die beide in unmittelbarer Nähe an dem zu amplifizierenden Fragment binden. Dabei ist die erste *real time* Probe an ihrem 3-Ende mit einem Farbstoff gekoppelt (Fluorescein), der während des *Annealing* Energie auf ein Akzeptormolekül (LC Red 640) am 5'-Ende der zweiten *real time* Probe transferiert. Diese gibt daraufhin ein messbares Fluoreszenzsignal ab, anhand dessen Intensität Rückschlüsse auf die Quantität der Ziel-DNA gezogen werden können. Dabei ergibt sich der sogenannte  $C_T$ -Wert ( $C_T$ : *threshold cycle*) aus der Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal des Akzeptormoleküls einen definierten Hintergrundwert überschreitet. Die Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden DNA kann daraufhin bestimmt werden, da sich zwischen dem Logarithmus der DNA-Ausgangskonzentration und dem  $C_T$  Wert eine lineare Abhängigkeit ergibt. Die Durchführung der PCR erfolgte wie bei Schulz *et al.* (2003) beschrieben.

Die Quantifizierung des Maus-DNA-Gehaltes in der präparierten DNA erfolgte nach dem TaqMan System. Dabei wird der Reaktion nur eine *real time* Probe zugefügt, die an ihrem 5'-Ende eine fluoreszierende Gruppe gebunden hat (FAM: 6-Carboxyfluorescein), und an ihrem 3'-Ende ein *quencher*-Molekül trägt (TAMRA: 6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin). Während des *Annealing* an die Matrizen-DNA emittiert das Donormolekül am 5'-Ende der *real time* Probe ein Signal, das vom *quencher*-Molekül absorbiert wird. Gelangt während der Elongation die Taq-Polymerase an das gebundene *quencher*-Molekül, wird dieses durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität entfernt und degradiert. Das nun räumlich vom *quencher*-Molekül getrennt vorliegende Donormolekül emittiert dann Licht, dessen Signal gemessen werden kann und mit zunehmender PCR-Zykluszahl stärker wird.

Zur Bestimmung des Maus-DNA-Gehaltes wurde ein  $\beta$ -Actin-Gen von 437 bp amplifiziert. Der Ansatz enthielt dabei

50  $\mu$ l DNA (1: 10 und 1: 50 Verdünnung)

je 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP

3 mM Magnesiumchlorid

10  $\mu$ M EDTA

10 mM Tris-HCl pH 8,3

50 mM Kaliumchlorid

1U AmpliTaqGold (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

0,2  $\mu$ M der spezifischen Oligonukleotide (s.u.)

0,1  $\mu$ M *real time* Probe (s.u.)

5'-Oligonukleotid: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'

3'-Oligonukleotid: 3'-TGGGTATGGAATCCTGTGGCATCC-3'

*real time*-Probe: 5'-(FAM)TATGCTC(TAMRA)TCCCTCACGCCATCCTGCGT-3'

Einer initialen Denaturierung für 15 Minuten bei 95°C folgten 45 Zyklen mit jeweils 20 s zur Denaturierung bei 95°C sowie 40 s bei 58°C zur Oligonukleotidanlagerung und Elongation. Die PCR erfolgte an einem ABI Prism 7700 SDS-Gerät (PE Applied Biosystems), und wurde von Dr. Sebastian Graefe (Abteilung Medizinische Zentralsdiagnostik, BNI) durchgeführt.

### 2.2.21 Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten DNA Sonden (*random primed*)

Das hochspezifische Digoxigenin-System hat sich als nicht-radioaktiver Nachweis für Nucleinsäuren durchgesetzt, da es einen Nachweis von DNA bzw. RNA im sub-Pikogramm Bereich bietet. Bei Digoxigenin handelt es sich um ein Steroid-Hapten, das ausschließlich aus dem Fingerhut (*Digitalis*-Pflanzen) gewonnen werden kann, und über einen *Spacer* an dUTP gekoppelt wird. Die so markierten dUTPs werden in spezifische Einzelstrangsonden eingebaut, die durch einen DIG-spezifischen, AP-konjugierten Antikörper erkannt werden. Der Farbnachweis erfolgt durch enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase.

Zur Herstellung DIG-markierter Sonden erfolgte üblicherweise mit dem DIG DNA *Labeling and Detection* Kit (Boehringer, Mannheim). Dabei wurde 1  $\mu$ g des zu markierenden DNA Fragmentes in einem Volumen von 15  $\mu$ l für 10 Minuten bei 100°C aufgeköcht, und danach sofort auf Eis überführt, um die DNA einzelsträngig zu halten. Zu den denaturierten DNA Fragmenten wurden 2  $\mu$ l eines Hexanukletidgemisches, 2  $\mu$ l dNTPs (1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0,66 mM dTTP; 0,33 mM DIG-dUTP) sowie 2 Einheiten Klenow-Polymerase gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Reaktion mit *Aqua dest.* auf 50  $\mu$ l aufgefüllt, und überschüssige

dNTPs durch Aufreinigung der Sonde mit Hilfe der Microspin™ S-300 HR *columns* (Amersham Biosciences, s. 2.2.22) entfernt. Anschließend wurden die Sonden einer Qualitätskontrolle unterzogen (s. 2.2.23).

### **2.2.22 Aufreinigung Digoxigenin-markierter Einzelstrangsonden mit Microspin™ S-300 HR Columns**

Durch kurzes Vortexen wurde zunächst das Säulenmaterial gemischt, und gleichmäßig in der Säule verteilt. Die durch Abbrechen des Verschlusses geöffnete Säule wurde in ein Reaktionsgefäß gestellt, und 1 Minute bei 800xg und Raumtemperatur zentrifugiert, um den Lagerpuffer vom Säulenmaterial zu trennen. Der Lagerpuffer wurde anschließend verworfen. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, und mit dem Markierungsansatz (50 µl) beladen. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute bei 800xg, Raumtemperatur) befand sich die markierte Sonde im Säulendurchlauf, während überschüssige dNTPs an das Säulenmaterial gebunden blieben.

### **2.2.23 Qualitätskontrolle der DIG-markierten Einzelstrangsonden**

Von den aufgereinigten Einzelstrangsonden wurde eine serielle Verdünnung von 1:5 bis 1:500000 hergestellt. Je 1 µl jeder Verdünnung wurde punktuell auf eine Nylonmembran aufgebracht und getrocknet. Durch *crosslinking* mit UV-Bestrahlung (Stratalinker; Stratagene, La Jolla, USA) wurde die Einzelstrang DNA kovalent an die Membran gebunden. Nach 5-minütiger Inkubation in PBS pH 7,0 wurde die Membran für 1 Stunde in Blockierungslösung geschwenkt (1x TBS; 5 % Milchpulver; 0,1 % Tween 20; 0,02 % Natriumazid), um freie Bindungskapazitäten auf der Membran abzusättigen. Nach einstündiger Inkubation in Blockierungslösung mit anti-Digoxigenin-Antikörper (1:5000, Boehringer) wurde die Membran dreimal mit TBS gewaschen und anschließend 10 Minuten in AP-Puffer geschwenkt (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid). Die Farbnachweis erfolgte mit 3,3 mg NBT und 1,875 mg BCIP in AP-Puffer und im Dunkeln. Zum Beenden der Reaktion wurde die Membran kurz in EDTA-haltigem Puffer (meist TAE) geschwenkt, und zwischen zwei Whatman-Filtern getrocknet.

### **2.2.24 Kolonie Hybridisierung**

Denaturierungslösung: 0,5 N NaOH  
1,5 M NaCl  
0,1 % SDS

Neutralisierungslösung: 1 M Tris HCl pH 7,5  
1,5 M NaCl

20 x SSC Stammlösung: 3 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat

Die von Grunstein und Hogness (1975) entwickelte Methode wurde zur Durchmusterung einer Cosmid-DNA Bank eingesetzt, um Cosmide mit den gesuchten DNA Abschnitten zu identifizieren.

Dazu wurde die in *E. coli* amplifizierte Cosmid-Bank mit einem Titer von ca. 1000 cfu/Platte (LB mit 100 µg/ml Ampicillin) auf insgesamt 8 Platten ausplattiert. Damit sollte das *Leishmania* Genom vollständig und ausreichend (ca. 1,5 mal) repräsentiert sein. Die Platten wurden nach einer über Nacht Inkubation für 1-2 Stunden bei 4°C gelagert, bevor die

Kolonien auf einen Nitrocellulosefilter transferiert wurden. Dazu wurde ein solcher Filter mit Hilfe einer Pinzette luftblasenfrei auf die Bakterienplatte aufgebracht, und, sobald der Filter vollständig befeuchtet war, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wurden sowohl die Platte als auch der Filter zur späteren Orientierung mit einem Folienschreiber bzw. einer sterilen Kanüle seitlich markiert. Anschließend wurde der Filter bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Lyse der bakteriellen Zellwand und zur Denaturierung der DNA wurden die Filter 15 Minuten in Denaturierungslösung inkubiert. Dazu wurde ein Whatman Filterpapier in Denaturierungslösung getränkt, und der Filter mit den Kolonien mit der Rückseite auf das getränkte Whatman Papier überführt. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden nach demselben Prinzip durchgeführt. Es folgte ein 5-minütiger Inkubationsschritt in *A.dest*, eine 5-minütige Inkubation in Neutralisierungslösung, und eine letzte Inkubation für 15 Minuten in 2x SSC. Anschließend wurden die Filter zur Fixierung der DNA 30 Minuten in einem Vakuumofen bei 80°C gebacken. Das Entfernen von Zelltrümmern erfolgte in Rollglasflaschen durch 1-2-stündiges Waschen in 3x SSC/0,1 % SDS bei 65°C. Die weitere Vorbereitung der Filter und die Hybridisierung erfolgte wie unter 2.2.25 beschrieben.

### **2.2.25 Hybridisierung von Membranen mit Digoxigenin-markierten Einzelstrangsonden und Nachweis definierter DNA Sequenzen**

Die Hybridisierung der Membranen und Filter erfolgte in der Regel in Rollglasflaschen in einem Hybridisierungssofen (Biometra Göttingen) bei 65°C. Zunächst wurden die Membranen und Filter 1-2 Stunden mit Hybridisierungslösung (Hyb-9, Biozym) prähybridisiert. Während dessen wurde die Sonde für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis überführt, um die DNA einzelsträngig zu halten. Je nach Intensität der Sonde, die zuvor in der Qualitätskontrolle ermittelt wurde, wurde die Sonde anschließend in Prähybridisierungslösung verdünnt und auf die Membranen/Filter gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Am folgenden Tag wurde die Sonde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Um überschüssiges sowie unspezifisch gebundenes Sondenmaterial zu entfernen wurden die Membranen/Filter in verschiedenen Puffern mit steigender Stringenz gewaschen:

2x SSC/ 0,5% SDS: 15 Minuten  
1x SSC/ 0,5% SDS: 15 Minuten  
0.5x SSC/ 0,5% SDS: 60 Minuten

Nach dem letzten Waschschrift erfolgte der Nachweis Digoxigenin-markierter DNA immunologisch (s. 2.2.26)

### **2.2.26 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin-markierten DNA Sequenzen**

Blockierungslösung: 5 % Milchpulver in 1x TBS

0,1 % Tween 20  
0,02 % Natriumazid

Waschlösung: 1x TBS  
0,05 % Tween 20

AP-Puffer: 100 mM Tris HCl pH 9,5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

Die Membranen/Filter wurden zunächst zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS pH 7,0 gewaschen und anschließend für 1 Stunde in Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membranen/Filter abzusättigen. Die Inkubation mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem anti-Digoxigenin Fab Fragment (Böhringer) erfolgte mit einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurden die Membranen/Filter 2 mal 5 Minuten mit Waschlösung auf dem Schüttler inkubiert, und anschließend 10 Minuten mit AP-Puffer behandelt. Der enzymatische Farbnachweis erfolgte durch Inkubation mit 3,3 mg NBT (in 70% Dimethylformamid) und 1,875 ml BCIP (in Dimethylformamid)/10 ml AP-Puffer im Dunkeln. Zum Beenden der Reaktion wurden die Membranen/Filter in EDTA-haltigem Puffer (meist TAE-Puffer) geschwenkt und zwischen 2 Whatman-Filtern getrocknet.

## 2.2.27 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 2.2.27.1 eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2 x Lämmli-Probenpuffer: 100 mM Tris HCl pH 6,8  
 100 mM DTT  
 4 % SDS  
 20 % Glycerin  
 0,02 % Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3  
 250 mM Glycin  
 0,1 % SDS

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Gemische aus Proteinen unterschiedlicher Größe in einem eindimensionalen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei werden die Proteine unter einem Überschuss von SDS-Anionen denaturiert, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ausschließlich von deren Größe abhängt. Gleichzeitig wird durch die Anlagerung von SDS-Anionen die Eigenladung der Proteine übermantelt, so dass alle Proteine zur Anode wandern, und individuelle Ladungsunterschiede vernachlässigt werden können.

Zur Herstellung von *Leishmania* Lysaten wurden Zellaliquots sedimentiert (1174xg, 10 Minuten, 4°C), zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen und auf eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ $\mu$ l 1x Lämmli-Probenpuffer eingestellt. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und abschließend zentrifugiert (16000xg, 5 Minuten, Raumtemperatur). Um die Viskosität der Probe durch ungescherte DNA zu verringern, wurden die Proben bei Bedarf in einem Ultraschallbad beschallt (10 Minuten, 100%, maximale Temperatur: 30°C). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gehalten, oder für eine Langzeitlagerung bei -70°C gelagert.

Die für die Gelapparatur benötigten Glasplatten und Abstandhalter wurden gründlich mit 70%-igem Ethanol gereinigt, zusammengebaut und in den Gel-Gießstand eingesetzt (System: Paqlab). Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden 7,5 %-12%-ige Trenngele gegossen (375 mM Tris HCl pH 8,8; 7,5 %-12 % Acrylamid/ N,N'-Methylen-bisacrylamid (37.5:1, 40 %); 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED), und zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Das Trenngel wurde mit 70%-igem Ethanol überschichtet, und bis zur vollständigen Polymerisation bei Raumtemperatur gelagert. Nach Absaugen des Ethanols wurde das Trenngel mit einem 5%-igem Sammelgel überschichtet (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5 % Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid (37.5:1, 40 %); 0.1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 %

TEMED) und dieses mit einem Kamm mit der erforderlichen Taschenzahl versehen. Die Gelapparatur wurden aus der Gießstation genommen, in die Gelkammer eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Nachdem der Kamm aus dem Sammelgel entfernt wurde, wurden die Taschen mit dem zu untersuchenden Proben sowie mit einem Größenstandard beladen. Je nach erwarteter Signalintensität des zu untersuchenden Proteins wurden in eine Geltasche  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  Zellen pro Bahn aufgetragen. Bei einer Spannung von ca. 15V/cm wurden die Proben aufgetrennt, und anschließend durch Überführung des Gels in spezifische Färbelösungen (siehe 2.2.28.1-3) sichtbar gemacht.

### **2.2.27.2 zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS**

Proteingemische werden üblicherweise in einem eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Eine Bande einer definierten Größe muss aber nicht zwangsläufig eine einzige Proteinspezies repräsentieren, da beispielsweise in einer Zelle diverse Proteinspezies mit identischem Molekulargewicht vorhanden sind. Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension zunächst in einem Gelstreifen, der einen immobilisierten pH Gradienten enthält, nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt ist dabei der pH Wert eines Proteins, bei dem die Nettoladung eines Proteins Null ist.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wird der Gelstreifen auf ein Polyacrylamidgel appliziert, und die Proteine wandern nach Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Gelstreifen in das Gel ein. In der zweiten Dimension werden die bereits nach ihrem individuellen isoelektrischen Punkt getrennten Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (siehe 2.2.27.1). Als Ergebnis erhält man ein Polyacrylamidgel, in dem jede Proteinspezies eines Proteingemisches als einzelner Punkt anfärbbar ist.

Bei der Durchführung einer 2D Gelelektrophorese werden meist ganze Proteome aufgetrennt und analysiert. Dabei wird als Proteom der Gesamtproteingehalt einer Zelle zu einem genau definierten Zeitpunkt bezeichnet. Zum Beispiel kann das Proteom von promastigoten Leishmanien verschiedener Spezies verglichen werden, oder aber das Proteom derselben Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stadiendifferenzierung.

Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, und die Entstehung von Artefakten zu minimieren, wurden alle Schritte der 2D Gelelektrophorese (Probenaufbereitung, Rehydrierung und Auftrennung in der 1. Dimension, Äquilibration und Gelelektrophorese sowie die Färbetechniken) immer exakt nach Protokollvorgabe durchgeführt. Die Vorgehensweise wurde dabei von Meike Bente (BNI) optimiert und standardisiert und wird im Folgenden beschrieben:

#### **2.2.27.2.1 Anfertigung von Zellextrakten für die 2D Gelelektrophorese**

Für die zweidimensional Gelelektrophorese wurden logarithmisch wachsende Zellen ( $5 \times 10^8$  bis maximal  $2 \times 10^7$  /ml) eingesetzt. Für ein Coomassie-Brillant-Blau-gefärbtes 2D Gel wurden  $5 \times 10^8$  Zellen benötigt, für sie wesentliche sensitivere Silberfärbung nur  $5 \times 10^7$  Zellen.

Die Leishmanien wurden zunächst sedimentiert (1174xg, 10 Minuten, 4°C), und zweimal mit eiskaltem PBS pH 7,0 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 50  $\mu$ l frisch angesetzten Lysepuffer resuspendiert (40 mM Tris pH 9, 1 mM EDTA, 0,1 mM E64, 10 mM ortho-Phenantrolin). Die Lyse der Zellen erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Dazu wurden die Zellen jeweils 4 Minuten in Trockeneis mit Ethanol schockgefroren und dann für weitere 4 Minuten bei 37°C wieder aufgetaut. Nach 4-maliger Wiederholung wurde die Probe zur Solubilisierung von

Membranproteinen mit 150  $\mu$ l Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % ChAPS; 2,4 % ASB-14; 1 % DTT) versehen und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler inkubiert. Es folgte eine 45-minütige Zentrifugation bei 10°C und 20000xg, um die löslichen Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen, und direkt zur weiteren Analyse eingesetzt, oder schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.27.2.2 erste Dimension Rehydrierung und isoelektrische Fokussierung**

Zelllysate wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 0,5 % IPG Puffer des zu untersuchenden pH Bereiches versehen. Bei den im IPG Puffer enthaltenden Ampholinen handelt es sich um kleine Carriermoleküle mit definierten isoelektrischen Punkten, die die Auftrennung des Proteinsgemisches entlang des pH-Gradienten erleichtern sollen. Die Probe wurde mit Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % ChAPS; 2,4 % ASB-14; 1 % DTT) auf ein Gesamtvolumen von 340  $\mu$ l aufgefüllt, und in die Gelstreifenhalter überführt. Ein Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten wurde vorsichtig und luftblasenfrei auf die Probe appliziert. Die gesamte Reaktion wurde mit 1 ml Mineralöl überschichtet (Coverfluid, PlusOne) um ein Austrocknen der Probe zu verhindern. Nach Aufsetzen des Deckels wurde der Gelstreifenhalter auf die Elektroden des IPGphor Gerätes überführt. Die Rehydrierung der Gelstreifen und die isoelektrische Fokussierung wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### **Rehydrierung**

2h ohne Spannung

10h 30 V

##### **isoelektrische Fokussierung**

1h 1000V

1h 3000V

12h 8000V

Nachdem eine Voltstundenzahl von insgesamt 92000-96000 Vh erreicht war, wurde der Lauf unterbrochen, und die Gelstreifen sofort für die 2. Dimension vorbereitet.

#### **2.2.27.2.3 zweite Dimension Äquilibration und SDS-Gelelektrophorese**

Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine nach ihren spezifischen isoelektrischen Punkten erfolgte nun die Auftrennung in der 2. Dimension nach der Größe der Proteine. Dazu musste zunächst der Gelstreifen in einem Puffer äquilibriert werden, der für die SDS Gelelektrophorese benötigt wird. Das SDS im Äquilibrationpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30% Glycerol; 2 % SDS; wenige Körner Bromphenolblau) denaturiert die Proteine, lagert sich im Überschuß an diese an und bildet negativ geladene SDS/Proteinkomplexe, so dass die Eigenladung der Proteine zu vernachlässigen ist. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt damit ausschließlich nach der Größe der SDS/Proteinkomplexe.

Zur Äquilibration wurde der Gelstreifen zunächst vorsichtig mit *Aqua dest.* gespült, um Reste der Coverfluid zu entfernen. Der Gelstreifen wurde dann mit einer Pinzette in eine unten verschlossene Glaspipette überführt und zweimal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in je 10 ml Äquilibrationpuffer inkubiert. Im ersten Schritt wurde dem Äquilibrationpuffer 100 mg DTT zugegeben, um den reduzierten Zustand der Proteine aufrecht zu erhalten. Um durch Alkylierung der SH-Gruppen eine Reoxidation zu Disulfidbindungen zu

verhindern, wurde dem Äquilibrationpuffer im zweiten Schritt 250 mg Iodacetamid zugegeben.

Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde ein 13 %-iges SDS-Gel angefertigt wie unter 2.2.27.1 beschrieben (Kammersystem: Peqlab, Gelplatten 18 x 20 cm, Abstandhalter 1mm). Anstatt eines Sammelgels wurde auf das Trenngel eine ca. 2-3cm breiter Streifen Bromphenolblau-gefärbte, flüssige Agarose pipettiert, in die mit Hilfe zweier Pinzetten der äquilibrierte Gelstreifen überführt wurde. Der Gelstreifen sollte dabei durch die Agarose bis auf das Trenngel sinken. Dabei entstehende Luftblasen wurden mit einer Kanüle entfernt. Das so beladene Gel wurde in die Gelkammer überführt und die Pufferreservoirs mit SDS-Laufpuffer (s. 2.2.27.1) gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromspannung von ca. 15 mA pro Gel und über Nacht bei 4°C. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Nachfolgend wurden die Gele mit Coomassie-Brillant-Blau oder mit Silbernitrat gefärbt (2.2.28.2 und 2.2.28.3).

## **2.2.28 Anfärben von Proteinen**

### **2.2.28.1 Coomassie Brillant Blau**

Nach der Gelelektrophorese wurde ein SDS-Gel in eine nur für diesen Zweck verwendete Schale mit Färbelösung (0,1 % Coomassie Brillant Blau; 40 % Ethanol; 10 % Essigsäure; 50 % Aqua dest.) überführt und unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur gefärbt. Die Entfärbung erfolgte am nächsten Tag mit Entfärber-Lösung (40 % Ethanol; 50 % Aqua dest.; 10 % Essigsäure) ebenfalls unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde in regelmäßigen Abständen so lange erneuert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Gele wurden digitalisiert, bevor sie zur Langzeitlagerung zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet wurden.

### **2.2.28.2 Coomassie-Brillant-Blau G250**

Zum Anfärben von 2D Gelen wurde die wesentlich sensitivere kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung gewählt. Mit dieser Färbemethode kann 0,2-1 ng Protein pro Proteinspot- bzw. bande nachgewiesen werden.

Die Gele wurden in eine Schale überführt und mit ca. 250 ml Färbelösung der folgenden Zusammensetzung überschichtet:

2 ml Coomassie-Brillant-Blau (CBB) R250 5 % in Aqua dest.  
10 g Ammoniumsulfat  
2 g 85 % Phosphorsäure  
ad 100 ml Aqua dest.  
25 ml Methanol

Die Färbung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Am folgenden Tag wurde das Gel mit 25 % Methanol entfärbt, und nach ausreichender Entfärbung in 25 % Ammoniumsulfat gelagert.

### **2.2.28.3 Modifizierte Silberfärbung (MALDI kompatibel)**

Diese wesentlich empfindlichere Färbung resultiert aus der Komplexbildung von Silberionen mit Lysin- und Argininresten in Proteinen. Dabei entsteht bei der Reduktion dieser komplexierten Silberionen metallisches Silber. Mit dieser Färbemethode können 0,05-50 ng

Protein pro Bande bzw. Proteinspot sichtbar gemacht werden. Die hier beschriebene Methode ist kompatibel mit einer anschließenden Analyse von Proteinspots mittels MALDI-TOF-MS. Die Gele wurden für 2 Stunden (oder über Nacht) bei Raumtemperatur fixiert (50 % Methanol; 12 % Essigsäure) und anschließend 3x 20 Minuten mit 20 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine Sensibilisierung mit 0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  für 1 Minute bei Raumtemperatur und 2-3 Waschschriffe mit *Aqua dest.* Die Färbung erfolgte mit 0,1 % Silbernitrat für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem das Silbernitrat gründlich mit *Aqua dest.* entfernt wurde, wurden die Proteinspots mit Entwicklerlösung (2 % Natriumcarbonat; 0,0004 % Natriumthiosulfat; 0,04 % Formaldehyd) sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Fixierlösung gestoppt. Sobald keine Kohlendioxidproduktion mehr beobachtet werden konnte, wurde das Gel für 30 Minuten noch einmal in frischer Fixierlösung geschwenkt. Die Langzeitlagerung bis zur weiteren Analyse mittels MALDI erfolgte in 1 % Essigsäure.

### 2.2.29 matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS)

Silber- oder Coomassie-Brillant-Blau-gefärbte Proteine wurden mit Hilfe einer abgeschnittenen 200  $\mu\text{l}$ -Pipettenspitze aus dem Gel ausgestochen und einzeln auf einer ZipPlate (Montage In-Gel-DigestZP Kit, Millipore) platziert. Nach Herstellerangaben wurden die Proteine im Gelstückchen mit den Kit-Komponenten behandelt, d.h. zunächst entfärbt, mit Trypsin verdaut, mit Hilfe einer C18 revers-Phasenmatrix aufgereinigt und anschließend eluiert. Je 2,5  $\mu\text{l}$  der eluierten Proteine wurden auf eine 378 well-Platte (400  $\mu\text{m}$  Anchor Plate, Bruker, Daltonics) aufgebracht. Sobald das Lösemittel verdampft war, wurden zu jeder Proteinprobe 1,5  $\mu\text{l}$  der Matrix-Lösung ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50 % Acetonitril; 0,1 % Trifluor-Essigsäure) zugegeben, und diese anschließend getrocknet. MALDI-MS wurde mit Hilfe eines *Autoflex Mass Spectrometer* (Bruker Daltonics, Bremen) vorgenommen. Messungen wurden im *reflective mode* mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Ionen-Quelle 1 Voltzahl: 19 kV; Ionen-Quelle 2 Voltzahl: 16,5 kV; Linsen-Voltzahl: 8 kV; 120 ns Puls Extraktion; Matrix-Suppression < 500 Da. Spektren wurden mit dem *Xmass analysis software package* (Bruker Daltonics) ausgewertet. Dabei erfolgte eine Kalibrierung der Massenspektren anhand definierter Peptide (Sigma Aldrich). Mit Hilfe des *MS-Fit software package* wurden die erhaltenen Massenspektren mit den theoretischen Peptid-Massenspektren aller bekannten *Leishmania*-Proteine verglichen.

### 2.2.30 Transfer von Proteinmustern auf eine Membran. „Westernblot“

Blot-Transferpuffer: 48 mM Tris  
39 mM Glycin  
0,037 % SDS  
20 % Methanol

Mit der Methode des *Semi Dry Blotting* werden Proteinmuster aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert, auf der sie quantitativ und qualitativ mit Hilfe spezifische Antikörper untersucht werden können.

Dazu wurden auf die Kathode einer Blotapparatur 4 Lagen 3MM Whatman Filterpapier (in Blot-Transferpuffer) getränkt appliziert. Das Gel wurde mit der Vorderseite nach unten auf die 3MM Whatman Filter aufgebracht, und nachfolgend mit einer Methanol-benetzten PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) sowie weiteren 4 Lagen Blot-Transferpuffer getränkten 3MM Whatman Filtern überschichtet. Der Aufbau wurde durch Abrollen mit einer Pipette von

Luftblasen befreit. Durch Aufsetzen der Anode und Anlegen einer Spannung von  $1\text{mA} / \text{cm}^2$  wurden die Proteine für 1 Stunde auf die Membran transferiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran entweder sofort immunologisch untersucht, oder bis zu ihrer Verwendung getrocknet zwischen zwei 3MM Whatman Filtern gelagert.

### **2.2.31 Immunblot**

#### **2.2.31.1 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen mit alkalischer Phosphatase**

Bei der Immunblotanalyse können immobilisierte Protein mit Hilfe von Antikörperreaktionen sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde eine Membran sofort nach dem Transfer eines Proteinmusters für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung geschwenkt (5 % Milchpulver in 1x TBS; 0,1% Tween 20; ggf. 0,02 % Natriumazid), um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Wurde die Membran nach dem Proteintransfer getrocknet, musste vor dem Blockierungsschritt eine Benetzung mit Methanol erfolgen. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Membran bei Raumtemperatur mit dem in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper:

anti-L8C4 1: 40

anti-L13D6 1: 40

anti-HSP100-IgY 1: 2500

anti-SHERP-IgG 1: 6000

Maus-Serum (WT) 1:250

Maus-Serum (esc) 1:250

Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (1x TBS; 0,05 % Tween 20) wurden ungebundene Antikörperreste entfernt, bevor eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem in Blockierungslösung verdünnten Zweitantikörper erfolgte:

anti-Huhn IgG-AP-Konjugat 1:2500

anti-Maus IgG-AP-Konjugat 1:2500

Im Anschluss an einen erneuten, dreimaligen Waschschrift erfolgte eine 10-minütige Äquilibration in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid). Der enzymatische Nachweis erfolgte im Dunkeln mit 3,3 mg NBT (in 70 % Dimethylformamid) und 1,875 mg BCIP (in Dimethylformamid) in 10 ml AP-Puffer. Die Reaktion wurde bei ausreichender Intensität der Banden durch die Zugabe von EDTA-haltigem Puffer gestoppt. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Whatman-Filterpapieren getrocknet.

#### **2.2.31.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen durch Chemolumineszenz**

Eine weitere immunologische Methode zum Nachweis immobilisierter Protein ist der Nachweis durch Chemolumineszenz. Der Nachweis durch Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper beruht dabei auf der enzymatischen Produktion von Acridiniumestern durch die Peroxidase. Diese reagieren in leicht alkalischem Milieu mit Peroxiden und emittieren dabei Chemolumineszenz der Wellenlänge 430 nm, die auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann. Der Nachweis mit Peroxidase ist ca. 10-20 mal sensitiver als der Nachweis mit alkalischer Phosphatase.

Der Transfer des Proteinmusters auf eine Membran sowie die Behandlung mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgte wie unter 2.2.30 und 2.2.31.1 beschrieben. Der zweite Antikörper war dabei anstelle von alkalischer Phosphatase mit Peroxidase konjugiert (anti-Kaninchen IgG-horseradish-Peroxidase-Konjugat, 1:2500). Im Anschluss an die Inkubation mit dem Zweitantikörper und dem dreimaligen Waschen erfolgte eine erneute Inkubation in Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dann zweimal für 5 Minuten in *assay*-Puffer geschwenkt (100 mM Tris; 100 mM NaCl) und anschließend aus der Flüssigkeit in ein frisches Behältnis überführt. Dabei wurde die Flüssigkeit auf einem Filterpapier abgetropft, ohne dass die Membran vollständig getrocknet wurde. Die Lösungen 1 und 2 aus dem *Super Signal Kit* wurden im Verhältnis 1: 1 gemischt (je 500  $\mu$ l) und auf die Membran gegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation, wobei die Membran ständig durch wiederholtes Pipettieren mit der Flüssigkeit benetzt wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch Aufsaugen mit einem Filterpapier entfernt, die Membran in Zellophanfolie verpackt, und mit einem Röntgenfilm (Biomaxx, Kodak) in eine Filmkassette überführt. Nach 5-minütiger Expositionszeit wurde der Film entwickelt.

### **2.2.32 Stimulierung reisolierter Milz-und Lymphknotenzellen**

Milz-und Lymphknotenzellen wurden nach Isolation der Organe homogenisiert und die Zellen in Lösung gebracht. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte eingesät, und mit verschiedenen Verdünnungsstufen eines durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen hergestellten *Leishmania*-Lysats stimuliert (1: 100, 1: 500, 1: 1000 von  $2 \times 10^7 / 100 \mu$ l). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit einem anti-CD3-Antikörper stimuliert, der Negativstandard wurde durch Stimulation mit reinem Kulturmedium erhoben. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und im ELISA ausgewertet bzw. bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.33 Messung der Zellproliferation**

Nach Abnehmen des Überstandes der stimulierten Milz-und Lymphknotenzellen wurde die Zellproliferation gemessen, indem 25  $\mu$ l eines  $^3\text{H}$ -Thymidin-Vollmediums (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) zu den Zellen gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für acht bis sechzehn Stunden im  $37^\circ\text{C}$ -Brutschrank und 5 %  $\text{CO}_2$  Begasung. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines automatischen Zellerntegerätes (*Micro Cell Harvester*) auf ein Filterpapier aufgebracht, welches in der Mikrowelle getrocknet wurde. Nach dem Auftragen von 5 ml einer Szintillationsflüssigkeit wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und im  $\beta$ -Szintillationszähler ausgewertet. Dabei wurde die absolute Menge der in die DNA inkorporierte Radioaktivität als Maß für die Proliferation gewertet.

### **2.2.34 Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)**

Zur Bestimmung des Zytokingehaltes eines Zellüberstandes wurde ein durch hohe Spezifität gekennzeichnetes *Sandwich*-ELISA-Test eingesetzt. Dabei nutzt man auf einer Oberfläche immobilisierte Antikörper, die ein Epitop eines definierten Zytokins erkennen. Das so gebundene Zytokin wird durch die Bindung eines zweiten, Enzym-konjugierten Antikörpers sichtbar gemacht, das ein anderes Epitop des Zytokins erkennt. Der Nachweis erfolgt durch Enzym-katalysierte Farbreaktion und Quantifizierung der Farbreaktion durch Messung der Absorption.

Eine Mikrotiterplatte (96 wells, Nunc) wurde bei 4°C über Nacht mit je 100 ng anti-IFN $\gamma$ -Antikörper bzw. mit 50 ng anti-IL2-Antikörper in jeweils 50  $\mu$ l Coating-Puffer beschichtet. Durch dreimaliges Waschen wurden ungebundene Antikörper entfernt, bevor eine Absättigung der freien Bindungsstellen durch 12-stündige Inkubation mit 150  $\mu$ l Blockierungslösung erfolgte. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde der Zellüberstand in die Antikörper beschichteten Vertiefungen der Platte gegeben. Auf jeder Platte wurde eine Zweifachbestimmung eines internen Standards mitbehandelt. Alle Überstände wurden durch eine Zwei- bzw. Dreifachbestimmung untersucht, um Messungenauigkeiten auszumitteln. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur, bevor der Zellüberstand durch dreimaliges Waschen entfernt wurde. Es folgte eine Inkubation mit je 50  $\mu$ l biotinylierten anti-IFN $\gamma$ -AK (0,5  $\mu$ g/ml) bzw. mit anti-IL2-AK (1  $\mu$ g/ml) für eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur. Ein weiterer dreimaliger Waschschriff entfernte ungebundenen Zweitantikörper, bevor eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppeltem Streptavidin erfolgte (1: 200 in PBS mit 0,1 % BSA). Nach 5-maligem Waschen wurden je 100  $\mu$ l der Farbsubstratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, wobei die HRP die Reaktion des farblosen Tetramethylbenzidins zu einem blauen Farbstoff katalysierte. Die Reaktion wurde nach 5-10 Minuten durch die Zugabe von je 25  $\mu$ l Stopplösung unterbrochen, die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader gemessen und anhand der internen Standards ausgewertet.

### Elispot-Test

*Coating Buffer*: Lösung 1: 1,24 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>xH<sub>2</sub>O

Lösung 2: 0,84 % NaHCO<sub>3</sub>

70ml Lösung 1 mit ca. 175 ml Lösung 2 mischen, bis pH 9,6 erreicht ist

Substratpuffer: 1,56 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, pH 5,5

Der Elispot-Test stellt eine Variante des Sandwich-ELISAs dar, der zur semiquantitativen Bestimmung der Zytokin-Sekretion einzelner Zellen dient. Nach Stimulierung werden die zu untersuchenden Zellen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt, die mit einem Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin beschichtet sind. Auf diese Weise werden die sezernierten Zytokin-Moleküle in direkter Nachbarschaft der sezernierenden Zelle gebunden. Mit einem weiteren gegen das Zytokin gerichteten Antikörper und einem geeigneten Nachweisreagenz können die sezernierten Zytokin als einzelne *spots* sichtbar gemacht werden. Anhand dieser Punkte können dann Aussagen über die Zytokin-sezernierenden Zellen getroffen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Elispot-Test eingesetzt, um die Interleukin 4-(IL 4) bzw. Interferon  $\gamma$ -(IFN $\gamma$ ) Sekretion von stimulierten T-Zellen zu quantifizieren. Die Vertiefungen einer Elispot-Platte (Millipore) wurden mit 200 $\mu$ l sterilem 1x PBS gespült. Anschließend wurden in jedes *well* 50 $\mu$ l anti-Maus-IFN $\gamma$  (2  $\mu$ g/ml) bzw. anti-Maus-IL 4 (1  $\mu$ g/ml) in *Coating Buffer* pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C, bevor jedes *well* zweimal mit 200  $\mu$ l sterilem 1x PBS gewaschen wurde. Anschließend wurden freie Bindungskapazitäten der Antikörper durch eine Inkubation mit 1% BSA in 1x PBS abgesättigt. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die zu untersuchenden Zellen in die *wells* überführt, und über Nacht erschütterungsfrei bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Zellen abgenommen, und die Vertiefungen der Platte dreimal mit 1x PBS gewaschen, bevor die zweiten biotinylierten Antikörper zugegeben wurden (anti-IFN $\gamma$ : 0,5  $\mu$ g/ml; anti-IL4: 0,5  $\mu$ g/ml). Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C

wurden die *wells* erneut gewaschen, und anschließend mit 50  $\mu$ l Avidin-HRP (1:200 verdünnt in 1xPBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach einem letzten dreimaligen Waschschrift mit 1x PBS, indem 100  $\mu$ l des filtrierten Substratpuffers in jedes *well* pipettiert wurden. Sobald violette Punkte in ausreichender Intensität zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O gestoppt, und die Platte anschließend an der Luft getrocknet. Die Zahl der *spots* wurde im Elispot-Reader (BioSys) ermittelt. Dabei wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, um die Meßgenauigkeit zu erhöhen.

### 2.2.35 Generierung von murinen dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) und Infektion

Eine Stimulierung muriner Knochenmarks-Stammzellen mit GM-CSF-Medium ermöglicht die Entwicklung zu reifen, dendritischen Zellen. Zu diesem Zweck wurden einer 6-10 Wochen alten C57BL/6 Maus Femur und Tibia entnommen, und durch mehrmaliges Spülen mit RPMI 1640 Medium mit Hilfe einer Kanüle die Stammzellen präpariert. Jeweils  $2 \times 10^6$  Stammzellen wurden in 10 ml DC-Medium (RPMI 1640 mit 200 Einheiten murinem GM-CSF) in einer Petrischale eingesät und bei 37°C kultiviert. Am dritten Tag wurden weitere 10 ml Medium zugegeben, und am sechsten Tag 10 ml Medium durch frisches Medium ersetzt. Zwischen dem siebten und achten Tag war die Differenzierung zu reifen DCs abgeschlossen. Die Zellen wurden durch Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von Oberflächen- und Reifungsmarkern (CD11c, CD86) untersucht, bevor sie als Antigen-präsentierende Zellen (APZs) in weiteren Versuchen eingesetzt wurden.

### 2.2.36 Durchflusszytometrie: *fluorescence activated cell sorting* (FACS)

Blockpuffer: 1 % BSA in 1x PBS

FACS-Puffer: 1 % FCS in 1x PBS  
0,1 % Natriumazid

Antikörper:

anti-CD4-PE (Phycoerythrin)	1:500
anti- $\gamma\delta$ -T-Zellen-FITC	1:50
NK-Zellen-PE	1:200
anti-CD19-FITC	1:200
anti-CD11c	1:100
anti-CD3-FITC	1:200
anti-CD11b-PE	1:400
anti-CD25-PE	1:200
anti-CD86-PE	1:100

In einer gemischten Zellpopulation werden bestimmte Zellen zunächst durch Behandlung mit Fluoreszenz-konjugierten, monoklonalen Antikörpern markiert, die zellspezifische Oberflächenantigene erkennen. Alternativ kann auch der erste, Antigen-spezifische Antikörper unmarkiert sein. Dieser wird dann von einem zweiten, Immunglobulin-spezifischen Antikörper erkannt, der in diesem Fall eine Markierung trägt. Das markierte Zellgemisch wird dann durch eine feine Düse gedrückt, wobei ein sehr dünner Flüssigkeitsstrahl mit einzelnen Tropfen entsteht. Diese passieren einen Laserstrahl, der an

den vorbeiströmenden Zellen gebrochen wird. Weiterhin werden die fluoreszierenden Gruppen der markierenden Antikörper zur Emission von charakteristischer Strahlung angeregt, die, zusammen mit der Lichtbrechung des Lasers an Photodetektoren aufgenommen wird. So können Rückschlüsse auf die Größe und Gestalt der passierenden Zellen sowie auf ihre Oberflächenantigene gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Isolate aus *air pouches* (siehe Kapitel 2.2.8) durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die Zellisolate zunächst zweimal in FACS Puffer gewaschen, bevor das Gesamtisolat durch Zentrifugation pelletiert wurde (250xg, 4°C, 5 Minuten). Pro Färbung wurden  $2 \times 10^5$  Zellen abgenommen, und in 200  $\mu$ l Blockpuffer aufgenommen. Nach Überführung der Zellsuspension in FACS-Röhrchen wurden Fc-Rezeptoren durch Inkubation der Zellen mit anti-CD16 und anti-CD32 blockiert (30 Minuten auf Eis), um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Fluoreszenz-markierten Antikörper zugegeben, und der Ansatz für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 500  $\mu$ l 4 % Paraformaldehyd über Nacht im Kühlschrank (4°C) fixiert. Die Proben wurden dann bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Dunklen gelagert.

### 2.2.37 Anfertigen von Zellschnitten

Ca.  $1 \times 10^8$  Zellen wurden aus der Kultur entnommen, sedimentiert (1174xg, 10 Minuten, 4°C), und zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen. Das Sediment wurde in zur Fixierung in 2 % Paraformaldehyd resuspendiert, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen, und anschließend in ca. 50  $\mu$ l einer 1 %-igen Agaroselösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach Auspolymerisierung der flüssigen Agarose wurden die Blöckchen aus dem Gefäß entnommen und automatisch in einem Gewebeeinbettautomat (Histokinette, E. Vieth, Mikrotome GmbH, Wiesmoor) weiter verarbeitet: Zunächst wurden die Blöckchen in 45°C-warmen Ethanol verschiedener Konzentrationen geschwenkt (70 %, 80 %, 96 % und 100 %). Anschließend erfolgte eine dreimalige Inkubation in 45°C warmen Xylol, in Paraffin (45°C) und Paraffin (60°C). Am folgenden Tag konnte das paraffinierte Blöckchen dem Automaten entnommen werden, und in einen Paraffinblock eingefasst werden. Nach Auskühlung des Paraffinblocks konnten Schnitte mit einer Dicke von 3-6  $\mu$ m angefertigt werden. Durch Auflegen der Schnitte auf 45°C warmes Wasser wurden Falten gestreckt, bevor sie auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt wurden. Zum Trocknen der Präparate erfolgte eine Inkubation der Objektträger bei 40°C.

Zur Entparaffinierung der Präparate wurden die Objektträger 4x5 Minuten in Rotihistol (Orangenschalenöl) geschwenkt. Anschließend erfolgten verschiedene Waschschritte: 3x in 100 % Ethanol, 2x in 96 % Ethanol, 1x in 80 % Ethanol, 1x in 70 % Ethanol und in destilliertem Wasser. Danach konnten die Präparate zur Färbung eingesetzt werden.

### 2.2.38 „fast red“ Färbung

Bei dieser Färbung mit einem „*super sensitive immunodetection*“-Kit (BioGenex) werden Proteine in Zellschnitten durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern und anschließender Farbreaktion sichtbar gemacht.

Dazu werden die Präparate zunächst eine Stunde in einer 3 %-igen BSA-Blockierungslösung inkubiert (3 % BSA; 0,1 % Tween 20; 0,02 % Natriumazid), um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgt eine über Nacht-Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti-HSP90, 1:500) in PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Triton-X-100. Nach dreimaligem

Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (anti-Huhn (aus Kaninchen), 1:1500) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit biotinyliertem anti-Kaninchen-Antikörper (aus der Ziege) erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur, nachdem die Präparate erneute gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von alkalischer Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin und eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Verdünnung des biotinylierten-Antikörpers sowie des Streptavidins erfolgte nach Herstellerangaben. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die enzymatische Farbreaktion unter Zugabe von „fast red“ Salzlösung (2 mg Naphtol-AX-Phosphat; 0,2 ml Diethylformamid; 10 ml Tris-HCl pH 8,2; 10 mg „fast red“ Salz).

### 2.2.39 Hämtoxilin-Färbung

Zu untersuchende Präparate (in diesem Fall Schnitte von Paraffin-eingebetteten Lymphknoten) wurden wie unter 2.2.37 beschrieben behandelt. Die Färbung mit Hämatoxilin erfolgte (nach Mayer) mit einer kommerziellen Hämatoxilin-Lösung (Merck) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, und nach Zugabe von einem Tropfen Aquatex (Merck) mit einem Deckgläschen versehen.

### 2.2.40 Giemsa-Färbung

Zellen wurden sedimentiert (1174xg, 10 Minuten, 4°C), zweimal in PBS pH 7,0 gewaschen und im doppelten Volumen des Sedimentes in PBS resuspendiert. Ca. 20 µl der Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden diese für 20 Sekunden in eiskaltem Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte für 10 Minuten in einer 10%-igen Giemsalösung (Merck, in Phosphatpuffer pH 7,2), nachdem die Zellen erneut getrocknet waren. Zum Entfärben wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden anschließend lichtmikroskopisch untersucht, wobei die Ergebnisse mit Hilfe einer (Coolpix, Nikon) digitalisiert werden konnten.

### 2.2.41 Fluoreszenzmikroskopie

Jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen wurden sedimentiert (1174xg, 10 Minuten, 4°C), und zweimal mit PBS pH 7,0 gewaschen (1174xg, 10 Minuten, 4°C), bevor das Sediment in 500 µl PBS resuspendiert wurde. 30 µl dieser Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen, getrocknet und in eiskaltem Methanol fixiert (20 Sekunden). Nachdem die fixierten Zellen getrocknet waren, erfolgte ein Waschschrift mit PBS pH 7,0 mit 0,1 % Triton-X-100, und anschließend eine Permeabilisierung der Zellen mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS + 0,1 % Triton-X-100 (15 Minuten, Raumtemperatur). Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert (2 % BSA in PBS; 0,1 % Triton-X-100). Die Inkubation mit dem unverdünnten ersten Antikörper (anti-L8C4) wurde nach einmaligem Waschen in PBS mit 0,1 % Triton-X-100 für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS pH 7,0 + 0,1% Triton-X-100 erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur: Cy3-konjugierter anti-Maus AK (aus der Ziege), 1:2000 in Blockierungslösung. Parallel wurde in den letzten 10 Minuten der Inkubation eine DAPI-Lösung appliziert (1:1000), um die DNA-haltigen Organellen anzufärben. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Präparate mit einem Tropfen *Mount Medium* (Merck) und einem Deckgläschen versehen. Durch Lagern der Präparate bei 4°C im Dunkeln wurde das

*Mount Medium* fest, und die Proben wurden bei 63-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung und Charakterisierung einer spontanen *L.m. ΔclpB escape* Mutante

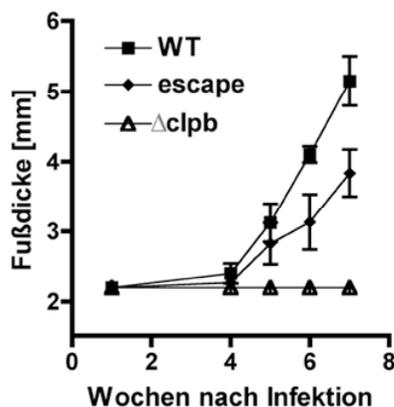
Der Austausch beider Allele des *ClpB* Gens führt in *L. major* zu einer stark verzögerten Läsionsbildung bzw. zu einem vollständigen Verlust der Virulenz (Hübel *et al.*, 1997). *ΔclpB*-Parasiten der Spezies *L. major* verursachen eine verspätete Läsionsentwicklung nach der Infektion von üblicherweise suszeptiblen BALB/c Mäusen, und zeigen eine stark eingeschränkte Proliferation sowie eine unvollständige Differenzierung zur Amastigote in *in vitro* Makrophagen-Infektionsstudien (Hübel *et al.*, 1997). In weiteren *in vitro* Makrophagen-Infektionsexperimenten wurde zudem nachgewiesen, dass sowohl die Infektiosität als auch die Proliferationsfähigkeit von *L. donovani ΔclpB* Deletionsmutanten im Phagolysosom von Makrophagen ebenfalls stark herabgesetzt sind (Krobitsch *et al.*, 1999).

Die Passage von Parasiten durch einen Säugerwirt dient der Stammerhaltung sowie der Vermeidung einer Adaptation der Parasiten an axenische Kulturbedingungen. Die Parasiten werden zu einem definierten Zeitpunkt nach der Infektion aus den Organen der BALB/c Mäuse reisoliert, und als Promastigote bis zur nächsten Tierpassage kultiviert. Während einer solchen Mauspassage wurde in einer einzelnen Maus eine mit *L. major WT* vergleichbare Infektionsentwicklung durch die sonst avirulente *L. major ΔclpB* Mutante beobachtet. Durch Immunblot Analysen der reisolierten Parasiten mit anti-*ClpB*-IgY konnte ausgeschlossen werden, dass der Infektionsverlauf durch eine Kontamination der *ΔclpB* Mutante mit Wildtyp-Parasiten hervorgerufen wurde. Folglich hatte sich in diesen Parasiten ein Mechanismus entwickelt, der den Verlust des Virulenzfaktors *ClpB* kompensiert, so dass die Fähigkeit zur Proliferation im Wirt mit einhergehender Läsions- bzw. Infektionsentwicklung wiedererlangt wurde.

Im Folgenden wird die Charakterisierung der sogenannten *L.m. ΔclpB escape* Variante beschrieben.

##### 3.1.1 Infektionsverlauf

Zunächst sollte eine genauere Charakterisierung des Infektionsverlaufs erfolgen. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^6$  spätlogarithmische Kulturformen von *L. major WT*, *L.m. ΔclpB* sowie der *L.m. ΔclpB escape*-Population in den rechten hinteren Fuß von je vier BALB/c Mäusen inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliche Messung der Fußballenschwellung dokumentiert, und ist in Abbildung 1 gezeigt:



**Abbildung 1: Infektionsverlauf.** Je  $2 \times 10^6$  metazyklische Parasiten (*L. major WT*, *L.m. ΔclpB* und *L.m. ΔClpB escape*) wurden subkutan in den Fußballen von BALB/c Mäusen inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliche Messung der Fußballenschwellung im Vergleich zum uninfizierten Fuß bestimmt. Der abgebildete Infektionsverlauf jedes Stamms zeigt die Mittelwerte der Fußschwellung aus je vier infizierten Mäusen.

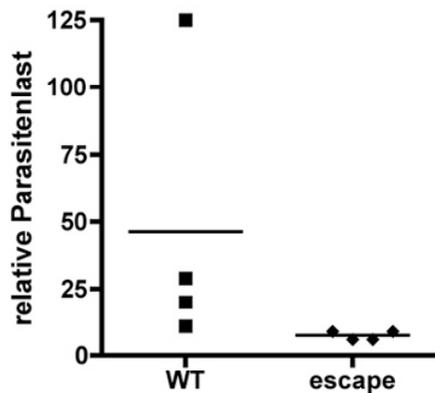
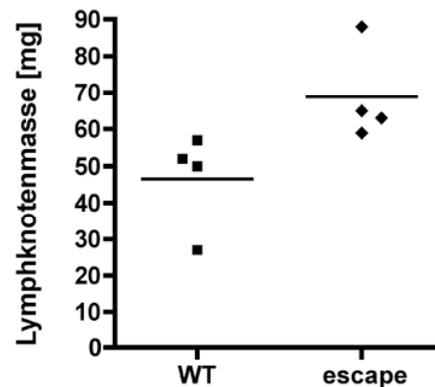
Die *L.m. ΔclpB escape* Mutante verursacht wie der *L. major* WT, beginnend 4 Wochen nach Inokulation, eine Fußballenschwellung. Im weiteren Verlauf der Infektion (4-8 Wochen nach Infektion) ist eine stetige Progression der Läsionsentwicklung sowohl bei *L. major* WT- als auch bei den *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Mäusen zu verzeichnen. Im Unterschied zu den *L. major* WT-induzierten Fußballenschwellungen beginnen die durch *L.m. ΔclpB escape* hervorgerufenen Läsionen jedoch nicht zu ulzerieren. Die Läsionsgröße bleibt (in diesem und weiteren Folgeexperimenten) immer kleiner als die durch den Wildtyp verursachten Läsionen. Die *L.m. ΔclpB Mutante* dagegen verursacht während des Beobachtungszeitraums keine Bildung von Fußläsionen.

Die Fähigkeit zur Induktion einer Läsionsentwicklung in BALB/c Mäusen durch die *L.m. ΔclpB escape* Mutante wurde somit bestätigt.

### 3.1.2 Isolierung der drainierenden Lymphknoten und Bestimmung der Parasitenlast

Eine subkutane Infektion mit Leishmanien resultiert immer in der Aufnahme der Parasiten durch phagozytierende Zellen und dem anschließenden Transport zum drainierenden Lymphknoten, wo eine Präsentation von prozessiertem Antigen durch den MHC-Komplex der Antigen-präsentierenden Zellen (APZs) stattfindet. Durch die Fähigkeit des Wirtes, eine angemessene Immunantwort einzuleiten, sowie durch parasitenspezifische Faktoren zur Umgehung dieser Eliminierungsstrategien wird entschieden, ob sich eine Infektion mit einhergehender Parasitierung des Lymphknotens etablieren kann oder nicht.

Da nach einer Infektion mit der *L.m. ΔclpB* Mutante im Vergleich zu einer Infektion mit *L. major* WT üblicherweise eine stark verringerte Schwellung und Parasitierung der Lymphknoten beobachtet wird (Hübel *et al.*, 1997), sollte der drainierende Lymphknoten von *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Mäusen auf seine Masse und Parasitenlast untersucht werden. Dazu wurden nach einer Mauspassage jeweils 4 *L. major* WT- bzw. *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Mäusen die drainierenden Lymphknoten entnommen. Diese wurden gewogen, und zur Isolierung von Gesamt-DNA mit Hilfe des Puregene® DNA Purification Kit (Gentra Systems) eingesetzt. In einer von Dr. Sebastian Graefe (Abteilung Medizinische Zentraldiagnostik, BNI) durchgeführten quantitativen *real time* PCR wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen einerseits der Gehalt von *L. major* DNA bestimmt, andererseits die Menge an Gesamt-DNA durch Amplifizierung des Maus-β-Actin-Gens. Durch das Verhältnis dieser beiden Werte kann der Anteil der Parasiten-DNA am Gesamt-DNA Gehalt bestimmt werden, und als relative Parasitenlast ausgedrückt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 gezeigt:

**A****B**

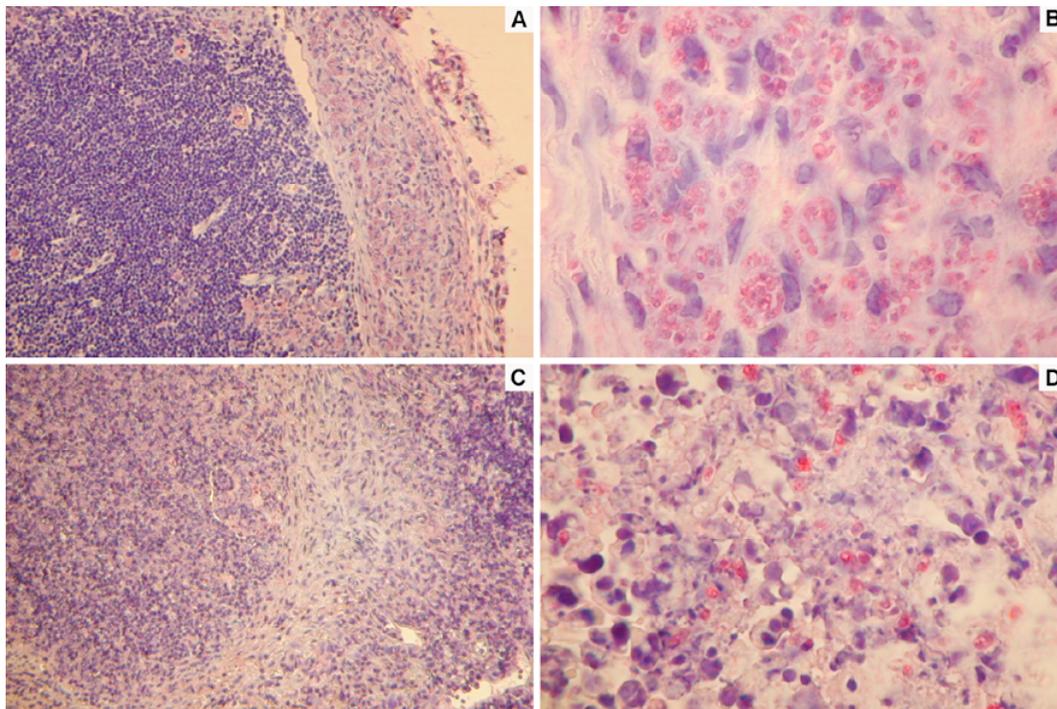
**Abbildung 2: Parasitenlast und Lymphknotenmasse infizierter BALB/c Mäuse.** Analyse der Parasitenlast. Zur Bestimmung der Parasitenlast wurde aus den präparierten Lymphknoten die DNA isoliert, und zur *real time* PCR eingesetzt. Die Mittelwerte der Parasitenlast aus 4 Lymphknoten sind als waagerechter Balken dargestellt (A). Zur Bestimmung der Lymphknotenmasse wurden die drainierenden Lymphknoten aus infizierten BALB/c Mäusen präpariert (4 Mäuse pro Stamm) und gewogen. Das Durchschnittsgewicht von je vier Lymphknoten ist als horizontaler Balken dargestellt. (B)

Wie in Abbildung 2 zu erkennen, beträgt das Lymphknotengewicht der *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Mäuse durchschnittlich 69 mg, und ist gegenüber dem durchschnittlichen Lymphknotengewicht der *L. major WT*-infizierten Mäuse (46,5 mg) signifikant erhöht ( $p=0,029$ ). Die relative Parasitenlast (Anteil von *Leishmania*-DNA im Verhältnis zur Maus-DNA) ist jedoch mit durchschnittlich 8 (relativen Einheiten) gegenüber 46,75 in den *L. m. ΔclpB escape*-infizierten Mäusen signifikant niedriger (2A).

Damit ergibt sich eine durchschnittliche Parasitenlast von bzw. 0,117 rel. Einh./mg für die Infektion mit der *L.m ΔclpB escape* Mutante, und von ca. 1 rel. Einh./mg für die Infektion mit dem *L. major WT*. Die Infektion mit dem *L.m. ΔclpB escape* Stamm ruft also eine größere Lymphknotenschwellung hervor, aber eine ca. 10-fach geringere Parasitenlast.

### 3.1.3 Histologische Untersuchung

Da die beobachtete Erhöhung der Lymphknotenmasse nach einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape* nicht mit einer erhöhten Parasitenlast korrelierte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich histologische Unterschiede im Vergleich von *L. major WT*- zum *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Lymphknoten erkennen lassen. Zu diesem Zweck wurden isolierte, infizierte Lymphknoten in Paraffin eingebettet, und es wurden anschließend Gewebedünnschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem *Leishmania*-HSP90-spezifischen Antikörper behandelt, um die Leishmanien in einer anschließenden *fast red*-Färbung anhand ihres HSP90-Gehaltes sichtbar zu machen. Außerdem wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt, um das Lymphknotengewebe zu färben.



**Abbildung 3: Histologische Untersuchung der infizierten Lymphknoten.** Nach einer Infektion mit *L. major* WT und *L.m. ΔclpB escape* wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert und in Paraffin eingebettet. Abgebildet sind Hämatoxylin-gefärbte Ultradünnschnitte der Proben (A und B: WT-, C und D: *escape*-infizierte Lymphknoten), in denen *Leishmania*-HSP90 mit einer *FastRed*-Färbung sichtbar gemacht wurde. Die Ausschnitte A und C zeigen eine 10-fache Vergrößerung, die Bilder B und D sind 63-fach vergrößert.

Wie sowohl in der 10-fachen als auch in der 63-fachen Vergrößerung der Ausschnitte in Abbildung 3 zu sehen, ist im *L.m. ΔclpB*-infizierten Lymphknoten im Vergleich zum *L. major* WT-infizierten Lymphknoten eine erhöhte Infiltration von Granula-haltigen Zellen zu erkennen. Diese wird begleitet von einer Auflösung der Gewebestrukturen, wie sie nach einer Infektion mit *L. major* WT nicht zu sehen ist. Die Organ-begrenzende Bindegewebskapsel wird bei einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape* nahezu vollständig lysiert. Anhand der rot gefärbten Leishmanien ist zu erkennen, dass die Parasitenlast im *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Lymphknoten gegenüber dem *L. major* WT-infizierten Lymphknoten erheblich reduziert ist. Damit werden die Ergebnisse aus der *real time* PCR-Analyse bestätigt: *L.m. ΔclpB escape* induziert eine höhere Lymphknotenmasse, die vermutlich aus der gesteigerten Infiltration Granula-haltiger Zellen resultiert. Die Parasitenlast ist im Vergleich zur Wildtyp-Infektion deutlich reduziert.

### 3.1.4 Analyse des Zytokinmusters

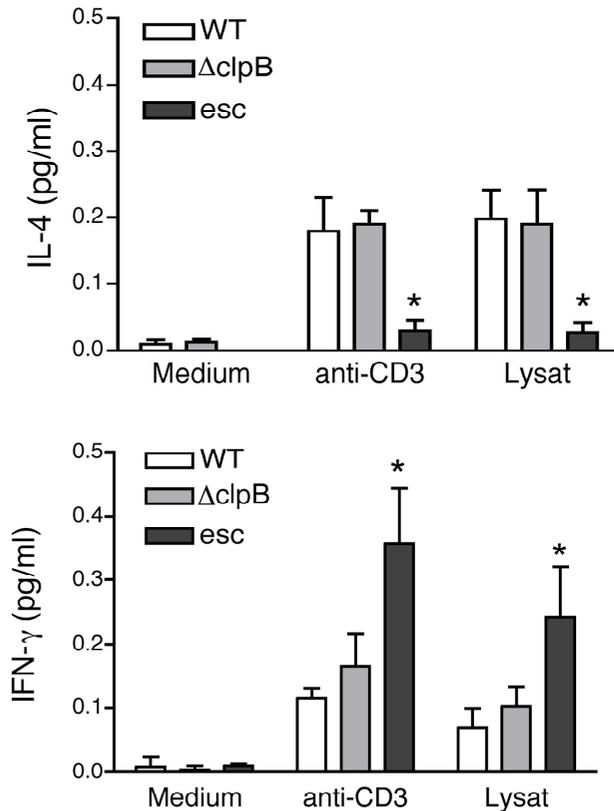
Die Polarisierung der T-Zell Antwort in Richtung Th2 von BALB/c Mäuse ist für ihre Suszeptibilität gegenüber einer *L. major* Infektion verantwortlich. Sie geht einher mit einer erhöhten Interleukin 4 (IL4) Sekretion, die eine weitere Polarisierung von CD4+ Zellen in Richtung Th2 erzeugt, und gleichzeitig die Ausbildung einer Antwort vom Th1-Typ unterdrückt (Heinzel *et al.*, 1991, Launois *et al.*, 1997). Die Induktion einer protektiven Th1-Antwort wurde nach der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. major* beschrieben, und führt zu einer Kontrolle der Infektion. Das Zytokinmuster in den lymphatischen Organen ist bei diesen Mäusen entsprechend durch eine hohe Produktionsrate von IFN $\gamma$  geprägt (Heinzel *et al.*, 1991).

Durch die Analyse der isolierten Lymphknoten konnte gezeigt werden, dass die Parasitenlast in BALB/c Mäusen nach einer Infektion mit der *L.m. ΔclpB escape* Mutante gegenüber dem *L. major* WT stark reduziert war. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob das Zytokinmuster von BALB/c Mäusen nach einer Infektion mit der *L.m. ΔclpB escape* Mutante in Bezug auf das Th1/Th2 bestimmende Zytokinmuster modifiziert war.

Um das vorherrschende Zytokinmuster von Milz und Lymphknoten nach Infektion mit der *L.m. ΔclpB escape* Mutante untersuchen zu können, wurden erneut je  $1 \times 10^7$  promastigote Kulturformenvon *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* sowie der *L.m. ΔclpB escape* Mutante subkutan in die Fußballen von BALB/c Mäusen inokuliert (4 Mäuse pro Gruppe). Der Infektionsverlauf wurde wie bereits beschrieben dokumentiert, und zeigte abermals eine vergleichbare Läsionsentwicklung von *L. major* WT- und *escape* Parasiten, während die mit der *ΔclpB* Mutante infizierten Mäuse sowie die uninfizierten Kontrollmäuse innerhalb des Beobachtungszeitraums asymptomatisch blieben.

Nach 6-tägiger Inkubationszeit wurden je zwei Mäusen die Milz sowie der drainierende Lymphknoten entnommen. Aus Milz und Lymphknoten wurde eine Zellsuspension hergestellt, welche anschließend auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Milz- bzw. Lymphknotenzellen/200 $\mu$ l eingestellt wurde. Es folgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines Leishmanienlysats (WT,  $2 \times 10^6$ /ml,  $4 \times 10^5$ /ml und  $2 \times 10^5$ /ml), mit  $\alpha$ -CD3-Antikörper als Positivkontrolle sowie mit Kulturmedium als Negativkontrolle. Nach 24 Stunden wurde der Zytokin-haltige Überstand abgenommen, und

zur Quantifizierung der Zytokine mit Hilfe eines *sandwich*-ELISAs eingesetzt (Durchführung siehe Kapitel 2.2.34). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 aufgetragen.



**Abbildung 4: Bestimmung des Zytokin-Musters.** Jeweils 4 BALB/c Mäuse wurden mit *L. major* WT, *L.m.ΔclpB* und *L.m. ΔclpB escape* infiziert. Sechs Tage nach Infektion wurden die drainierenden Lymphknoten isoliert. Nach Herstellung einer Zellsuspension wurden je  $2 \times 10^5$  Lymphozyten mit Medium (Negativkontrolle), anti-CD3 (Positivkontrolle) und *Leishmania*-Lysat stimuliert. Der Überstand wurde nach 48-stündiger Inkubation abgenommen, und anhand eines *sandwich* ELISA-Tests auf den Interleukin 4 sowie Interferon  $\gamma$ -Gehalt untersucht. Die jeweilige Zytokin-produktion ist auf der y-Achse in pg/ml aufgetragen. Die Werte stellen die Zusammenfassung aus 12 Werten dar (4 Lymphknoten pro Stamm und Dreifachbestimmung für jeden Wert).

Die *L.m. ΔclpB escape*-infizierten Milz- und Lymphknotenzellen zeigen im Gegensatz zu *L. major* WT-Zellen nach 6-tägiger Infektion eine starke IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit dem Leishmanien-Lysat sowie nach Stimulation mit anti-CD3 (Positivkontrolle). Im Kontrast dazu ist die Interleukin 4-Produktion (IL4), dem für die Entwicklung einer Th2-Antwort verantwortlichen Zytokin, 6 Tage nach Inokulation der Parasiten stark abgeschwächt.

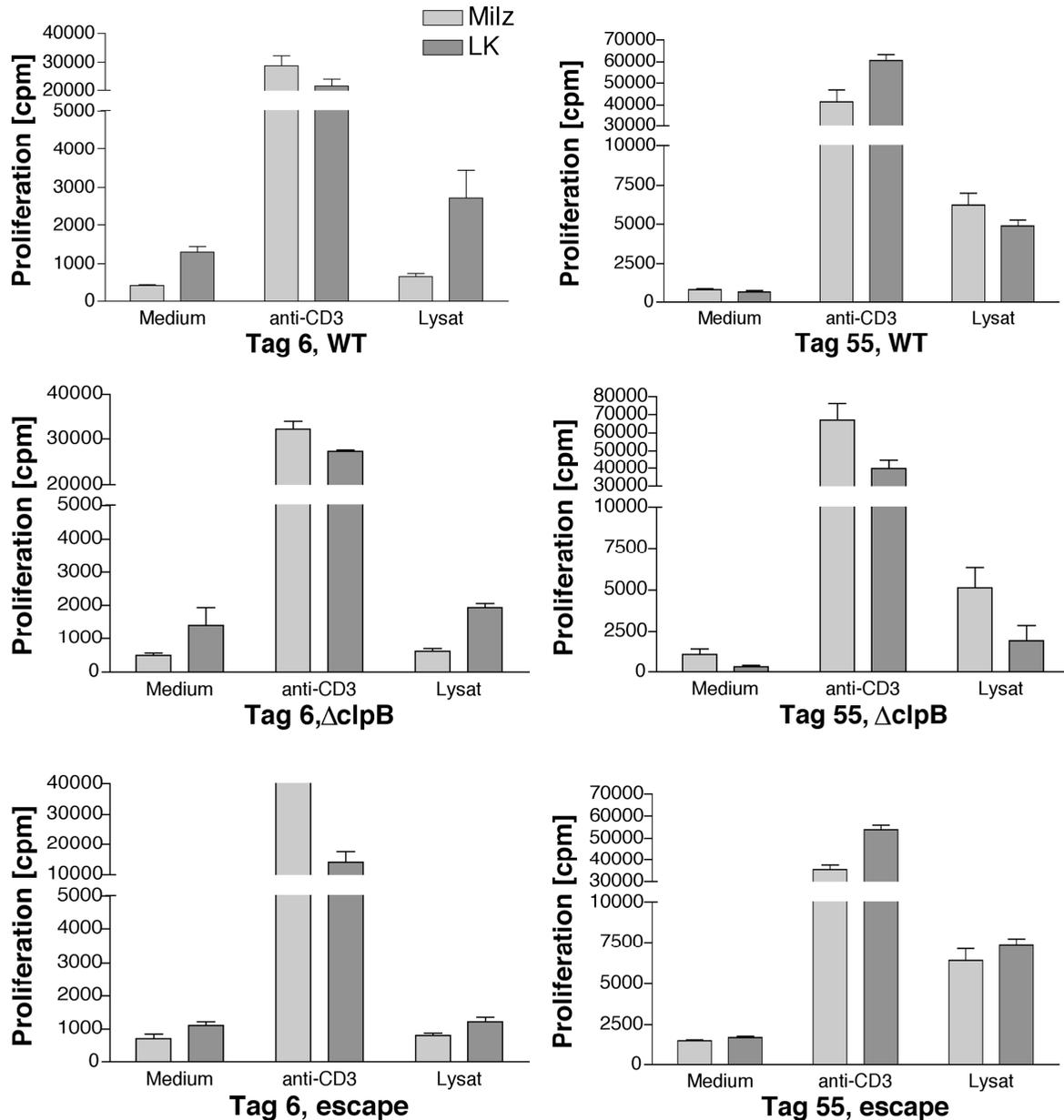
Eine Untersuchung der Organe nach 55-tägiger Infektion ergibt in keinem der untersuchten Lymphknoten eine nachweisbare IL4-Produktion, während die IFN $\gamma$ -Produktion nach Infektion mit *L.m. ΔclpB escape* noch immer erhöht ist.

Das beobachtete Zytokinmuster weist damit auf eine Th1- Antwort der *L.m. ΔclpB escape*-infizierten BALB/c Mäuse hin, während *L. major* WT, wie bereits beschrieben, eine Th2-Antwort induziert. Diese Ergebnisse könnten der Grund für die beobachtete reduzierte Parasitenlast in den Lymphknoten *L.m. ΔclpB escape*- infizierter BALB/c Mäuse sein.

### 3.1.5 Bestimmung der Proliferationsrate von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten

Durch die Bestimmung der Proliferationsrate von Milz- und Lymphknoten-Zellen sollte untersucht werden, ob der Unterschied im Lymphknotengewicht nach Infektion mit *L. major* WT bzw. *L.m. ΔclpB* auf eine unterschiedliche Proliferationsrate der Lymphozyten zurückzuführen war, und damit die unterschiedlich starkte Induktion der Immunantwort zu erklären war. Dazu wurde nach dem Abnehmen des Überstandes für die Zytokinbestimmung auf die in der Mikrotiterplatte verbleibenden Lymphozyten frisches Medium gegeben, das mit

$H^3$ -Thymidin supplementiert war. Dieses wird bei Proliferation der Zellen in ihre DNA eingebaut, und so während der Zellteilungen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Messung der Proliferation kann dann als Anzahl der *counts/Minute* bestimmt werden, und gibt Aufschluss über das Ausmaß der Proliferation.



**Abbildung 5: Bestimmung der Proliferationsrate von T-Zellen aus Milz- und Lymphknoten infizierter BALB/c Mäuse.** Zu je  $2 \times 10^5$  mit Medium, anti-CD3 und Leishmanien-Lysat stimulierten T-Zellen aus Milz bzw. Lymphknoten wurde  $^3H$ -haltiges Medium gegeben (jeweils  $0,25 \mu Ci$ ). Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellproliferation im  $\beta$ -Szintillationszähler analysiert, indem die Menge der inkorporierten Radioaktivität bestimmt wurde. Gezeigt ist das Maß der Proliferation als cpm (*counts per minute*) von Milz- und Lymphknoten Zellen nach 6- bzw. 55-tägiger Infektion mit WT,  $\Delta clpB$  und der escape Variante.

In der Proliferationsrate von Lymphozyten war nach einer Infektion mit *L. major* WT, der  $\Delta clpB$  Mutante oder der *L.m.*  $\Delta clpB$  escape Mutante weder bei Milz- noch Lymphknoten-Lymphozyten ein Unterschied in der Proliferationsrate zu verzeichnen. Im Lymphknoten war

die Proliferationsrate nach Infektion mit den verschiedenen Stämmen im Allgemeinen höher als in der Milz.

Der Unterschied in der Lymphknotenmasse nach Infektion mit *L. major* WT bzw. *L.m. ΔclpB escape* ist also nicht durch eine unterschiedliche Proliferation der Lymphozytenpopulationen begründet.

### **3.1.6 FACS-Analyse der isolierten Milz- und Lymphknotenzellen nach Infektion mit *L. major* WT, *ΔclpB*- und *L.m.ΔclpB escape* Mutante**

Die restlichen Zellen aus Milz und Lymphknoten, welche nicht zur Zytokinbestimmung eingesetzt worden waren, sollten im Folgenden einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS-Analyse: *fluorescent activated cell sorter*-Analyse) unterzogen werden. Dabei werden zunächst verschiedene Zelltypen in einem Zellgemisch mit fluoreszierenden Antikörpern gegen definierte Oberflächenepitope markiert. In einem sogenannten Durchflusszytometer werden die Zellen durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom einzelner Zellen einen Photodetektor passiert, und von einem Laserstrahl erfasst wird. Durch die Erfassung von charakteristischer Emissionstrahlung durch die konjugierten Antikörper sowie durch die Analyse von Lichtstreuung können Aussagen über den Anteil von Zellpopulationen im Gesamtgemisch, sowie über ihre Größe und Beschaffenheit getroffen werden.

Im Fall der aus Milz- und Lymphknoten stammenden Zellen sollte 6 Tage nach Infektion der jeweilige Anteil von B- und T-Zellen bestimmt werden, sowie eine Quantifizierung von CD25-positiven Zellen unter den CD4+ Zellen vorgenommen werden. Dabei handelt es sich bei dem Oberflächenmolekül CD25 um das  $\alpha$ -Segment des Interleukin 2 (IL2)-Rezeptors, das zusammen mit dem Th1-spezifischen IL2 selber von aktivierten T-Zellen zur eigenen Wachstums- und Proliferationssteigerung exprimiert wird. Demnach ist der Anteil von CD25-positiven Zellen unter den CD4+ T-Zellen ein Marker für die Aktivierung dieser T-Zellpopulation. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 6.

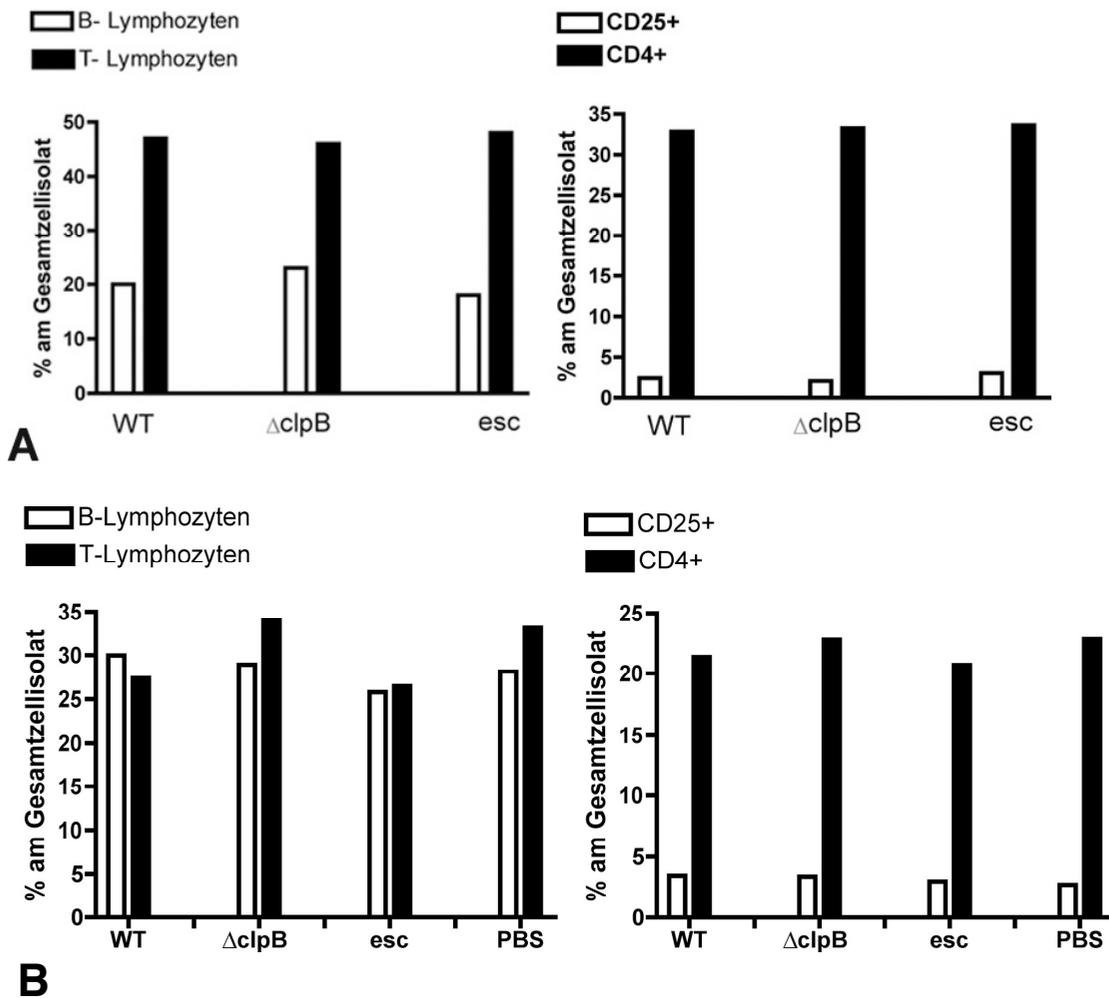
Der Anteil von B- bzw. T-Lymphozyten im Gesamtisolat unterscheidet sich weder in der Milz noch im Lymphknoten nach Infektion mit *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* und *L.m. ΔclpB escape* signifikant. In allen drei Lymphknoten sind zwischen 2,01- (*L.m. ΔclpB*) und 2,75- fach (*L.m. ΔclpB escape*) mehr T- als B-Lymphozyten nachweisbar. Der *L. major* WT-infizierte Lymphknoten liegt mit 2,37-fach mehr T- als B-Zellen im intermediären Bereich.

In allen drei untersuchten Milzgeweben dagegen sind vergleichbar viele T- und B-Lymphozyten nachweisbar. Das Verhältnis von B-Zellen zu T-Zellen beträgt 1,10 nach *L. major* WT-Infektion; 0,85 nach *L.m. ΔclpB*-Infektion und 0,97 nach *L.m. ΔclpB escape*-Infektion.

Das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen unterscheidet sich folglich nicht nach einer Infektion mit *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* oder *L.m. ΔclpB escape*.

Der Anteil an CD25-positiven Zellen unter den CD4+ T-Lymphozyten ist nach einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape* nicht erhöht im Vergleich zu *L. major* WT- und *L.m. ΔclpB*-infizierten Lymphknoten. Der Anteil der CD25-Positiven beträgt nach *L. major* WT- Infektion 13,46%, nach *L.m. ΔclpB*-Infektion 16,01%, und nach einer *L.m. ΔclpB escape*-Infektion 11%.

In den Milzgeweben betrug der Anteil der CD25- positiven T-Zellen 6,21% (WT), 6,74% (*L.m. ΔclpB*) und 6,95% (*L.m. ΔclpB escape*). Folglich ist eine vergleichbare Aktivierung von T-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten zu beobachten.



**Abbildung 6: Bestimmung des Anteils von B- und T-Lymphozyten sowie der CD25+ unter den CD4+ Zellen in Milz und Lymphknoten mittels Durchflusszytometrie.** BALB/c Mäusen wurden 6 Tage nach Infektion die Milz und der drainierende Lymphknoten entnommen. Nach Herstellung einer Zellsuspension wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt (anti-CD4 und anti-CD25 bzw. anti-CD19 und anti-CD4), und durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildungen zeigen den jeweiligen Anteil der B- und T-Zellen bzw. den Anteil CD25-positiver Zellen und der CD4-positiven Zellen von Lymphknoten (A) und Milz (B) in Prozent am Gesamtzellisolat.

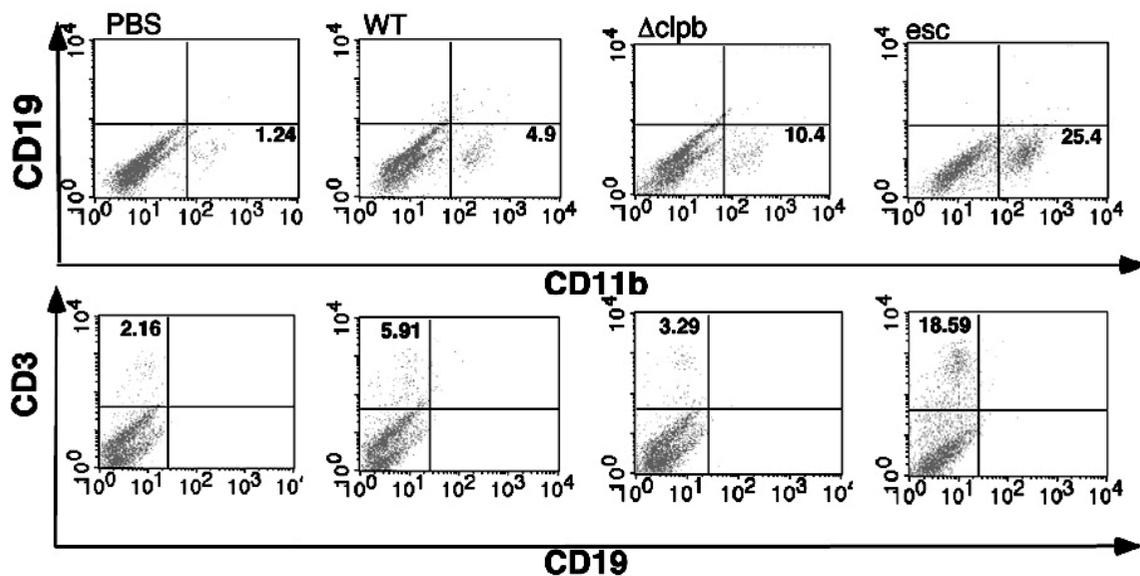
### 3.1.7 Untersuchung der einwandernden Zellpopulationen am Infektionsort durch die *air pouch* Analyse

Die Infektion einer BALB/c Maus mit *Leishmania major* resultiert üblicherweise in einer Th2 Antwort. Dabei werden charakteristische Zytokine exprimiert, die die B-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Diese leiten dann eine humorale Immunantwort ein, und sind damit für die Anfälligkeit von BALB/c Mäusen gegenüber einer *Leishmania*-Infektion verantwortlich.

Die Ergebnisse aus der Zytokinanalyse belegen, dass der *L.m. ΔclpB escape* Stamm im Vergleich zum *L. major* WT sowie zur *L.m. ΔclpB* Mutante eine höhere Interferon- $\gamma$  sowie eine verringerte Interleukin-4 Produktion der Lymphozyten verursacht. Dieses Zytokinmuster spricht für die Induktion einer Th1-Antwort. Da eine IFN $\gamma$  Ausschüttung u.a. die Rekrutierung von Makrophagen zum Infektionsherd einleitet, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob sich Art und Zahl der am Infektionsherd einwandernden Zellen nach Infektion mit den verschiedenen Stämmen unterscheiden. Dazu wurden jeweils zwei BALB/c

Mäusen zunächst subkutan ein Luftsack (*air pouch*) appliziert, in den anschließend separat die zu untersuchenden *Leishmania*-Stämme bzw. zur Negativkontrolle 1 ml PBS injiziert wurden (jeweils 2 Tier pro Stamm bzw. für eine PBS-Kontrolle). Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die eingewanderten Zellen durch mehrmaliges Spülen des Luftsacks isoliert und einer Durchflusszytometrie-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 8 gezeigt:

In zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils einer bzw. zwei Mäusen wurden die Zellisolate aus dem *air pouch* mit Antikörpern gegen Zell-spezifische Oberflächenepitope markiert. In der anschließenden Durchflusszytometrie-Analyse konnte gezeigt werden, dass im Luftsack-Infiltrat der *L.m. ΔclpB escape*-infizierten BALB/c Mäuse eine erhöhte Anzahl von Makrophagen zu verzeichnen ist: Nach Inokulation von *L.m. ΔclpB escape* beträgt der Anteil am Gesamtisolat 25,4%, während im Infiltrat nach subkutaner Infektion mit *L. major WT* bzw. *L.m. ΔclpB* lediglich 4,9% bzw. 10,4% der infiltrierten Zellen als Makrophagen identifiziert werden konnten.



**Abbildung 7: Analyse des *air pouch* Infiltrats mittels Durchflusszytometrie.** Das Infiltrat eines *air pouches* wurde isoliert, und mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenepitope gefärbt. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Anteil der jeweiligen Zellen am Gesamtzellisolat bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, in denen der Anteil an Makrophagen (CD11b) und CD4+ T-Zellen (CD3) bestimmt wurde. Durch eine Parallelbestimmung des Anteils CD19-positiver Zellen wurde der Gehalt an B-Zellen bestimmt. Die zahlen innerhalb der Kästchen geben den prozentualen Anteil der Makrophagen bzw. CD4+ T-Zellen am Gesamtzellisolat an.

Diese Ergebnisse wurden im zwei weiteren Experimenten mit jeweils einem Tier bestätigt: Hier betrug der Anteil der infiltrierten Makrophagen 28,6% (*L. m. ΔclpB escape*), 7,47% (*L. major WT*) sowie 5,48% (*L.m. ΔclpB*). Als Negativkontrolle wurde den Versuchstieren PBS in den Luftsack injiziert. Eine Bestimmung des Makrophagenanteils am Gesamtisolat ergab bei diesen beiden Tieren Werte von 2,63% bzw. 1,24%.

In jeweils zwei Mäusen wurde weiterhin eine erhöhte Infiltration von CD4-positiven T-Zellen beobachtet. Während der Anteil am Gesamtisolat nach Infektion mit *L.m. ΔclpB escape* 18,59% und 15,25% betrug, lag der Anteil nach *L. major WT* bzw. *L.m. ΔclpB*-Infektion lediglich bei 5,91% / 3,14% bzw. 3,29% / 6,35%.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Variation der infiltrierten Zellspezies aus einer Verletzung eines Blutgefäßes resultierte, wurde der Anteil an CD19-positiven Zellen bestimmt. Dieser Marker ist charakteristisch für B-Zellen, und sollte im Fall einer verletzten Blutbahn erhöhte Werte ergeben. In keiner der untersuchten *air pouches* ist diesem Ergebnis nach eine erhöhte Menge an B-Zellen nachzuweisen. Infolgedessen resultiert die Modifikation in der Infiltration der Inokulationsstelle nicht aus einer Gewebsverletzung. Keine signifikanten Unterschiede waren bei den Anteilen der infiltrierten natürlichen Killerzellen-(NK)-Zellen sowie den  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu verzeichnen (nicht gezeigt).

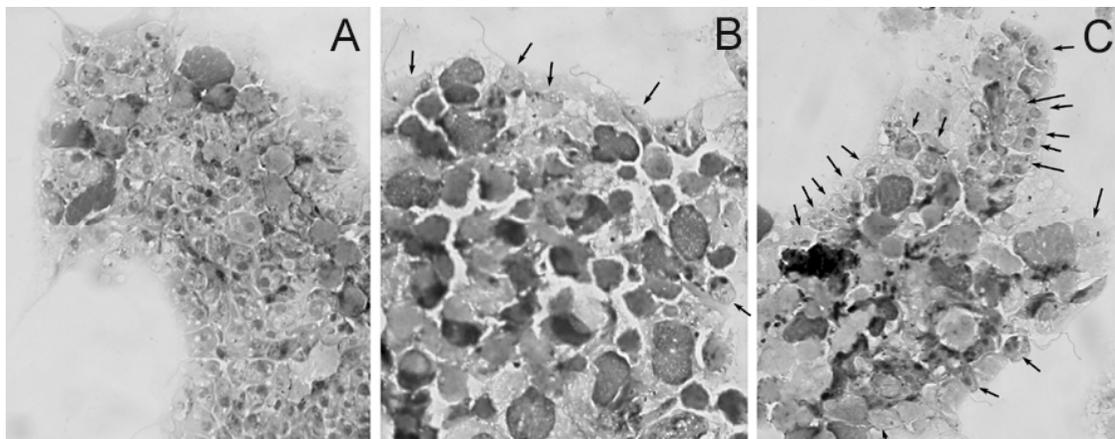
### 3.1.8 Untersuchung der Infektiosität in *in vitro* Makrophageninfektionsstudien

Wie bereits von Hübel *et al.* (1997) und Krobitch *et al.* (1999) gezeigt, sind *ClpB* defiziente *L. major* bzw. *L. donovani* Parasiten nicht in der Lage, eine Infektion in Makrophagen zu etablieren. Zwar können Makrophagen in geringem Ausmaß parasitiert werden, doch scheint der parasitenspezifische Mechanismus zur Erhaltung seiner Lebensfähigkeit im Phagolysosom des Makrophagen nicht mehr zu funktionieren.

Nach Infektion mit dem *L.m.  $\Delta clpB$  escape* Stamm erfolgte eine vermehrte, vermutlich IFN $\gamma$ -induzierte Einwanderung von Makrophagen an den Infektionsherd; unter diesen Umständen werden die Parasiten in einer C57BL/6 Maus eliminiert, und die Infektion wird kontrolliert.

Da die *L.m.  $\Delta clpB$  escape* Mutante trotz verminderter Parasitenlast eine Infektion mit Läsionsentwicklung etablieren kann, sollte im Folgenden überprüft werden, ob der *escape* Stamm im Vergleich zur  $\Delta clpB$ -Mutante eine erfolgreiche Infektion von Makrophagen bewerkstelligen kann.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Makrophagen aus dem Peritoneum von NMRI Mäusen isoliert, und mit einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  in *chamber slides* überführt. Nachdem sich die Makrophagen angeheftet hatten, wurden je  $1 \times 10^5$  Parasiten (*L. major* WT, *L. major  $\Delta clpB$*  sowie *L. major  $\Delta clpB$  escape*) zu den Makrophagen gegeben. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation bei 35°C wurde der Überstand entfernt; die Makrophagen wurden fixiert und nach einer Giemsa-Färbung mikroskopisch untersucht. Ein repräsentativer Ausschnitt der Färbungen wird in Abbildung 8 gezeigt:

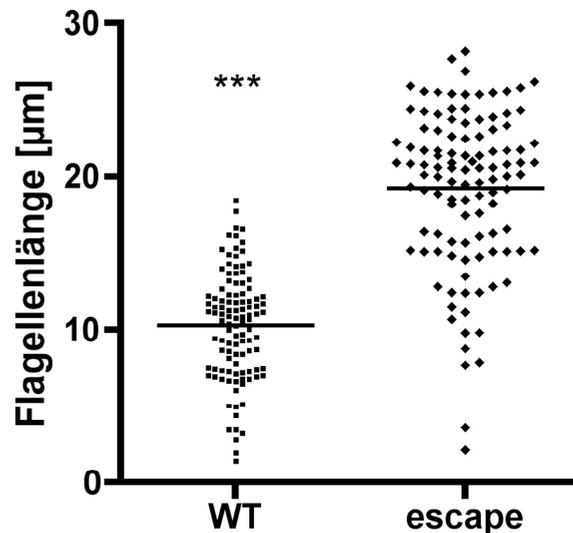


**Abbildung 8: *in vitro* Makrophageninfektion.**  $2 \times 10^5$  Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen wurden mit einer MOI von 1 mit *L. major* WT, *L.m.  $\Delta clpB$*  bzw. *L.m.  $\Delta clpB$  escape* infiziert, und für 48 Stunden bei 35°C inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa gefärbt. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der Objektträger bei 63-facher Vergrößerung.

Die gezeigten Ausschnitte weisen auf eine erhöhte Infektiosität der *L.m. Δc1pB escape* Mutante im Vergleich zu *L.m. Δc1pB* hin. Der größte Teil der intrazellulären *escape* Parasiten ist vollständig zur Amastigote differenziert, während die Parasiten der *L.m. Δc1pB* Mutanten zwar eine abgerundete Zellmorphologie aufweisen, aber die Flagellen nicht vollständig zurückgebildet worden sind. Die durch *L.m.Δc1pB escape* verursachte Parasitenlast innerhalb der Makrophagen ist jedoch im Vergleich zu WT-infizierten Makrophagen etwas reduziert.

### 3.1.9 Morphologie der *escape*-Population

Die Parasiten wurden in regelmäßigen Abständen einer Mauspassage unterzogen, wieder aus den Fußläsionen und Lymphknoten reisoliert, und als Promastigote *in vitro* weiterkultiviert. Dabei zeigte die Mehrzahl der Parasiten der *escape*- Mischpopulation nach jeder Passage ein deutlich verlängertes Flagellum gegenüber den *L. major* WT-Parasiten. Um festzustellen, ob die Flagellenlänge dieser Parasiten signifikant erhöht war, wurden die Parasiten jeweils auf einem Objektträger ausgestrichen und einer Giemsa-Färbung unterzogen. Anschließend wurde die Geißellänge von je 110 Parasiten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt: Die Flagellenlänge der *L.m. Δc1pB escape*-Parasiten beträgt im Durchschnitt ca. 19  $\mu\text{m}$ , und ist signifikant ( $p < 0.001$ ) länger als die Geißeln der *L. major* WT Parasiten (durchschnittlich ca. 10  $\mu\text{m}$ ).



**Abbildung 9: statistische Auswertung der Geißellänge.** *L. major* WT- und *L.m.Δc1pB escape*-Parasiten wurden auf einem Objektträger ausgestrichen, fixiert und einer Giemsa-Färbung unterzogen. Die Geißellänge von je 110 Parasiten wurde durch Ausmessen mit Hilfe der Openlab Software bestimmt und in der Abbildung als einzelne Punkte dargestellt. Der Mittelwert ist in der Abbildung als waagerechter Balken dargestellt.

### 3.1.10 Klonierung der *escape*-Population

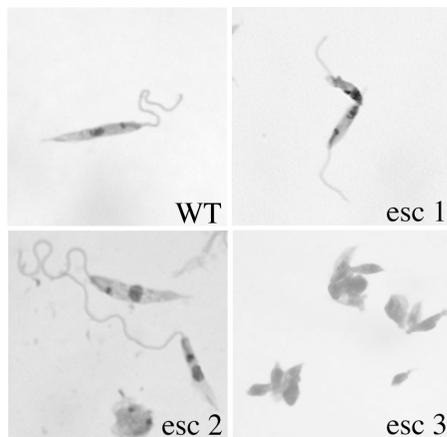
Nach der Isolation von *escape* Parasiten aus den Fußläsionen infizierter BALB/c Mäuse wurde eine langsame Replikation der Zellen im Vergleich zu *L. major* WT beobachtet. Während der *in vitro* Kultivierung ging jedoch dieser Phänotyp jeweils rasch verloren. Zudem konnten im Verlauf der *in vitro* Kultivierung immer weniger Parasiten mit der unter 3.1.9 beschriebenen verlängerten Geißel beobachtet werden. Um einen stabileren Phänotyp zu erhalten, sollten die Parasiten der *escape*-Population kloniert werden. Dazu wurden die Zellen seriell verdünnt, und mit (rechnerisch) einer Zelle pro 200  $\mu\text{l}$  in 96 wells einer

Mikrotiterplatten eingesäht. Schnell wachsende Zellen wurden verworfen, da auf den ursprünglichen Phänotyp „langsames Wachstum“ selektioniert werden sollte. Nachdem die Einzelklone herangewachsen waren, konnten bei mikroskopischen Analysen drei langsam wachsende Klone identifiziert werden. Diese wurden in frisches Kulturmedium eingesäht, und einzeln als *L.m. ΔclpB escape-1*, -2 und -3 weiterkultiviert. Zur genaueren Charakterisierung wurden anschließend Zellen auf einem Objektträger ausgestrichen und einer Giemsa-Färbung unterzogen. Abbildung 10 zeigt die unterschiedlichen Zellmorphologien der klonierten Parasiten:

*L.m. ΔclpB escape-1* zeigt keine außergewöhnliche Morphologie. Der Zellkörper zeigt eine *L. major*-typische Größe bzw. Morphologie. Die Geißel wirken leicht verkürzt im Vergleich zu den Wildtyp-Flagellen.

*L.m. ΔclpB escape-2* dagegen fällt durch eine extrem verlängerte Geißel auf. Auch der Zellkörper scheint während der logarithmischen Wachstumsphase länglicher und schmäler zu sein, wie dies auch bei spätstationären, metazyklischen Promastigoten beobachtet wird.

Die dritte klonierte Zelllinie dagegen weist gar kein bzw. ein stark verkürztes Flagellum auf. Der Zellkörper ist im Vergleich zum Wildtyp leicht abgerundet.



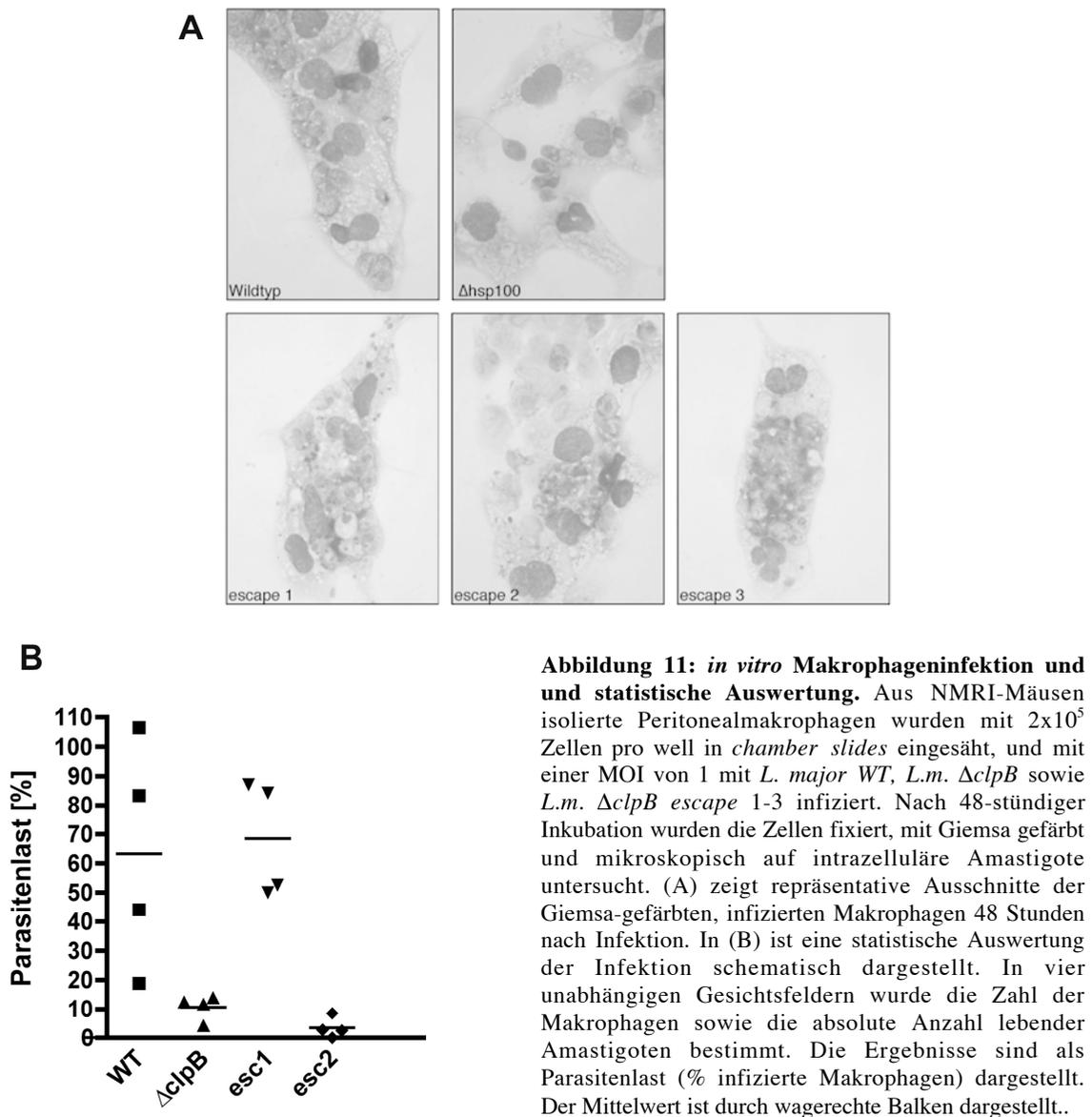
**Abbildung 10: Morphologie der *escape*-Einzelklone.** Ein Aliquot einer logarithmisch wachsenden Kultur von *L. major* WT und *L.m.ΔclpB escape 1-3* wurde auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen, mit Methanol fixiert, und einer Giemsa-Färbung unterzogen. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der gefärbten Objektträger bei 63-facher Vergrößerung.

### 3.1.11 Infektiosität der klonierten *escape*-Populationen

#### a) *In vitro* Makrophagen- Infektion mit den klonierten *escape*-Stämmen 1-3

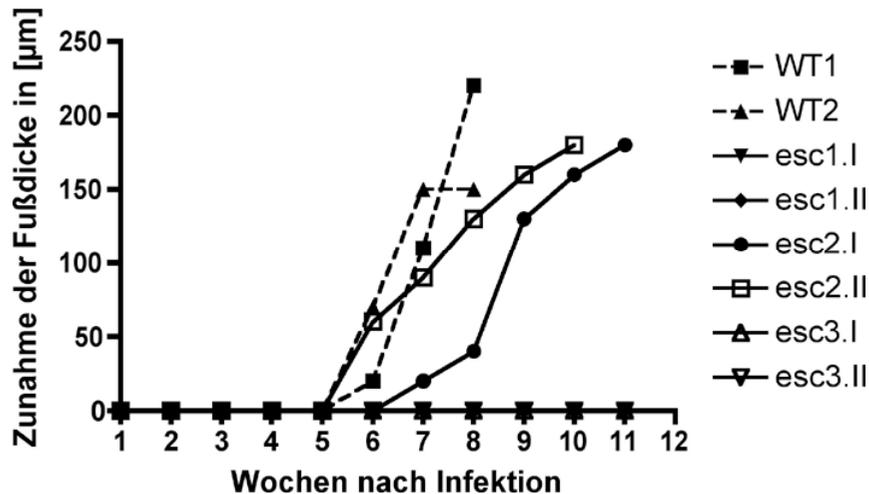
Nachdem aus der *L.m. ΔclpB escape* Population drei phänotypisch unterschiedliche Einzelklone isoliert werden konnten, sollte überprüft werden, ob sich diese in ihrer Fähigkeit zur Infektion von Makrophagen unterscheiden. Dazu wurden zunächst Peritonealmakrophagen aus NMRI Mäusen isoliert und mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  in *chamber slides* eingesäht. Nachdem die Makrophagen adherent waren, erfolgte die Zugabe von jeweils  $2 \times 10^5$  promastigoten Kulturformen von *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* sowie den drei Einzelklonen der *escape* Mutante (*L.m. ΔclpB escape1-3*). Nach 48-stündiger Inkubation bei 35°C wurde der Überstand entfernt, die Zellen fixiert, einer Giemsa-Färbung unterzogen und mikroskopisch analysiert. In Abbildung 11A ist ein repräsentativer Ausschnitt der gefärbten Objektträger dargestellt. 11B zeigt eine statistische Auswertung der Parasitenlast der Makrophagen nach der Infektion mit den verschiedenen Stämmen.

Die *escape*- Stämme 1 und 3 zeigen nach 48 Stunden nach Infektion eine mit dem Wildtyp vergleichbare Parasitenlast von 65% bzw. 68% (nach Infektion mit *escape 1* bzw.-3) versus 63% nach *L. major* WT- Infektion. Die Parasiten sind offenbar vollständig zu Amastigoten differenziert. Im *L.m. ΔclpB escape 2*- infizierten Makrophagen sind insgesamt deutlich weniger Parasiten zu finden, die Parasitenlast beträgt nur 3%. Bei einigen dieser Parasiten ist darüber hinaus noch das Flagellum zu sehen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Differenzierung zur Amastigote nicht abgeschlossen wurde. Die Parasiten gleichen in Zahl und Aussehen eher der *L.m. ΔclpB* Mutante, die eine Parasitenlast von 10% hervorruft, und damit die bereits beschriebene, stark herabgesetzte Fähigkeit zur Infektion von isolierten Makrophagen zeigt. Der klonierten *escape*- Stamm *L.m. ΔclpB escape- 2* unterscheidet sich folglich von den anderen beiden Stämmen hinsichtlich seiner Morphologie und der Fähigkeit zur Parasitierung von Makrophagen.



### b) Infektion von BALB/c Mäusen mit den klonierten *escape*-Stämmen

Da eine *in vitro* Infektion von Makrophagen immer nur einen Teilaspekt der natürlichen Infektion widerspiegelt, sollte die Infektiosität der drei isolierten Einzelklone im Vergleich zu *L. major* WT und *L.m. Δc1pB* im Tiermodell untersucht werden. Dies geschah im Rahmen der Erregerpassage in BALB/c Mäusen. Dazu wurden je 2 BALB/c Mäuse mit  $1 \times 10^7$  promastigoten Kulturformen durch subkutane Applikation in den rechten Hinterfuß infiziert. Der Infektionsverlauf wurde wie bereits beschrieben durch wöchentliches Messen der Fußschwellung dokumentiert. Abbildung 12 zeigt die Entwicklung der Fußläsionen in Abhängigkeit der Zeit nach Infektion:



**Abbildung 12:** *in vivo* Infektion von BALB/c Mäusen mit den *escape*-Einzelklonen. Jeweils  $1 \times 10^7$  metazyklische Parasiten (*L. major* WT, *L.m. Δc1pB escape*- 1, -2 und -3) wurden subkutan in den Fußballen von BALB/c Mäusen inokuliert (2 Tier pro Gruppe). Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentliches Messen der Fußballenschwellung dokumentiert, und ist in der Abbildung als Zunahme der Fußdicke in  $\mu\text{m}$  gezeigt. Der Infektionsverlauf von jedem einzelnen Tier ist in der Abbildung separat dargestellt.

Anhand des gezeigten Infektionsverlaufs wird deutlich, dass nur die Mäuse, die mit dem *L.m.Δc1pB escape*-2 Stamm infiziert sind, eine Läsionsentwicklung an der Infektionsstelle zeigen. Die Fußballenschwellung ist wie bei den *L. major* WT-infizierten Kontrolltieren erstmals 5-6 Wochen nach Infektion zu beobachten. Die Läsionsentwicklung ist vergleichbar mit der durch die *escape*-Mischpopulation hervorgerufenen Infektionsprogression: die *L.m. Δc1pB escape*-2 induzierten Läsionen beginnen nicht zu ulzerieren. *L.m. Δc1pB escape*1- und 3 verursachen wie die *L.m. Δc1pB* Mutante in keiner der beiden Mäuse eine Fußballenschwellung.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die *L.m. Δc1pB escape* 2 Mutante für die Läsionsentwicklung verantwortlich ist, die nach der Infektion mit der *escape*-Mischpopulation zu beobachten ist. Damit stehen diese Ergebnisse zunächst im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vitro* Makrophagen-Infektionsexperimente, in denen *L.m. Δc1pB escape*1- und 3 eine höhere Virulenz als die *L.m. Δc1pB escape* 2 Mutante zeigten.

#### 3.1.12 Versuch des Nachweises eines stadienspezifischen Proteins der Metacylogenese

*L.m.Δc1pB escape* 2-Parasiten zeichnen sich durch eine im Vergleich zu den anderen Stämmen längeren und schlankeren Zellkörper, sowie ein verlängertes Flagellum aus. Diese Veränderung der Zellgestalt wird auch bei Promastigoten in der späten Stationärphase beobachtet, die in die sogenannte Metazyklogenese eintreten. Dabei differenzieren die

prozyklischen Zellen zu metazyklischen Promastigoten, die u.a. durch die eben beschriebene Zellform und eine Einstellung der Zellteilung charakterisiert werden. In diesem Entwicklungsstadium sind die Zellen hochinfektiös. Es wurde bereits gezeigt, dass die Differenzierung zu metazyklischen Promastigoten mit einer Resistenz gegen Komplement-vermittelte Lyse verbunden ist, und damit einen Einfluß auf die Infektiosität von Leishmanien haben kann (Puentes et al., 1990).

In den Mausinfektionsexperimenten wurde durch *L.m. ΔclpB escape 2* eine Läsionsbildung verursacht, die Infektion mit *L.m. ΔclpB escape 1-* und *3* aber blieb asymptomatisch. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Fähigkeit zur Ausbildung einer erfolgreichen Infektion von *L.m. ΔclpB escape 2* auf einer dauerhaften Arretierung im metacyklischen Stadium beruhte, bzw. ob im Gegenzug *L.m. ΔclpB escape 1-* und *3* nicht zur metacyklischen Promastigote differenzieren. Dazu sollte in einem Immunblot der Nachweis des Proteins SHERP (*small hydrophilic endoplasmatic reticulum related protein*) erfolgen, das stadienspezifisch in metazyklischen Promastigoten exprimiert wird.

Zelllysate aus verschiedenen Entwicklungsstadien (logarithmisches Wachstum, frühe Stationärphase, späte Stationärphase sowie Wachstums- arretierte Zellen) von *L. major WT*, *L.m. ΔclpB* sowie *L.m. ΔclpB escape 1, -2* und *-3* wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Proteilmuster wurde auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert, und mit einem monoklonalen Antikörper gegen SHERP hybridisiert. Der Nachweis erfolgte durch einen zweiten, alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper und colorimetrischem Nachweis mit NBT und x-Phosphat.

Auf dem Immunoblot konnte in keinem der Lysate ein Signal nachgewiesen werden. Auch ein bis zu 20-fach sensitiveres Nachweissystem (*horseradish-peroxidase*-konjugierter Zweitantikörper und Einsatz des „*Super Sensitive*“-Kits, das auf der Emission von Chemilumineszenz beruht, konnte keine Signale nachweisen.

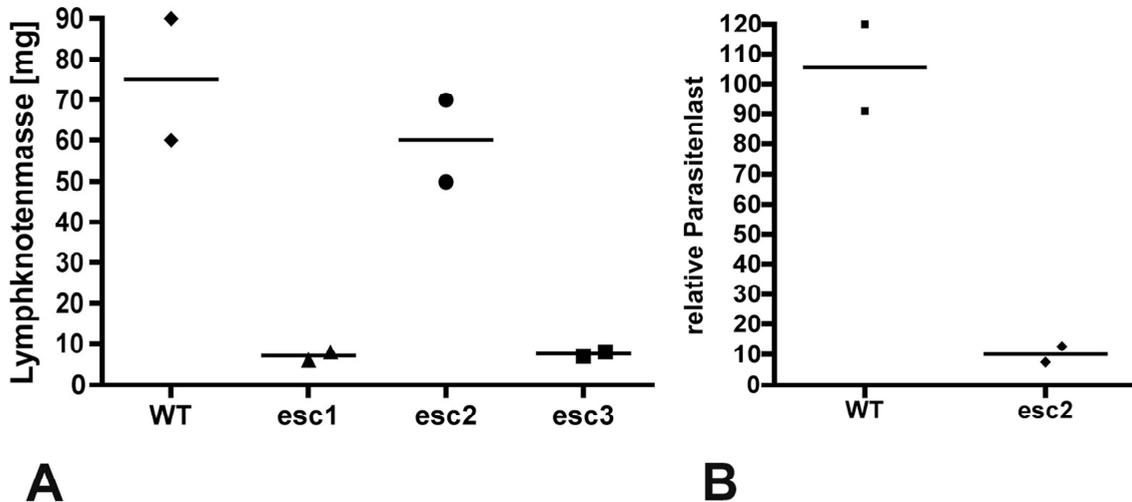
Die Metazyklogenese konnte folglich nicht anhand der Expression von SHERP nachgewiesen werden. Da allerdings auch in der Postivkontrolle (spätlogarithmisch, Wachstums-arretierte Wildtyp-Zellen) kein Signal zu erkennen war, waren möglicherweise die Nachweissysteme ungeeignet. Es kann also nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass die Zellform sowie die erhöhte Virulenz von *L.m. ΔclpB escape 2* im Vergleich zur *L.m. ΔclpB* Mutante auf ein ähnliches Stadium zurückzuführen ist.

### **3.1.13 Untersuchung der Lymphknotenmasse und der Parasitenlast nach Infektion mit *L.m. ΔclpB escape 1, -2* und *-3***

Die *L.m. ΔclpB escape*-Stämme 1-3 weisen eine unterschiedliche Fähigkeit auf, eine Läsionsbildung in BALB/c Mäusen zu induzieren. Um zu untersuchen, ob die Läsionsbildung mit der Parasitenlast korreliert, sollten die Lymphknoten von BALB/c Mäusen nach einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape 1, -2* und *-3* untersucht werden. Dazu wurde den zur Erregerpassage mit  $1 \times 10^7$  Parasiten infizierten BALB/c Mäusen (Infektionsverlauf siehe Abb. 12) 11 Wochen nach Infektion der drainierende Lymphknoten entnommen, gewogen und zur Isolation von Gesamt-DNA eingesetzt. Wie unter 2.2.20 beschrieben wurde in einer *real time* PCR das Verhältnis von *Leishmania*- DNA zu Maus-DNA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 aufgetragen:

Die Lymphknotengewichte sind nach einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape 2* mit 50 mg und 70 mg ähnlich hoch wie nach einer Infektion mit *L. major WT* (60 mg und 90 mg). Dagegen weisen die Lymphknoten nach einer Infektion mit *L.m. ΔclpB escape 1* und *-3* jeweils ein Gewicht von weniger als 10 mg auf (13A).

Die Parasitenlast steht in Korrelation mit der Lymphknotengröße: Die Lymphknoten mit höherem Gewicht (nach *L. major* WT und *L.m. ΔclpB escape 2*-Infektion) weisen auch eine signifikant erhöhte Parasitenlast gegenüber den *L.m. ΔclpB escape 1* und -3 auf, in denen keine Parasiten-DNA nachgewiesen werden konnte (13B).



**Abbildung 13: Lymphknotenmasse versus Parasitenlast escape 1-3.** Nach 11-wöchiger Infektion wurden die drainierenden Lymphknoten der infizierten Mäuse (2 Tier pro Gruppe) isoliert und gewogen. Die Lymphknotengewichte sind in (A) dargestellt. Die waagerechte Linie deutet das mittlere Gewicht von zwei Lymphknoten an. In (B) ist die relative Parasitenlast pro Lymphknoten dargestellt. Die Gesamt-DNA jedes Organs wurde zur *real time* PCR eingesetzt, und der relative Gehalt an Parasiten-DNA in Relation zur Maus-DNA gesetzt. Waagerechte Balken symbolisieren den Mittelwert von zwei untersuchten Lymphknoten.

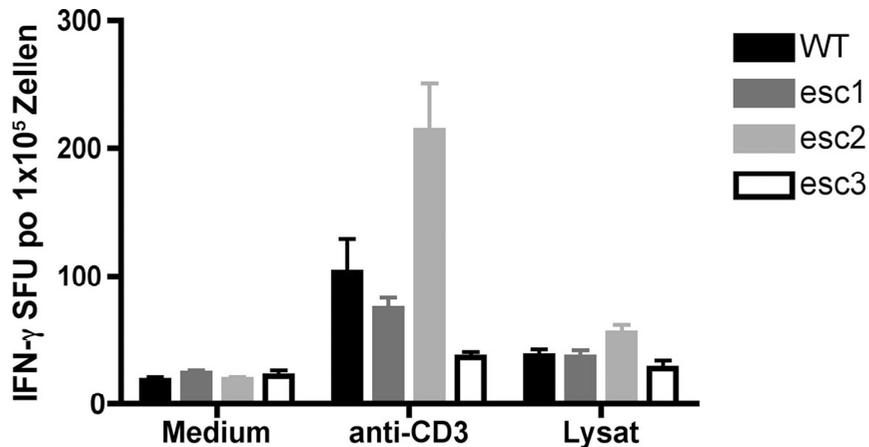
### 3.1.14 Untersuchung des Zytokinmusters nach Infektion den *L.m. ΔclpB escape1-3*

Die *escape*-Population zeichnete sich in der ersten Zytokin-Analyse durch die Induktion einer Th1-Antwort des Immunsystems aus, die zu einer Kontrolle der Infektion führte. Da diese Population aus einem heterogenen Gemisch verschiedener Klone bestand, die unterschiedliche Infektiositätsprofile aufwiesen, sollte im Folgenden untersucht werden, welcher der isolierten Einzelklone eine potentiell protektive Immnantwort induzieren kann. Zu diesem Zweck wurden die Milzen *L. major* WT-,  $\Delta clpB$ -, *escape 1*- und -3 -infizierter BALB/c Mäuse (Abb. 13, 2 Tiere pro Stamm) isoliert, um die Lymphozyten auf ihre Zytokinproduktion zu untersuchen. Dabei erfolgte die Zytokinbestimmung unter Zuhilfenahme eines semiquantitativen Elispot-Tests, der sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet als der *sandwich* ELISA-Test. Die szernierten Zytokine jedes einzelnen Lymphozyten können beim Einsatz eines entsprechenden Farbstoffes in Form von gefärbten *spots* sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 14.

Die Stimulierung der Lymphozyten erfolge wie bereits beschrieben mit Medium als Negativkontrolle und anti-CD3 als Postivkontrolle. Hier läßt sich bereits erkennen, dass lediglich der WT sowie *escape 2* eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion induzieren. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur diese beiden Parasiten-Stämme nach der Dauer der Infektion noch im Wirtsgewebe nachweisbar waren (siehe Ergebnisse der *real time* PCR, Abbildung 13B), und die Lymphozyten zu einer Zytokinproduktion veranlassen. Da die *real time* PCR keine DNA der  $\Delta clpB$ -Mutante bzw. von *escape 1* und -3 nachweisen konnte, kann davon ausgegangen werden, dass keine Parasiten mehr vorhanden waren, die eine Zytokin-Produktion induziert hätten.

Nach der Stimulierung mit *Leishmania*-Lysat ist in keiner der Milzpräparate eine überdurchschnittliche IFN- $\gamma$ -Produktion nachweisbar. Offenbar hinterläßt keiner der klonierten *escape*-Stämme dauerhaft eine protektive Th1-Antwort.

Interleukin 4 (IL4) konnte in dieser Studie nicht quantifiziert werden. Möglicherweise war das Nachweissystem nicht sensitiv genug, um geringe Mengen von IL4 nachzuweisen.



**Abbildung 14: Bestimmung der IFN $\gamma$ -Produktion im Milzgewebe infizierter BALB/c Mäuse durch den Elispot-Test.** Zur Bestimmung der IFN $\gamma$ -Sekretion wurde aus den isolierten Milzen (2 Tiere pro Gruppe) ein Zellhomogenat hergestellt und mit Medium, anti-CD3 sowie *Leishmania*-Lysat stimuliert. Die IFN $\gamma$ -Sekretion einzelner Lymphozyten wurde anhand der Anzahl und Intensität der *spots* im Elispot-Reader ausgewertet, und ist auf der y-Achse als IFN- $\gamma$  SFU (*spot forming unit*) pro  $1 \times 10^5$  Zellen angegeben. Die Werte resultieren aus jeweils einer Dreifachbestimmung jedes Milzhomogenats.

### 3.1.15 Untersuchung des Genoms von *L.m.ΔclpB escape* in der Pulsfeldgelelektrophorese

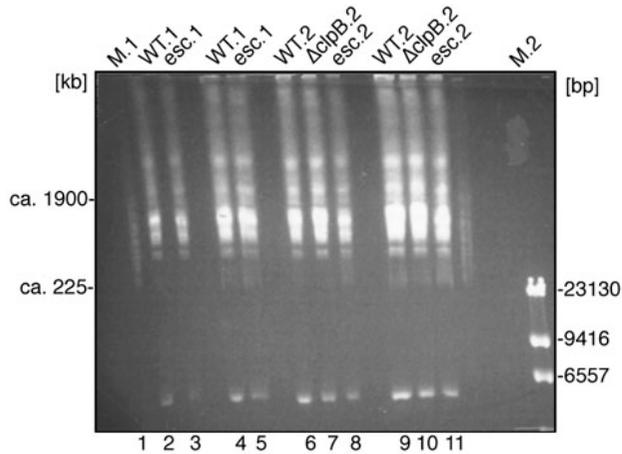
Die  $\Delta clpB$  *escape*-Mutante wurde erstmals während einer Mauspassage beobachtet, in der sie *L. major* WT-vergleichbare Läsionsentwicklungen verursachte. Da bereits beschrieben wurde, dass die *L.m. ΔclpB* Mutante mit großer Verzögerung im Vergleich zum Wildtyp Läsionsbildungen verursachen kann, müssen die Parasiten während der Zeit zwischen Inokulation und Beginn einer Läsionsentwicklung im Wirt persistieren. Dieses wird durch eine ähnliche Beobachtung von Späth *et al.* (2003) untermauert, dass eine Phosphoglykan-defiziente *L. major* Population keine Läsionsentwicklung bei infizierten BALB/c Mäusen mehr verursacht, aber trotzdem bis zu 759 Tage nach Infektion im Wirt nachweisbar ist. Offenbar findet eine Selektion auf solche Parasiten statt, die sich trotz eines Virulenzverlustes erfolgreich der Immunabwehr des Wirtes entziehen.

Leishmanien zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, unter hohem Selektionsdruck relevante Gene zu amplifizieren (Segova *et al.*, 1994). Beispielsweise werden unter steigenden Geldanamycindosen, einem spezifischen HSP90- Inhibitor, extrachromosomale Einheiten von HSP90- Genkopien angelegt (Wiesgigl und Clos, 2001)

Da die Persistenz avirulenter Leishmanien im Wirtsgewebe einen hohen Selektionsdruck darstellt, sollte untersucht werden, ob die *L.m. ΔclpB escape*- Mutante für die Virulenzsteigerung relevante Gene amplifiziert hatte, die ihr wieder die Fähigkeit zur Läsionsbildung und damit zur Vermehrung vermitteln. Dazu wurden zunächst Leishmanien in Agaroseblöckchen eingebettet, die anschließend in einer Lösung mit Proteinase K verdaut wurden. Das hatte zur Folge, dass der Chromosomensatz der Zellen frei in der Agarose vorlag, und anschließend in der Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt werden konnte. Das Ergebnis zeigt Abbildung 15

Das Gel zeigt die aufgetrennten Chromosomensätze promastigoter Stadien von *L. major* WT und der *L.m. ΔclpB escape*- Mischpopulation nach zwei voneinander unabhängigen Mauspassagen. Die *L.m. ΔclpB* Mutante wurde nicht passagiert, da üblicherweise keine Zellen aus dem Gewebe reisolieren können.

Alle Stämme weisen ein identisches Chromosomenmuster auf. Es sind keine zusätzlichen Geneinheiten in der DNA-Präparation der *L.m. ΔclpB escape*-Mutante zu erkennen. Sollten Genamplifikationen stattgefunden haben, dann sind diese offenbar nicht als extrachromosomale Einheiten angelegt worden. Mutationen in relevanten Genen bzw. *in situ* Amplifikationen von Genen kann jedoch nach der Pulsfeldgelelektrophorese nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 15: Pulsfeldgelelektrophorese.** Je  $2.5 \times 10^7$  Leishmanien (*L. major* WT, *L.m. ΔclpB* und *L.m. ΔclpB escape*) wurden in Agaroseblöckchen eingeschlossen, und zur Freisetzung der Chromosomen mit Proteinase K verdaut. Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel, in dem die Chromosomen durch Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt worden sind. Die Parasiten für dieses Experiment wurden aus zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Mauspassagen gewonnen (Präparation 1 und 2: WT.1; esc.1 bzw. WT.2; ΔclpB.2; esc.2). rechts und links sind die Positionen von Größenstandards dargestellt (links: Chromosomensatz aus *Saccharomyces cerevisiae*; rechts: λ-HindIII).

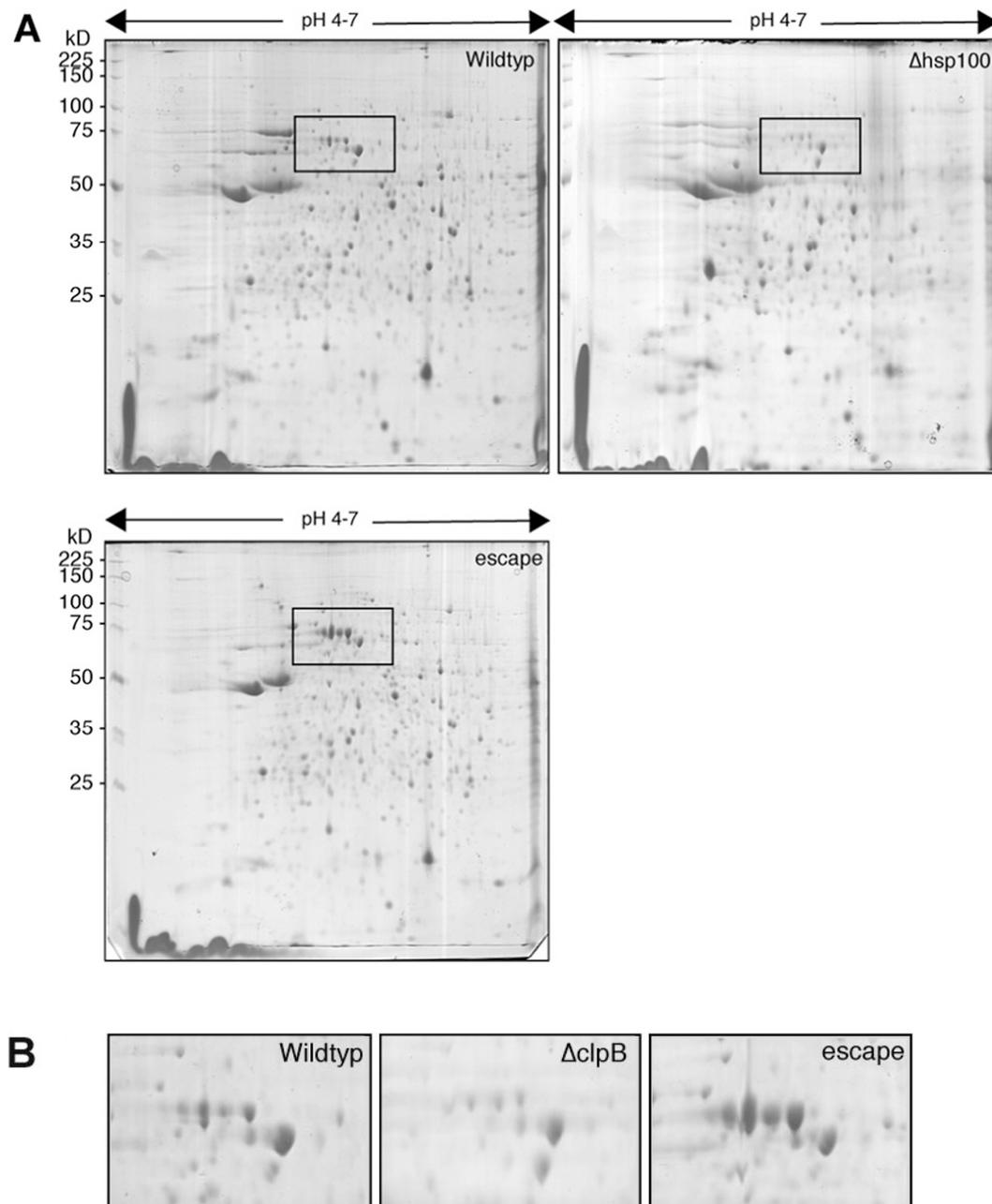
### 3.1.16 Proteomics-Analyse des Proteoms des *escape*-Mischisolats und der klonierten *escape* Stämme

Die drei klonierten *escape*-Stämme zeigen einen unterschiedlichen Phänotyp bezüglich ihrer *in vivo* und *in vitro*-Infektiosität sowie in ihrer Morphologie. Um einen Einblick in die Unterschiede auf molekularer Ebene zu erhalten, sollte eine vergleichende Proteom-Analyse durchgeführt werden. Bei dieser Untersuchung kann das Proteom, der unter definierten Bedingungen exprimierte Satz von Proteinen, von verschiedenen Stämmen miteinander verglichen werden. In unserem Fall bietet sich eine solche Proteom-Analyse an, da die Pulsfeldgelelektrophorese bereits gezeigt hatte, dass keine extrachromosomale Genamplifikation für die beobachtete Virulenzsteigerung der *escape*-Stämme verantwortlich war. Sollte eine Expressionssteigerung eines relevanten Gens für die Virulenz verantwortlich sein, muß die erhöhte Proteinmenge unter bestimmten Voraussetzungen in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar werden.

Die *escape*-Mutante wurde ursprünglich als Mischpopulation isoliert. Trotz unterschiedlicher Infektiositätsprofile sind alle drei *escape*-Stämme zu Anfang erfolgreich aus der Fußläsion einer BALB/c Maus kloniert worden. Daher sollten in der folgenden Analyse neben Lysaten aus den Einzelklon- Populationen *escape* 1-3 auch Lysate aus der Mischpopulation untersucht werden, da die Möglichkeit bestand, dass sich Unterschiede im Proteom durch additive bzw. synergistische Wirkung der drei Stämme hervorgerufen werden.

Sowohl vom *escape*-Mischisolat als auch von den klonierten Populationen *L.m. ΔclpB escape* 1-3 wurden zunächst Gesamtprotein- Zellysate hergestellt, die anschließend durch eine isoelektrische Fokussierung entlang eines immobilisierten pH-Gradienten aufgetrennt wurden. In der zweiten Dimension erfolgte eine weitere Auftrennung der bereits nach ihrem isoelektrischen Punkt geordneten Proteine nach ihrer Größe, so dass jedes Protein des

Gemisches als charakteristischer Punkt auf einem Gel dargestellt wurde. In Abbildung 16 ist eine vergleichende Proteomanalyse dargestellt:



**Abbildung 16: Proteom- Analyse der *escape*- Mischpopulation.** (A) Die Proteine aus Gesamtzelllysaten von je  $5 \times 10^8$  *L. major* WT-, *L.m.*  $\Delta clpB$ - Parasiten sowie der *L.m.* $\Delta clpB$  *escape*- Mischpopulation wurden in einer isoelektrischen Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt sortiert (pH4-7), und anschließend in der zweiten Dimension in einem 11%-igen SDS- Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Abbildung zeigt drei vollständige Coomassie-Brillant-Blau gefärbte 2D-Proteingele mit den aufgetrennten Proteinen der verschiedenen Stämme. Auf der linken Seite sind die Größen von Standardproteinen aufgetragen, der pH-Gradient der ersten Dimension ist auf der horizontalen Achse über den Gelen markiert. (B) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des markierten Bereichs aus (A).

In 16A sind drei vollständige 2D-Gele abgebildet, die die Auftrennung eines Gesamtzelllysates von *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* und der *L.m. ΔclpB escape*-Mischpopulation zeigen. Die einzigen reproduzierbaren Unterschiede sind im Bereich pH 5-6/60 kDa zu sehen. Dieser Bereich wurde daher vergrößert in 16B dargestellt. Diese Proteingruppe zeigt eine intermediäre *spot*-Intensität in der *L. major* WT-Präparation. In der *L.m. ΔclpB* Mutante scheinen diese Proteine einer geringeren Expressionsrate zu unterliegen, während sie im *L.m. ΔclpB-escape* Stamm sowohl gegenüber dem Wildtyp als auch gegenüber der *L.m. ΔclpB* Mutante in ihrer Intensität stark erhöht erscheinen.

Diese Protein-*spots* wurden im Folgenden aus dem Gel ausgestochen, entfärbt, und mit Trypsin behandelt. Die tryptischen Peptide wurden extrahiert und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die Daten wurden von Dr. Joachim Clos erhoben und mit Hilfe der MS-Fit Software unter Nutzung der vorläufigen Proteindatenbank des *L. major* Genomprojektes ausgewertet. Ein Vergleich mit Trypsin-Fragmenten bereits bekannter Proteine ergab, dass es sich bei den zu untersuchenden Proteinen um Bestandteile der Flagellen handelt, die *para flagellar rod*-Proteine 1d und 2c (PFR1d/PFR2c). Die *L.m. ΔclpB* Mutante zeigt also im Vergleich zu *L. major* WT eine verminderte PFR-Protein Expression, während die Mischpopulation der *escape*-Mutante eine erhöhte Expression vorweist. Abbildung 17A zeigt die Proteomanalyse der Populationen *L. major* WT im Vergleich zu den klonierten *escape*-Populationen 1-3, in 17B sind die Ergebnisse in tabellarischer Form dargestellt.

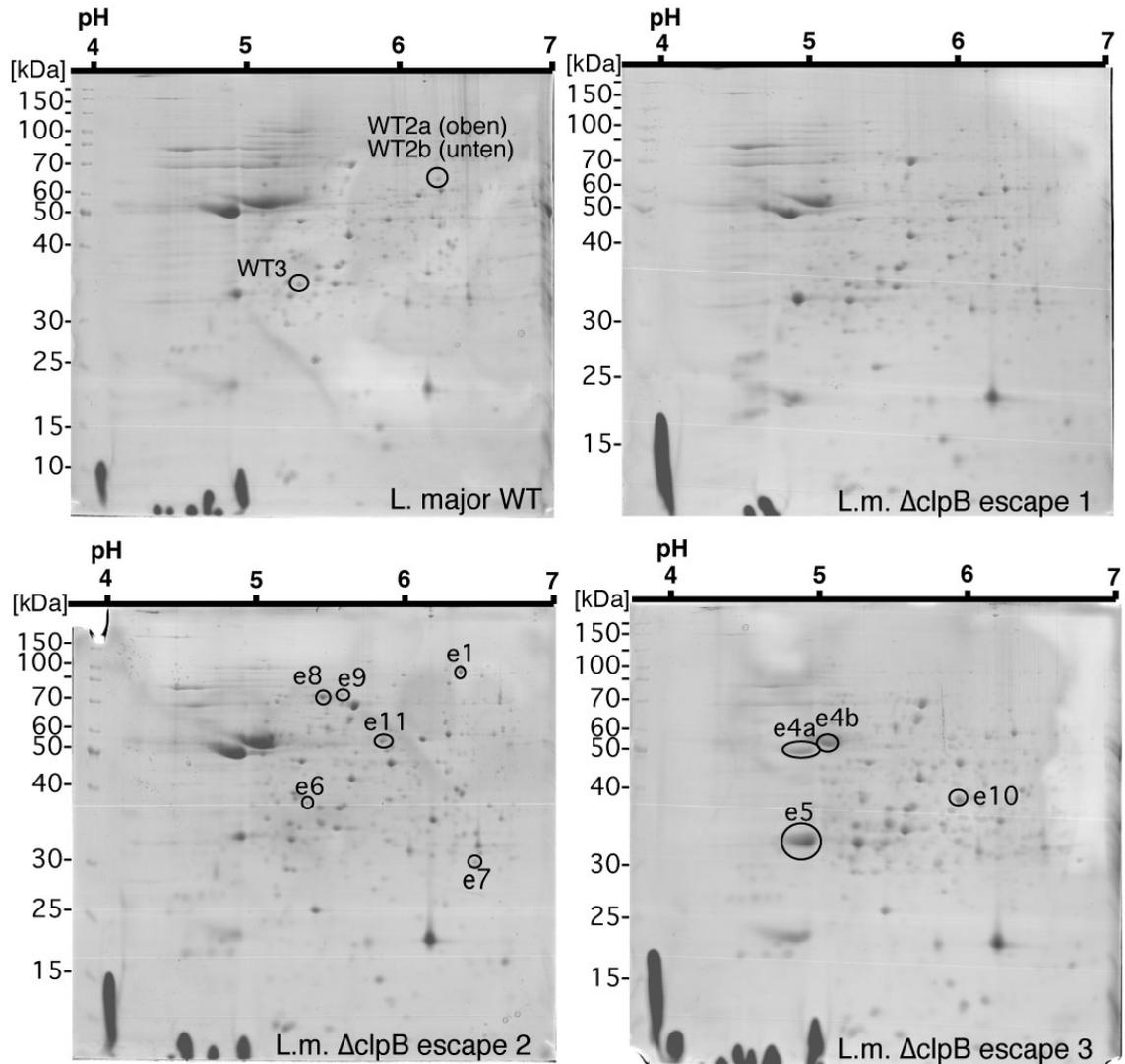
Die meisten der unterschiedlich exprimierten Proteine sind in der *L.m ΔclpB escape 2* Mutante überexprimiert. Dabei fällt zunächst das bereits identifizierte *para flagellar rod protein* auf, das in in der *escape 2* Mutante verstärkt exprimiert wird (e8 und e9). Damit ist die beobachtete Überexpression von PFR-Protein in der *escape*-Population auf eine höhere Expressionsrate allein durch die *escape 2* Mutante zurückzuführen.

Weiterhin ist in dieser Mutante eine thermostabile Carboxypeptidase (e11) überexprimiert, sowie der Elongationsfaktor EF-2 (e1). Weitere Proteine, die einer verstärkten Expression unterlagen, konnten keiner bekannten Proteinsequenz zugeordnet werden (e6 und e7).

Auffällig bei der *escape- 3* Mutante ist ein *shift* in der  $\beta$ -Tubulin Fraktion: Während der *spot* e4a ( $\beta$ -Tubulin) in seiner Intensität abnimmt, wird gleichzeitig der *spot* e5 ( $\beta$ -Tubulin) verstärkt.

In dieser Analyse konnten keine weiteren, potenziell immunstimulatorischen Proteine identifiziert werden.

Eine Coomassie-Brillat-Blau-Färbung ist im Vergleich zu einer Silberfärbung recht unsensitiv. Zudem werden bei der Färbung mit Silbernitrat bevorzugt solche Proteine gefärbt, die einen hohen Gehalt an Aminosäuren mit einer zusätzlichen Aminogruppe aufweisen. Die Proteinmuster unterscheiden sich infolge dessen nach einer Silberfärbung häufig von Coomassie-Brillat-Blau gefärbten Proteingelen. Deshalb wurden entsprechende 2D-Gele einer Silberfärbung unterzogen. Dies führte jedoch ebenfalls zu keiner Identifizierung weiterer, unterschiedlich exprimierter Proteinspezies. Es konnte jedoch die differentielle Expression einiger Proteine bestätigt werden, die schon nach der Coomassie-Färbung aufgefallen war. Diese *spots*, die sowohl in der Silber- als auch in der Coomassie-Färbung ein modifiziertes Expressionsmuster zeigten, sind in der Tabelle (17B) grau unterlegt.



spot Nr.	Expression	putatives Protein
e1	nur bei esc 2 exprimiert	<i>elongation factor EF2-1</i>
WT 2a	fehlt bei esc 3	<i>LmSTII/ t- complex protein1</i>
WT 2b	fehlt bei esc 3	<i>t- complex protein 1</i>
WT 3	fehlt bei esc 3	?
e4a	nur bei esc 3 schwächer	$\beta$ - tubulin
e4b	nur bei esc 3 schwächer	?
e5	nur bei esc 3 stärker	$\beta$ - tubulin
e6	nur bei esc 2 exprimiert	?
e7	nur bei esc 2 exprimiert	?
e8	nur bei esc 2 erhöht	<i>para flagellar rod protein</i>
e9	nur bei esc 2 erhöht	<i>para flagellar rod protein 2c</i>
e10	bei esc 3 stärker	$\alpha$ - tubulin
e11	bei esc 2 stärker	<i>thermostable carboxypeptidase</i>

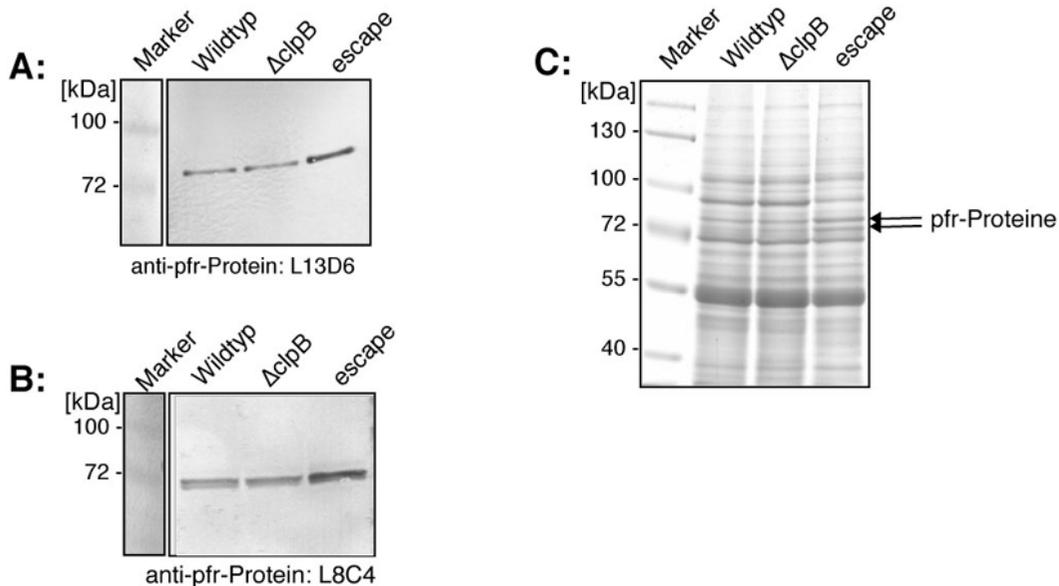
**Abbildung 17: Proteomanalyse der klonierten *escape* Stämme und tabellarische Auflistung.** (A) Die Abbildung zeigt die Sortierung von Proteinen aus Gesamtzelllysaten von je  $5 \times 10^8$  Leishmanien (*L. major* WT und *L.m.ΔclpB escape* 1-3) im Bereich pH4-7 (erste Dimension) und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 11%-igem SDS- Polyacrylamidgel. Die Abbildung zeigt vollständige, Coomassie-Brillant-Blau- gefärbte Gele. Die Molekulargewichte von Standardproteinen sind auf der linken Seite markiert, der pH-Gradient der ersten Dimension wird durch eine horizontale Achse über den Gelen markiert. Differenziell

exprimierte Proteine werden durch kreisförmige Markierungen gekennzeichnet und mit einer individuellen Bezeichnung versehen: wt: Wildtyp; e: escape.

(B) Tabellarische Auflistung. Die in (A) gekennzeichneten Proteine wurden aus den Gelen isoliert, trypsinisiert und massenspektrometrisch analysiert. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse einer Datenbankrecherche. Aufgeführt sind Expressionsprofil und die Zuordnung zu einem putativen Protein. Spots, deren differentielle Expression sowohl in Silber- gefärbten Gelen als auch in Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Gelen identifiziert wurde, sind grau unterlegt.

### 3.1.17 Verifizierung der Überexpression von PFR-Proteinen durch Immunoblot und Immunfluoreszenz

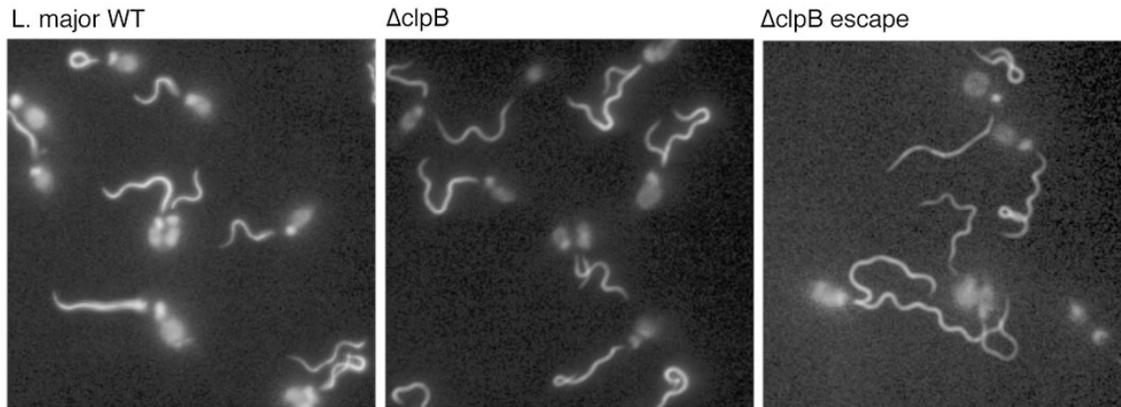
Die Proteom-Analyse mit anschließender Datenbankrecherche ergab, dass die beiden *paraflagellar rod proteins 1d* und *2c* (PFR 1d/2c) einer gesteigerten Expression unterliegen. In Immunblotanalysen mit PFR-Protein spezifischen Antikörpern sollte dieses Ergebnis verifiziert werden. Dazu wurden Zellysate der verschiedenen Zellpopulationen hergestellt, die anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Nach dem Transfer des Proteinmusters auf eine Membran wurde diese wie unter 2.2.31.1 beschrieben behandelt. Die Hybridisierung der aufgetrennten Proteinlysate mit den anti-PFR-Antikörpern L13D6 und L8C4 verifizierte die Überexpression dieser beiden Proteine in der *escape*-Population gegenüber *L. major* WT und *L.m.ΔclpB* (siehe Abbildung 18A und B). Ein Vergleich mit der Ladekontrolle (19C) zeigt, dass der erhöhte Gehalt an PFR-Protein nicht auf eine größere Gesamtproteinmenge zurückzuführen ist. Darüberhinaus ist eine Überexpression der beiden Proteine bereits im Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Proteingel zu erkennen (18C).



**Abbildung 18: Verifizierung der Überexpression PFR- Protein im Immunoblot.** Dargestellt ist die Auftrennung von *Leishmania* Gesamtzelllysaten in einem SDS-Polyacrylamidgel sowie der Nachweis von PFR-Proteinen in einer Immunblotanalyse. Zum Nachweis der PFR-Proteine mit dem Antikörper L13D6 wurde das Äquivalent von  $2 \times 10^6$  Parasiten aufgetrennt (A), für die Behandlung mit dem Antikörper L8C4 das Äquivalent von  $2 \times 10^7$  Zellen (B). In der Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Ladekontrolle (C) wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen der verschiedenen Zellpopulationen aufgetrennt. Die Lokalisation der PFR-Proteine im Coomassie-Brillant-Blau-gefärbten Proteingel ist mit Pfeilen markiert. Das Molekulargewicht von Standardproteinen ist jeweils auf der linken Seite gekennzeichnet.

### 3.1.18 Nachweis des PFR-Proteins durch Immunfluoreszenz

Um Hinweise darüber zu erhalten, ob die erhöhten Mengen an PFR- Proteinen vollständig in die Flagellen eingebaut werden, wurden *L. major* WT- Zellen und *L.m. ΔclpB* escape- Parasiten einer Immunfluoreszenz- Studie unterzogen. Dabei wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgebracht und mit anti- PFR- Antikörpern behandelt. Der mikroskopische Nachweis erfolgte nach der Behandlung mit einem Zweitantikörper, der mit einer fluoreszierenden Gruppe konjugiert war. Außerdem wurden die Kerne und Kinetoplasten der Zellen durch eine DAPI- Färbung sichtbar gemacht. Abbildung 19 zeigt repräsentative Ausschnitte der Objektträger:



**Abbildung 19: Immunfluoreszenz.** Je ca.  $1 \times 10^6$  Parasiten (*L. major* WT, *L.m.ΔclpB* und *L.m. ΔclpB escape*) wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen, fixiert und einer Hybridisierung mit L8C4-Antikörpern (1:2) gegen PFR-Proteine unterzogen. Der Nachweis erfolgte durch einen Cy3-konjugierten Zweitantikörper (1: 2000). Kern- und Kinetoplasten-DNA wurde anhand einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht (1:1000). Die Auswertung erfolgte bei der spezifischen Anregungswellenlänge für DAPI bzw. für den fluoreszierenden Farbstoff Cy3. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte der Objektträger bei 63-facher Vergrößerung nach einem *overlay* der Einzelbilder.

Die Geißeln von *L. major* WT und *L.m. ΔclpB* zeigen eine vergleichbare Länge. Im Gegensatz dazu sind die Flagellen der *L.m. ΔclpB escape*-Parasiten in den meisten Fällen stark verlängert. Diese Beobachten stehen im Einklang mit der beobachteten und statistisch relevanten Verlängerung der Flagellen der *L.m. ΔclpB escape*-Population. Offensichtlich wird das PFR- Protein, das über den WT- Gehalt hinaus in der Zelle vorhanden ist, vollständig in die Flagellen eingebaut. Es sind keine Ablagerungen im Cytoplasma der Zelle festzustellen.

### 3.1.19 Klonierung eines pfr-Gens und Überexpression in *L. major* ΔclpB

In humanen Chagas-Patientenseren wurde eine erhöhte Aktivität gegen PFR-Proteine von *Trypanosoma cruzi* nachgewiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass rekombinante PFR-Proteine von *T. cruzi* die IFN $\gamma$  Produktion von T-Zellen stimulieren können (Michailowsky *et al.*, 2003), und eine Immunisierung mit diesen zu einer protektiven Th1-Antwort in C57BL/6 Mäusen führt.

Die *escape*-Variante zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, die Immunantwort der infizierten BALB/c Mäuse in die Th1-Richtung zu lenken. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Überexpression der PFR-Proteine in der *L.m. ΔclpB escape*- Mutante an diesem Effekt beteiligt ist. Da nachgewiesen wurde, dass eine Applikation von bakteriellen Flagellin die Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 auf dendritischen Zellen stark erhöht,

sollten die Auswirkungen einer Inkubation von dendritischen Zellen mit den pfr-Überexprimierer-Lysaten auf die Expression von B7 (CD86) untersucht werden.

Zu diesem Zweck mußten die PFR-Proteine in *L. major* WT sowie in einer *L.m. ΔclpB* Mutante überexprimiert werden. Die Klonierung sollte in den Vektor pIRMcs3+ erfolgen, der nach Linearisierung über homologe Rekombination in den Genloкус für die kleine Ribosomenuntereinheit integriert. Der Vektor erlaubt je nach Klonierungsstrategie eine promastigoten- oder amastigoten-spezifische Expression. Für die Klonierung der pfr-Gene wurde die promastigoten-spezifische Expressions-site ausgewählt, da PFR-Proteine nur in promastigoten Stadien exprimiert werden.

### 3.1.20 Klonierung der offenen Leserahmen von pfr1d und pfr2c

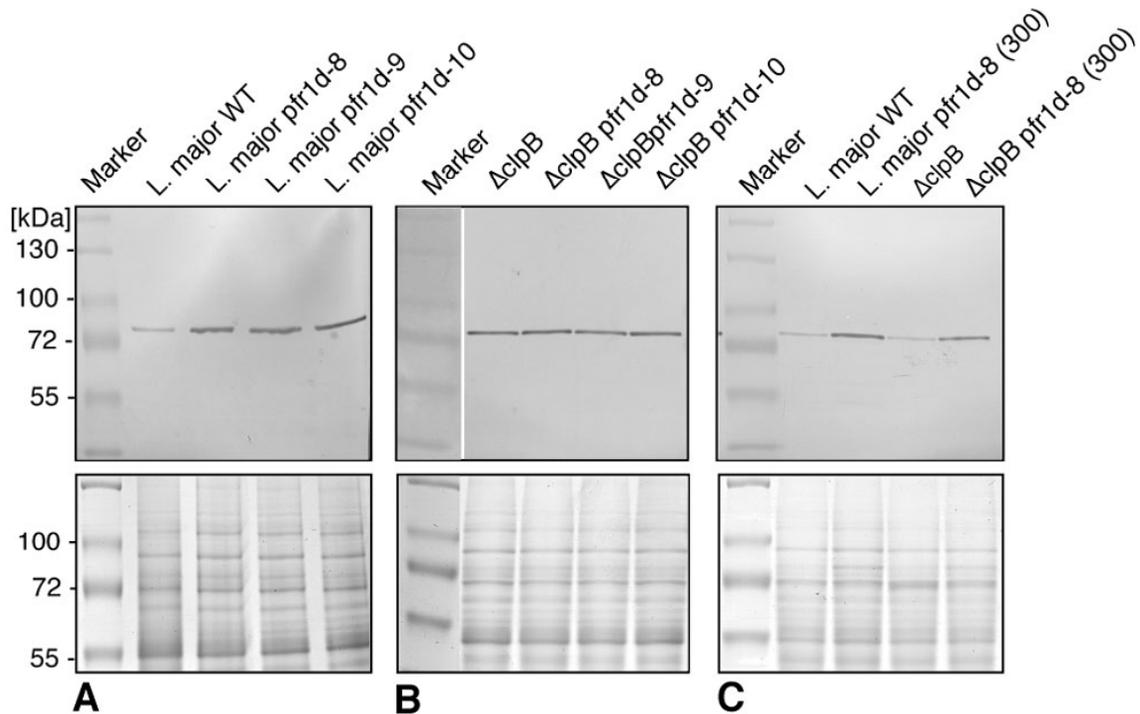
Anhand der pfr-Gensequenz aus der *Leishmania* GeneDatabase wurden Oligonukleotidstarter ausgewählt, mit deren Hilfe die offenen Leserahmen aus der genomischen DNA von *L. major* amplifiziert werden sollten. Das Gen für pfr1d ließ sich durch eine PCR problemlos amplifizieren, während das Gen für pfr2c auch nach sorgfältiger Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht vervielfältigt und aufgereinigt werden konnte. Aus diesem Grund beziehen sich alle weiteren Versuche auf das Gen/Protein pfr1d.

Der Vektor pIRMcs3+ wurde zunächst durch eine Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BglII vorbereitet. Nach der erfolgreichen PCR wurde das amplifizierte Gen pfr1d aus einem Agarosegel isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen BclI und KpnI behandelt. Dabei entstehen kohäsive Enden, die mit BglII-verdauten DNA-Fragmenten ligieren können. Das PCR-Fragment wurde anstelle von BglII mit BclI verdaut, da in dem ORF eine BglII site enthalten ist, und eine Behandlung mit BglII den ORF in zwei Fragmente zerschneiden würde. Nach der Ligation wurde die DNA in *E. coli* transformiert. Nachdem positive Einzelklone identifiziert worden waren, wurden je drei Klone (Klon 8, 9 und 10) zur Gewinnung von Plasmid-DNA eingesetzt. Diese wurde (nach Linearisierung durch die Restriktionsendonuklease SwaI) durch Elektroporation in *L. major* WT und *L.m. ΔclpB* etabliert. Positive Parasitenpopulationen (*L.m.pfr1d* -8, -9, -10 bzw. *L.m. ΔclpB pfr1d* -8, -9, -10) wurden unter der Selektion mit 150 µg/ml Nourseothricin gewonnen. Nach Abschluß der Selektion wurden Zelllysate angefertigt, die dann in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Nach Transfer des Proteinmusters auf eine Membran wurde diese mit anti-pfr-Antikörpern hybridisiert, um die Expression der PFR-Proteine zu untersuchen (Abbildung 20).

Während bei allen drei rekombinanten *L. major*-Populationen (*L.m. pfr1d* -8, -9, -10, Abbildung 20A) eine Überexpression von PFR-Protein zu beobachten ist, wird bei *L.m. ΔclpB pfr1d* -8, -9, -10 (Abb. 20B) nur der normale Gehalt an PFR-Protein beobachtet. Da die Transfektionen in *L. major* WT und in *L.m. ΔclpB* mit DNA aus derselben Präparation durchgeführt wurde, kann die Vermutung ausgeschlossen werden, dass eine fehlerhafte Amplifikation des ORF für die fehlende Überexpression verantwortlich ist.

Um zu untersuchen, ob ein höherer Selektionsdruck eine Überexpression des integrierten pIR-Konstruktes bewirken kann, wurden die Parasiten-Populationen *L. major pfr1d* -8 und *L.m. ΔclpB pfr1d* -8 in frisches Kulturmedium mit der doppelten Menge Nourseothricin eingesät (300 µg/ml). Nachdem die Kulturen über drei Tage unter der erhöhten Menge Nourseothricin gewachsen waren, wurden erneut Zelllysate angefertigt. Diese wurden wie oben beschrieben analysiert. Abbildung 20C zeigt, dass unter erhöhtem Selektionsdruck auch in der *L.m. ΔclpB* Mutante die Überexpression von PFR-Proteinen induziert werden kann. Wie bereits beobachtet, ist die Überexpression in den *L.m. ΔclpB* Populationen offenbar geringer als in

den *L. major* WT-Parasiten. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese, dass in der *L.m. ΔclpB* Mutante die Expression von PFR-Proteinen herab reguliert ist.



**Abbildung 20: Überexpression der PFR-Proteine von pIRmcs3-pfr1d.** Die Abbildung zeigt die Auftrennung von je  $2 \times 10^6$  Zellen pro Bahn in einem SDS-Polyacrylamidgel sowie eine Immunblotanalyse nach dem Transfer des Proteinmusters auf eine Membran. Der Nachweis des PFR1d-Proteins erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit anti-L13D6- Antikörper und enzymatischem Farbnachweis (NBT und x-Phosphat). Als Ladekontrolle dient jeweils ein Coomassie-Brilliant-Blau-gefärbtes SDS-Gel. Molekulargewichte von Größenstandards sind auf der linken Seite markiert. (A) Analyse der Lysate von *L. major* WT und *L. major*-pfr1d-Überexprimierer -8, -9, und -10, Selektion rekombinanter Parasiten mit  $150 \mu\text{g/ml}$  Nourseothricin. (B) *L.m.ΔclpB* und *L.m.ΔclpB*-pfr1d-Überexprimierer -8, -9, und -10, Selektion transfizierter Zellen mit  $150 \mu\text{g/ml}$  Nourseothricin. (C) *L. major* WT und *L. major* pfr1d-8, *L.m.ΔclpB* und *L.m.ΔclpB*-pfr1d-8, Selektion der pfr1d-Überexprimierer mit  $300 \mu\text{g/ml}$  Nourseothricin.

### 3.1.21 Auswirkungen der klonierten *escape*-Stämme und von *L.m. ΔclpB*-PFR++ auf die Reifung von dendritischen Zellen

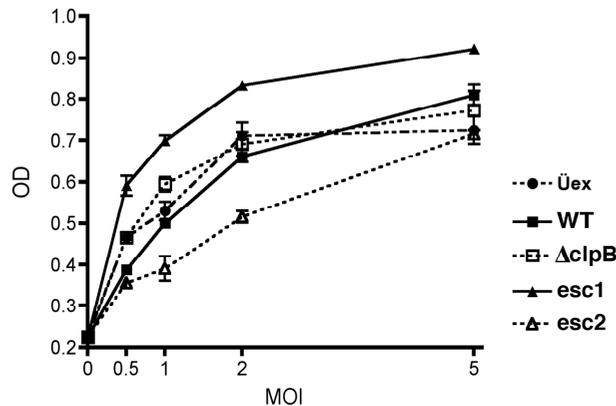
#### a) Analyse der Sezernierung von Interleukin 12

Eine Überexpression von PFR-Proteinen konnte durch eine Erhöhung der Konzentration des Selektionsantibiotikums erreicht werden. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Expression von PFR-Proteinen einen Einfluss auf die Reifung von dendritischen Zellen hat, wurden die *L.m. ΔclpB*-PFR++ zunächst für drei Tage mit  $300 \mu\text{g/ml}$  Nourseothricin kultiviert.

Parallel wurden in der Abteilung für Immunologie murine Knochenmarks-Stammzellen isoliert, die anschließend *in vitro* kultiviert wurden. Es erfolgte dann eine Infektion der dendritischen Zellen (*dendritic cells*: DCs) mit den unterschiedlichen Leishmanien-Stämmen: *L. major* WT, *L.m. ΔclpB*, *L.m. ΔclpB* escape 1, *L.m. ΔclpB* escape 2 und einer Mischung aus *L.m. ΔclpB*-pfr-8-10. Dabei wurde die Stimulation der dendritischen Zellen mit verschiedenen Verhältnissen von Parasitenzahl zu DC-Anzahl (*moi*: *multiplicity of infection*) von je 0,5; 1; 2 und 5 vorgenommen. *L.m. ΔclpB* escape 3 wurde in die folgenden Untersuchungen nicht

einbezogen, da dieser Stamm zwischenzeitlich während der *in vitro* Passage verloren gegangen war, und auch nicht wieder aus den Organen infizierter BALB/c Mäuse reisoliert werden konnte.

Interleukin 12 wird von aktivierten APZs gebildet, und steuert die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen zu Th1-Zellen. Um zu untersuchen, ob die Interleukin 12 Sekretion von dendritischen Zellen nach Inkubation mit den oben genannten Stämmen variiert, wurde nach 24-stündiger Infektion die Aktivierung der dendritischen Zellen gemessen, indem die Produktion von IL 12 p40, einer der beiden heterodimeren Untereinheiten von IL 12, durch eine ELISA-Test bestimmt wurde (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Analyse der Interleukin 12 Produktion dendritischer Zellen.** Je  $2 \times 10^5$  dendritische Zellen wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,5; 1; 2 und 5 mit *L. major* WT, *L.m.ΔclpB*, *L.m.ΔclpB escape 1*, *L.m.ΔclpB escape 2* und *L.m.ΔclpB-PFR++* (Üex: Überexprimierer) infiziert. Nach 12-stündiger Inkubation bei 35°C wurde die Interleukin 12-Produktion der dendritischen Zellen durch einen ELISA-Test bestimmt. Die Interleukin 12-Produktion ist in der Abbildung als OD (optische Dichte) in Abhängigkeit der MOI aufgetragen.

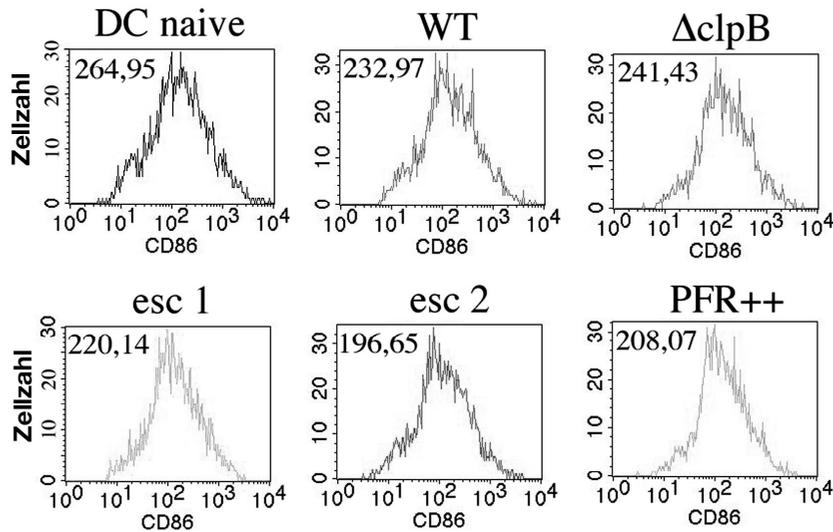
Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der IL12-Produktion von DCs nach Stimulation mit *L. major* WT, *L.m. ΔclpB* und *L.m. ΔclpB PFR++*. Die Inkubation der dendritischen Zellen mit *L.m. ΔclpB escape 1* verursacht eine erhöhte Sezernierung von IL 12, während nach Stimulation mit *L.m. ΔclpB escape 2* eine reduzierte Sezernierung von IL12 beobachtet wird.

#### b) Quantifizierung der Expression des Oberflächenmarkers CD86

Nach 24-stündiger Infektion wurden die dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 0,5 infiziert worden waren, einer FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD86 gefärbt. Bei CD86 handelt es sich um einen Oberflächenmarker von dendritischen Zellen, der als kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung naiver T-Zellen nötig ist. Da dieses Molekül erst auf der Oberfläche von dendritischen Zellen exprimiert wird, wenn diese durch die Bindung von Pathogenitätsfaktoren (PAMPs: *pathogen associated molecular pattern*) an ihre sog. TLRs (*Toll like receptors*) auf ihrer Oberfläche aktiviert worden sind, kann die Expression von CD86 als Marker für die Aktivierung von dendritischen Zellen genutzt werden.

Die FACS-Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede auf den dendritischen Zellen, die mit *L. major* WT, *L.m. ΔclpB*, *L. m. ΔclpB escape 1* oder -2 bzw. mit den pfr-überexprimierenden *L.m. ΔclpB*-Parasiten infiziert worden waren (Abbildung 22). Offensichtlich hat die Überexpression von PFR-Protein durch die Stämme *L.m. ΔclpB escape-*

2 und *L.m. ΔclpB pfr1d*- 8-10 keinen Einfluß auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD86.



**Abbildung 22: Quantifizierung des Oberflächenmarkers CD86 auf der Oberfläche von dendritischen Zellen nach Infektion mit *L. major* WT, *L.m.ΔclpB* und *L.m.ΔclpB escape*.** Je  $2 \times 10^6$  dendritische Zellen wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,5; 1; 2 und 5 mit *L. major* WT, *L.m.ΔclpB*, *L.m.ΔclpB escape* 1, *L.m.ΔclpB escape* 2 und *L.m.ΔclpB*-PFR++ (Üex: Überexprimierer) infiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 35°C wurde der Aktivierungsgrad der dendritischen Zellen durch die Quantifizierung des Oberflächenmarkers CD86 bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit anti-CD86-Antikörpern behandelt, und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Anzahl an CD86-Molekülen auf der Zelloberfläche ist in Abhängigkeit der Zellanzahl angegeben. Die Zahl innerhalb der Kästchen gibt die durchschnittliche Zahl der CD86-Moleküle pro event an.

Da bei der Inkubation dendritischer Zellen mit den *L.m. ΔclpB* pfr-Überexprimierern im Vergleich zum *L. major* WT bzw. zur *L.m. ΔclpB*-Mutante keine differentielle Sezernierung von Interleukin 12 beobachtet werden konnte, und außerdem keine vermehrte Expression des Reifungsmarkers CD86 zu verzeichnen war, kann davon ausgegangen werden, dass die alleinige Überexpression von pfr1d nicht zu einer Aktivierung dendritischer Zellen führt.

*L.m. ΔclpB escape* 2, der sich ebenfalls durch Überexpression von pfr auszeichnet, zeigt eine reduzierte Sezernierung von IL 12. Da jedoch wie in Abbildung 17 gezeigt, neben pfr in diesem Stamm weitere Proteine überexprimiert werden, kann der beobachtete Effekt offenbar nicht der Überexpression von pfr zugeordnet werden.

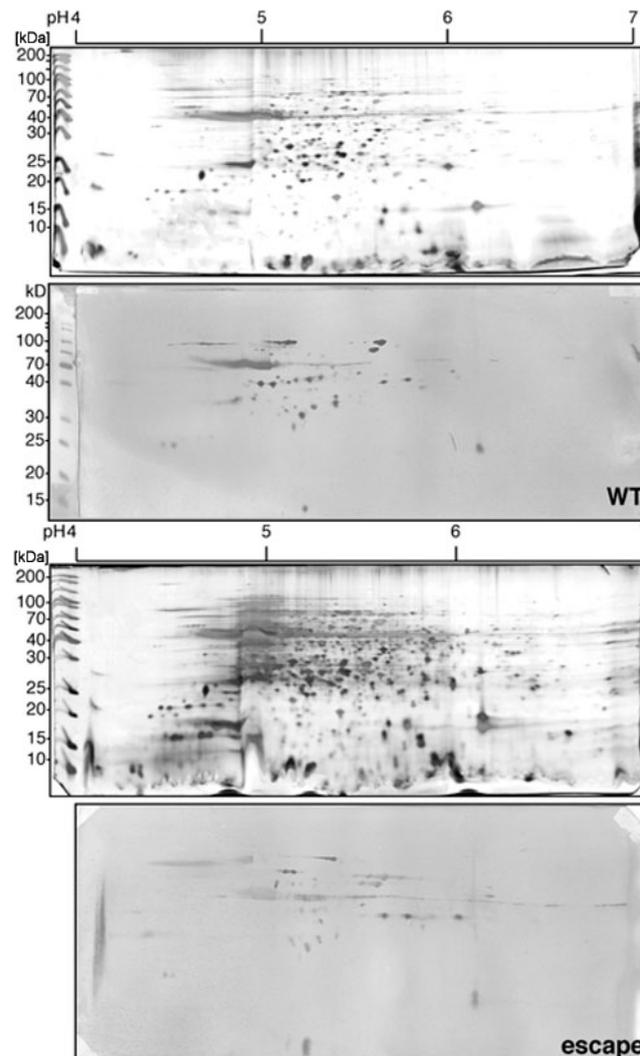
### 3.1.22 Untersuchung des Antiserums aus WT- und *escape*-infizierten Mäusen im Immunblot

Ein charakteristisches Merkmal für die Th2-Antwort ist die Einleitung der humoralen Immunantwort durch die Anregung von B-Zellen zur Produktion und Sezernierung von Antikörpern. Die Th1-Antwort leitet dagegen vorwiegend die zelluläre Immunantwort ein, die u.a. zur Infiltration von Makrophagen an den Infektionsherd führt. Zudem führt eine Polarisierung der T-Zellantwort in Richtung Th1 zu einem *switch* der sezernierten Ig-Subtypen.

Die erhöhte Einwanderung von Makrophagen wurde neben anderen charakteristischen Merkmalen der Th1-Antwort bereits nach einer Infektion mit der *L.m. ΔclpB escape*

Population nachgewiesen. In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob auch Unterschiede in der Antikörperfraktion des Blutserums WT- oder *escape*-infizierter Mäuse nachgewiesen werden kann. Dazu wurde zunächst ein Lysat aus *L. major* WT und *L.m. ΔclpB escape* 2 Parasiten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen hergestellt. Die Lysate wurden einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen, wobei die Proteine auf einer Gelmatrix nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden. Die Gelstreifen wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgebracht, und die fokussierten Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt. Das Proteinmuster wurde dann auf eine Membran transferiert, und mit dem Blutserum hybridisiert, wobei das WT-Lysat mit Serum aus WT-infizierten Mäusen und das *escape*-Lysat mit Serum aus *escape*-infizierten Mäusen hybridisiert wurde. Zwei weitere Gele wurden einer Silberfärbung unterzogen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 23.

Das Serum aus den *escape*-infizierten Mäusen erkennt insgesamt weniger und mit geringerer Intensität Antigene, obwohl auf dem Proteingel mehr Protein aufgetrennt wurde, wie in der Ladekontrolle (gefärbtes Proteingeln, oberer Teil der Abbildungen) zu sehen ist.



**Abbildung 23. Untersuchung des Blutserums infizierter BALB/c Mäuse auf IgG-Subklassen.** Leishmanienlysate aus *L. major* WT und *L.m.ΔclpB escape* (je  $5 \times 10^7$  Zellen) wurden nach ihrem isoelektrischen Punkt (pH 4-7) und anschließend nach ihrem Molekulargewicht in einem 11 %-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteinmuster wurden auf eine PVDF-Membran transferiert, und mit dem aufgereinigten Blutserum aus *L. major* WT- bzw. *L.m.ΔclpB escape*-infizierten BALB/c Mäusen inkubiert (WT-Proteinmuster

mit Serum aus WT-infizierter Maus und *escape*-Proteinmuster mit Serum aus *escape*-infizierter Maus). Der Nachweis der durch die Antikörper gebundenen Antigene erfolgte durch einen alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Maus-Antikörper, und einem Farbnachweis mit NBT und x-Phosphat. Jeweils ein zweites Gel wurde als Ladekontrolle einer Silberfärbung unterzogen. Das Molekulargewicht von Standardproteinen ist auf der rechten Seite gekennzeichnet, der pH-Gradient über den Silber-gefärbten Gelen (jeweils oberer Teil der Abbildungen).

Im Immunblot wurde ein sekundärer Antikörper gegen eine definierte Subklasse von Immunglobulinen eingesetzt. Die Hybridisierung des Sekundärantikörpers mit verschiedenen Proteinen der Lysate sowie die unterschiedliche Intensität der Färbung könnten damit auf einen *switch* der Ig-Subtypen deuten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Hypothese, dass eine Verschiebung der Immunantwort zu einer Th1-Antwort stattgefunden hat.

### 3.2 genetische Komplementationsanalyse

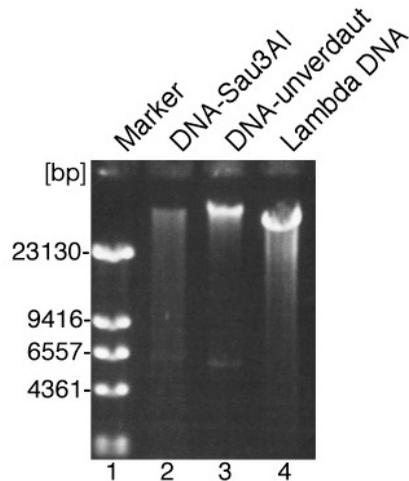
Im Rahmen der Analyse der *escape*- Variante wurde nachgewiesen, dass eine *ClpB* defiziente (und damit üblicherweise avirulente) Mutante von *L. major* den Verlust von *ClpB* durch einen unbekanntem Mechanismus kompensieren kann. Um die genetischen Grundlagen dieses Mechanismus zu untersuchen, sollte eine Komplementationsstudie vorgenommen werden. Dabei sollte die  $\Delta clpB$  Mutante mit einer Cosmid- Genbank transfiziert werden, damit relevante Cosmide den  $\Delta clpB$  Phänotyp komplementieren bzw. kompensieren können. In Mausinfektionsexperimenten müssten solche *rescue*- Parasiten ähnlich wie die *escape*- Variante wieder eine Infektion etablieren können.

#### 3.2.1 Herstellung einer Cosmid-Genbank

Durch funktionelle, genetische Komplementations-Analyse sollte versucht werden, Hinweise auf die Rolle und Funktion von *ClpB* in *Leishmania* zu erzielen. Hierzu musste zunächst eine Cosmid- Genbank hergestellt werden, in der genomische DNA fragmentweise in den Cosmid *shuttle* Vektor pCosTL verpackt wird. Zur Herstellung dieser Genbank wurde eine  $\Delta clpB$  Mutante verwendet, um während der späteren Komplementationsstudien eine Selektion auf *ClpB*- enthaltende Cosmide zu vermeiden.

Die, wie unter 2.2.10.4 beschrieben, isolierte genomische DNA wurde zunächst einem Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI unterzogen, um Fragmente zu erhalten, deren Enden eine Ligation mit dem mit BamHI geschnittenen Vektor pCosTL erlauben. Die Restriktionsendonuklease Sau3AI erkennt die tetramere Sequenz GATC, die in der DNA von *Leishmania* häufig zu finden ist. Um einen vollständigen Restriktionsverdau der genomischen DNA zu vermeiden (weil dieser in Fragmenten zu geringer Größe resultieren würde), wurde zunächst in mehreren Vorversuchen die Enzymkonzentration ermittelt, die Fragmente der gewünschten Größe (29,5-43,5 kb) ergab. Anschließend wurde die für die Herstellung der Bank benötigte Menge DNA in einem präparativen Ansatz mit Sau3AI behandelt, und die Fragmentierung der DNA durch Auftrennung eines Aliquots in einem Agarosegel überprüft.

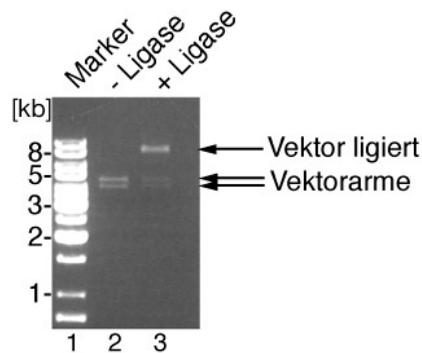
Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, führt der partielle Verdau der genomischen DNA mit einer definierten Enzymkonzentration zu Fragmenten der Größenordnung, wie sie zur Ligation und anschließenden Verpackung in den Cosmid *shuttle* Vector benötigt werden (29.5 – 43.5 kb). Die Sau3AI behandelte DNA wurde dephosphoryliert, um eine Zusammenlagerung von DNA- Fragmente zu verhindern, die normalerweise im Genom nicht benachbart vorliegen.



**Abbildung 24: Partialverdau genomischer DNA mit Sau3AI.** Die Abbildung zeigt ein 0,7%-iges, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. 2,5  $\mu\text{g}$  genomische DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Bahn 2). Ein unverdautes Aliquot der DNA ist in Bahn 3 aufgetrennt. DNA-Größenstandards sind in Bahn 1 (1kb-Marker) und Bahn 4 (lambda-DNA) gezeigt (kb: Kilobasen, M: Marker)

Anschließend wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente zur Ligation mit den Vektorarmen eingesetzt. Vorpräparierte Arme des Cosmid Vektors pCosTL wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. K. Mellenthin zur Verfügung gestellt.

In einer Ligationsreaktion wurden jeweils zwei Vektorarme mit einem Fragment genomischer DNA verbunden. Die Reaktion wurde durch Auftrennung eines Aliquots der Reaktion vor Enzymzugabe bzw. nach Beenden der Inkubation im Agarosegel analysiert.



**Abbildung 25: Kontrolle der Ligation.** Der Vektorkontrolle wurde direkt vor und eine Stunde nach Ligase-Zugabe ein Aliquot entnommen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel, wobei in Bahn 2 die beiden unligierten Vektorarme und Bahn 3 die Vektorarme eine Stunde nach Ligasezugabe aufgetrennt worden sind. Die DNA-Fragmente wurden durch eine Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Pfeile auf der rechten Seite markieren die Position der unligierten Vektorarme bzw. den ligierten Vektor. Die Positionen eines DNA-Längenstandard (Bahn 1, M: Marker) sind auf der linken Seite gekennzeichnet (1kb-Marker).

In der zweiten Bahn des abgebildeten Agarosegels sind klar die beiden Vektorarme (4 kb und 4,5kb) vor Zugabe der Ligase zu erkennen. Nach Beendigung der Reaktion ist die Intensität dieser beiden Banden geringer, während eine neue Bande der Größe 8,5 kb auftritt (Bahn 3). Hierbei handelt es sich um das oben beschriebene Vektorarm-Dimer. Infolge des Auftretens

dieser Bande nach Zugabe der Ligase wird davon ausgegangen, dass die Ligation von genomischen DNA Fragmenten mit den Vektorarmen ebenfalls erfolgreich war.

Die Verpackung des Ligationsansatzes in Phagenpartikel sowie die Infektion und Amplifikation der Cosmidbank in *E. coli DH5 $\alpha$*  erfolgte wie unter 2.2.11.4- 2.2.11.7 beschrieben.

Die durchschnittliche Verpackungseffizienz (als Anzahl der *colony forming units* pro  $\mu\text{g}$  DNA) wurde mit  $1,85 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA bestimmt.

### 3.2.2 Untersuchung der Repräsentativität der Cosmidbank durch Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße wurde ein Aliquot der amplifizierten Genbank ausplattiert, und aus 12 unabhängigen Kolonien die Cosmid-DNA isoliert. Die isolierten Cosmide wurden einem Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI unterworfen, und die resultierenden Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Addiert man die Größe aller Fragmente in einer Bahn, erhält man die Gesamtgröße des einzelnen Cosmidinserts (abzüglich der Größe des Vektors von 8,5kb). Für die Genbank von *L. major*  $\Delta\text{clpB}$  wurde eine durchschnittliche Insertgröße von 35 kb ermittelt. Bei einer Größe von  $3,6 \times 10^7$  bp des *Leishmania* Genoms würden theoretisch 1028 Klone das komplette Genom repräsentieren. Da unter den zufällig entstandenen DNA Fragmenten aber auch solche mit überlappender Sequenz vorhanden sein können, wird die tatsächlich Anzahl der benötigten Klone nach der Poisson Verteilung:  $N = \ln(1-p) / \ln[1-(F/G)]$  berechnet, wobei N für die Anzahl der benötigten Klone, F für die durchschnittliche Insertgröße, G für die Größe des *Leishmania* Genoms und p für die Wahrscheinlichkeit von 99% steht. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 35 kb sind folglich 4736 Klone nötig, um das *Leishmania* Genom vollständig zu repräsentieren. Mit der Verpackungseffizienz von  $1,85 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA ist das *Leishmania* Genom 39-fach in der Cosmid-Genbank repräsentiert.

### 3.2.3 Überprüfung der Heterogenität der Cosmidbank

Die Isolierung von Cosmid DNA aus *E.coli* erfolgte wie unter 2.2.11.9 beschrieben. Zur Überprüfung der Qualität und der Heterogenität der aufgereinigten Cosmid DNA wurde diese Restriktionsanalysen mit den Endonukleasen EcoRI bzw. SacII unterworfen. Die Restriktionsverdau sollte neben jeweils einer charakteristischen Vektorbande (3200bp bzw. 7100bp) nur einen Schmier von Inserts verschiedener Größe ergeben, wenn alle Anschnitte des Genoms gleichmäßig und vollständig in der Bank repräsentiert werden.

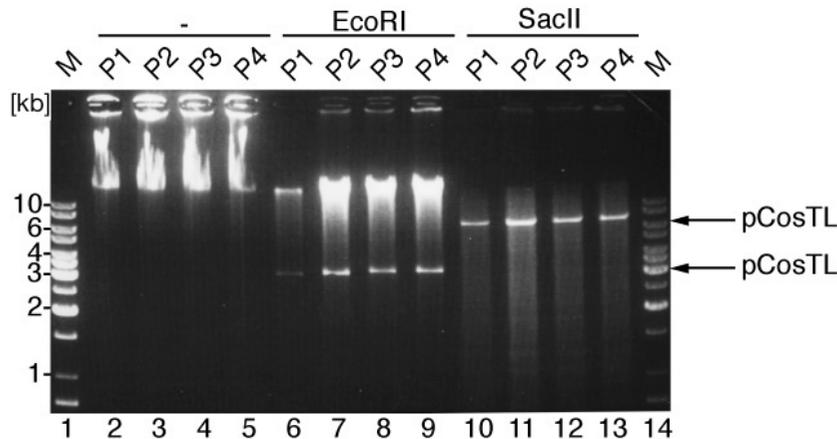
Die Analyse der entstandenen Fragmente erfolgte durch Auftrennung in einem Agarosegel. In den Bahnen 2, 3, 4 und 5 wurden unverdaute Aliquots aus vier verschiedenen Cosmid- DNA-Präparationen aufgetrennt. In allen vier Bahnen erkennt man einen Schmier nach oben, welcher für die Unversehrtheit der isolierten DNA spricht. Es sind keine durch Scherung hervorgerufenen Abbauprodukte zu erkennen.

In den Bahnen 6-9 wurden Aliquots der DNA-Präparationen aufgetrennt, die mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt worden sind. Wie erwartet, ist lediglich eine charakteristische Vektorbande von 3200 bp zu erkennen, sowie eine wenig definierte Bande, die die unterschiedliche Größe der DNA Inserts belegt.

Auch ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease SacII liefert die erwartete Vektorbande von 7100bp (Bahn 10-13). Da die Erkennungssequenz für SacII (CCGCGG) wegen des hohen GC Gehaltes der *Leishmania* DNA häufiger vertreten ist als die von EcoRI (GAATTC), werden die Inserts der Cosmide in diesem Restriktionsverdau in Fragmente geringerer Größe

zerlegt. Somit sind diese nicht mehr als sichtbare Banden bzw. als sichtbarer Schmier zu erkennen.

Da in den verschiedenen Isolaten der Cosmid DNA also lediglich die Vektorbande als definierte Bande zu erkennen ist, kann man davon ausgehen, dass keine Sequenzen der genomischen DNA bevorzugt in die Phagenpartikel verpackt worden sind, und die Heterogenität der Cosmidbank damit gegeben ist.



**Abbildung 26: Nachweis der Heterogenität der Cosmid- Genbank**

Je  $1\mu\text{g}$  der aus *E. coli* präparierten Cosmid-DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit EcoRI und SacII unterworfen. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1%-igen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Bahn 2-5: unverdaute Aliquots der Cosmid DNA; Bahn 6-9: EcoRI-verdaute Cosmid-DNA; Bahn 10-13: SacII- verdaute Cosmid-DNA. P1-P4 bezeichnet die unabhängigen DNA- Präparationen 1-4. Die Pfeile auf der rechten Seite weisen auf die Vektorbanden von pCosTL hin. DNA-Längenstandards (M: Marker, 1kb-Marker) sind in den Bahnen 1 und 14 aufgetrennt. Die Größe der Standard-Fragmente sind auf der linken Seite gekennzeichnet (kb: Kilobasen).

Da die Cosmidbank das *Leishmania* Genom offenbar vollständig repräsentiert, und die isolierte Cosmid DNA in der Restriktionsanalyse eine ausreichende Heterogenität aufwies, sollte die Cosmid DNA nun in die *Leishmania major*  $\Delta clpB$  Deletionsmutante transfiziert werden. In dieser Zelllinie wurden die Allele des *clpB* Gens durch ein G418- und ein Hygromycin-Resistenzgen ausgetauscht. (*L. major*  $\Delta clpB$  Neo<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup>). Da die Selektion auf Derivate des Cosmids pCosTL ebenfalls auf Selektion mit G418 basiert, wurde zunächst die genomische Kopie des Neomycinphosphotransferasegens in der *L. major*  $\Delta clpB$  Mutante gegen ein Puromycin-Resistenzgen ausgetauscht.

### 3.2.4 Austausch eines Resistenzmarkers in *Leishmania major* durch homologe Rekombiantion

Zur Deletion der beiden *ClpB* Allele in *L. major* wurde ursprünglich der Vektor pL.m.*ClpB*-Neo bzw. -Hygro konstruiert (Hübel *et al.*, 1997). Basierend auf dem Vektor pUC19 wurden dabei nacheinander die Sequenzen der 3'- und 5'-untranslatierten Region (3'- und 5'- UTRs) des *ClpB*- Gens sowie die Resistenzmarkergene Neo<sup>R</sup> oder Hygro<sup>R</sup> so in den Vektor integriert, dass durch einen anschließenden Restriktionsverdau mit XbaI die linearen Fragmente *ClpB* 5'-Neo<sup>R</sup>-*ClpB* 3' bzw. *ClpB* 5'- Hygro<sup>R</sup>- *ClpB* 3' gewonnen und zur Transfektion eingesetzt werden konnten. Die beiden Allele des *ClpB*- Gens wurden dann durch homologe Rekombination in zwei voneinander unabhängigen Ereignissen durch die transfizierten Fragmente ersetzt.

Um in *L. major*  $\Delta clpB$   $Neo^r/Hygro^r$  das Gen für die Neomycinphosphotransferase gegen das Gen für eine Puromycinresistenz auszutauschen, wurde der Vektor pL.m.*ClpB*- $Hygro^R$  zunächst mit KpnI und BamHI behandelt, um das Hygromycin- Resistenzgen aus dem Vektor zu entfernen. Parallel dazu wurde das Puromycin- Resistenzgen ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI behandelt, und in einer anschließenden Ligationsreaktion in den Vektor pL.m.*ClpB* zwischen die *ClpB* 5'- und 3'UTR eingefügt.

Durch einen präparativen Restriktionsverdau mit XbaI wurde das Fragment *ClpB* 5'-Puro<sup>R</sup>-*ClpB* 3' aus pL.m.*ClpB*-Puro herausgeschnitten, aufgereinigt und zur Transfektion in *L. major*  $\Delta clpB$   $Neo^r/Hygro^r$  eingesetzt. Durch eine Doppelsektion mit Hygromycin und Puromycin sollte ein Austausch des Neomycinphosphotransferase-Gens gegen das Puromycinphosphotransferase-Gen durch homologe Rekombination forciert werden.

Sobald die Selektion auf Puromycin/Hygromycin-resistente Zellen abgeschlossen war, wurden die Parasiten unter andauernder Puromycin/Hygromycin-Selektion vereinzelt. Nachdem die Einzelklone herangewachsen waren, wurde eine Replikaplatte beimpft, auf der die Zellen unter Neomycin/Hygromycin-Selektion gehalten wurden. Solche Klone, die unter Puromycin/Hygromycin-Selektion wuchsen, aber unter Neomycin/Hygromycin-Selektion starben, hatten das Neomycinphosphotransferase-Gen über homologe Rekombination gegen das Puromycinphosphotranferase-Gen ersetzt (*L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/ $Hygro^r$ ).

### 3.2.5 Transfektion von *L. major* $\Delta clpB$ Puro<sup>r</sup>/ $Hygro^r$ mit Genbank-Cosmid DNA und Selektion von Virulenz-vermittelnden Cosmiden *in vivo* und *in vitro*

Die Einzelklone *L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/ $Hygro^r$  1-4 wurden zur Transfektion mit der Cosmidbank eingesetzt (Durchführung siehe 2.2.3). Dazu wurden jeweils  $4 \times 10^7$  Zellen eines Einzelklons mit 50  $\mu$ g Cosmid DNA derselben Präparation (Präparation 3, Bahn 4, 8 und 12 Abbildung 26) elektroporiert und einer Selektion mit G418 unterzogen.

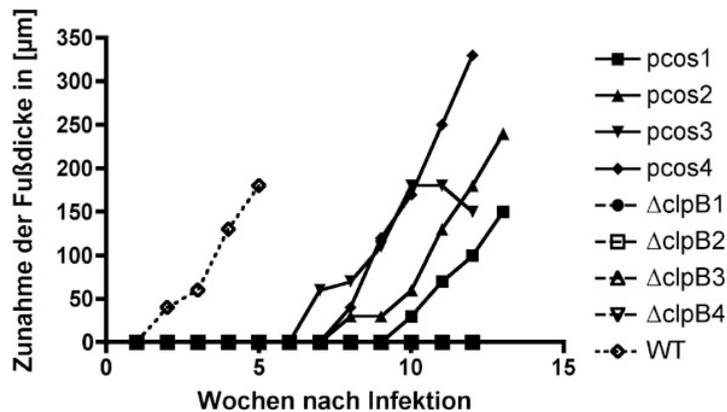
### 3.2.6 *In vivo* Selektion

Nach Abschluß der Selektion wurde je eine weibliche BALB/c Maus mit  $1 \times 10^7$  Zellen jeder rekombinanten Population (*L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/ $Hygro^r$  pcos 1-4 (von Einzelklon 1-4)) durch Inokulation in den hinteren rechten Fußballen infiziert. Zur Kontrolle des Infektionsverlauf wurden 4 weitere Mäuse mit je  $1 \times 10^7$  Zellen eines Einzelklons infiziert, der nicht mit der Cosmidbank transfiziert worden war. Weiterhin wurden als Positivkontrolle zwei Mäuse mit dem *L. major* Wildtyp infiziert. Am Folgetag wurden alle Mäuse mit weiteren  $2 \times 10^7$  Zellen des jeweiligen Stammes infiziert. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass jeder Parasit mit einem individuellen Cosmid in ausreichend hoher Zahl vertreten ist, um eine Infektion etablieren zu können.

Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Fußdickenmessung dokumentiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 gezeigt.

Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen, entwickelt die Maus, die mit 5ASKH Wildtyp infiziert ist, bereits nach zwei Wochen an der Inokulationsstelle eine Läsion. Nach einer gleichmäßigen Zunahme der Fußschwellung über 5 Wochen beginnt die Fußläsion nach 5 Wochen zu ulzerieren. Die zweite mit 5ASKH Wildtyp infizierte Maus zeigt über den gesamten Beobachtungszeitraum bis heute (89 Wochen) keine Läsionsentwicklung. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, und ist vermutlich entweder im Immunstatus der Maus oder in der fehlerhaften Applikation der Parasiten zu suchen.

Die 4 Einzelklone der  $\Delta clpB$  Deletionsmutante (*L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup> 1-4) zeigen, wie erwartet, keine Läsionsbildung während des Beobachtungszeitraums, und bestätigen damit den durch das Fehlen von *ClpB* bedingten avirulenten Phänotyp der Mutante. Die Infektion mit *L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup> pcos 1-4 zeigt dagegen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Läsionsbildung, deren Beginn gegenüber der Wildtyp Fußballenschwellung um 5-8 Wochen verzögert ist. Im Vergleich zu der  $\Delta clpB$  Mutante sind jedoch alle vier untersuchten, von Einzelklonen abgeleiteten, rekombinanten Populationen nach Transfektion mit der Cosmidbank zu einer Läsionsbildung in der Lage. Damit wurde gezeigt, dass die Überexpression von Genen von einem Episom den Verlust eines für die Virulenz essentiellen Gens ausgleichen kann.

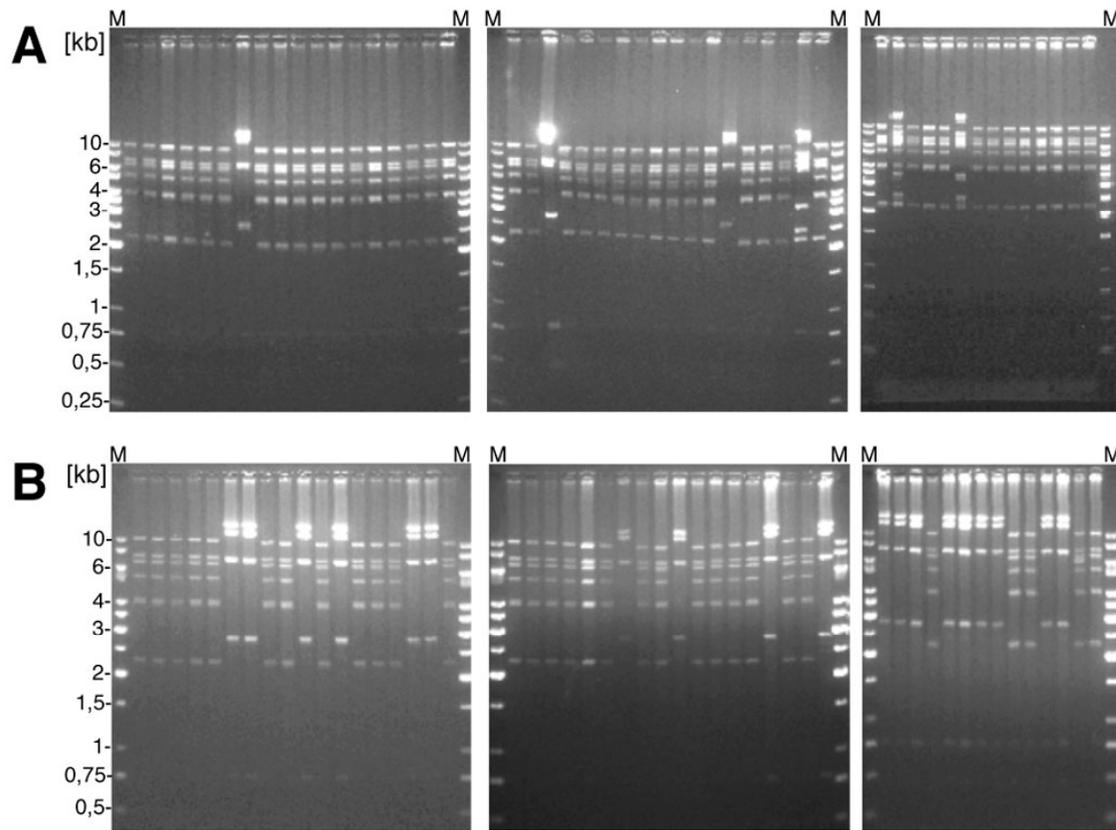


**Abbildung 27: Infektionsverlauf der ersten *in vivo* Selektion.** Je  $3 \times 10^7$  mit der  $\Delta clpB$ -Genbank transfizierten Parasiten (pcos1-4) sowie *L. major* WT (Positivkontrolle) und *L.m.* $\Delta clpB$  (Negativkontrolle) wurden in den rechten Hinterfüßballen von weiblichen BALB/c Mäuse inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Fußballmessungen dokumentiert, und als Differenz zum uninfizierten Fußballen in  $\mu\text{m}$  angegeben.

### 3.2.7 Charakterisierung der Virulenz vermittelnden Cosmide

Im Folgenden sollten die Cosmide charakterisiert werden, die für die Vermittlung der Virulenz in der  $\Delta clpB$  Mutante verantwortlich waren. Dazu wurden der getöteten Maus Fußgewebe und drainierender Lymphknoten entnommen, in modifiziertem M199 Medium homogenisiert und bei 25°C kultiviert, bis sich die Parasiten aus der Fuß und Lymphknoten in Promastigote umwandeln, und in die logarithmische Wachstumsphase eintraten. Nachdem die reisolierten Parasiten in ausreichender Zahl vorlagen, wurden diese zur Isolation von Cosmid-DNA eingesetzt. Die isolierte DNA wurde in *E. coli* transformiert, und je 50 Einzelklone durch Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen EcoRV und XbaI analysiert. Die entstandenen Fragmente wurden in Agarosegelen aufgetrennt. Die Ergebnisse für die reisolierten Cosmide der Parasiten pcos 1 aus Fuß und Lymphknoten sind beispielhaft in Abbildung 28 gezeigt.

In den Cosmidisolaten aus allen Organen ist eine Selektion auf bestimmte Cosmid-Spezies zu erkennen, die sich jedoch von Maus zu Maus unterscheiden. In keiner der 4 Mäuse treten dieselben prominenten Cosmidtypen auf. Aus Fußballen und Lymphknoten derselben Maus konnten jedoch Parasiten mit gleichen Cosmidtypen isoliert werden. Die prominenten Cosmid-Spezies wurden nummeriert und ihr prozentualer Anteil im Gesamisolat jedes Organs bestimmt. Die Tabelle in Abbildung 29 zeigt das Ergebnis:



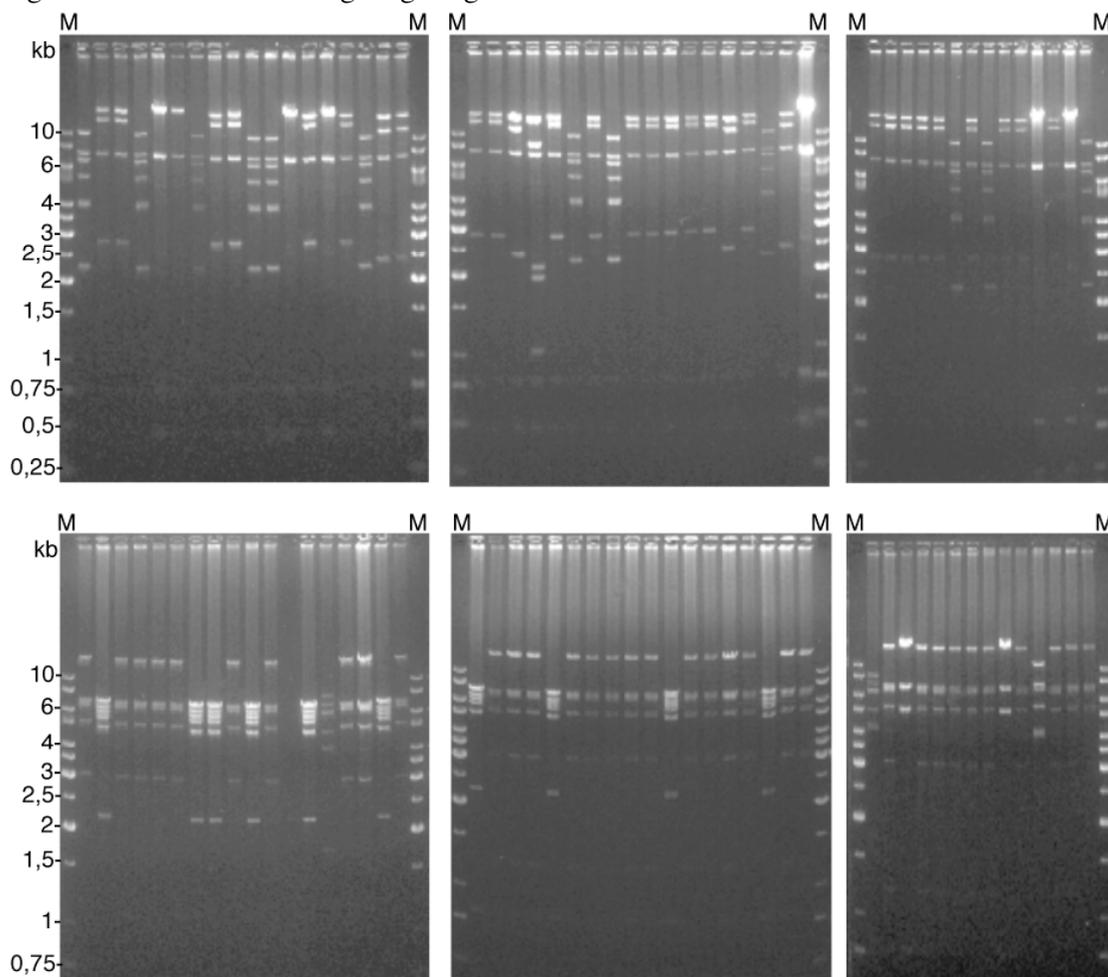
**Abbildung 28: Analyse der reisolierten Cosmid- Spezies nach der ersten *in vivo* Selektion.**Die aus Fußballen und Lymphknoten reisolierten Parasiten wurden zur Cosmidisolation eingesetzt, und die DNA anschließend in *E. coli* transformiert. Nach DNA-Minipräparation aus je 50 Einzelklonen pro Organ (4 Fußballen und 4 Lymphknoten) und einer Restriktionsanalyse mit EcoRV und XbaI wurde das entstandene Fragmentmuster in Agarosegelen aufgetrennt und analysiert. Die Abbildung zeigt stellvertretend sechs 0,7%-ige, Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele, in denen die Cosmidfragmente aus Fußballen (A) und Lymphknoten (B) aus Maus *pcos1* aufgetrennt wurden. DNA-Längenstandards sind an der linken Seite markiert (M: Marker, kb: Kilobasen).

	a 1	a 2	a 3	a 4	a 5	a 6	a 7	a 8	a 9	a 10	a 11	a 12	a 13	a 14	a 15	a 16	a 17	a 18	a 19	a 20	a 21	a 22
M1: Fuß	88	6	6																			
LK	62	38																				
M 2: Fuß				2	76	6	8	-	2	2	4											
LK				4	82	4	8	2	-	-	-											
M 3: Fuß												-	50	-	2	2	2	2	2			
LK												32	46	8	-	-	-	-	-			
M 4: Fuß							8													78	-	8
LK							4													90	4	-

**Abbildung 29: Tabellarische Auflistung der isolierten Cosmidspesies nach der ersten *in vivo* Selektion.**Die präparierte Cosmid-DNA aus vier Fußballen und vier Lymphknoten wurde unabhängig voneinander in *E. coli* transformiert, durch DNA-Minipräparation aus jeweils 50 Einzelklonen pro Organ isoliert, und nach Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI in Agarosegelen untersucht. Die reisolierten Cosmidspesies wurden nummeriert (a: Selektion in der Amastigote), und ihre Häufigkeit in % angegeben. Die Werte resultieren aus der Analyse von insgesamt 200 Einzelklonanalysen pro Fußballen und pro Lymphknoten.

### 3.2.8 *in vitro* Selektion

Parallel zur *in vivo* Selektion wurde das Gemisch aus rekombinanten Parasiten von *L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup>-pcos 1 und 2 bei 25°C kultiviert, um Cosmide zu selektieren, die der  $\Delta clpB$  Mutanten einen Vorteil in der Promastigote vermitteln können. Dazu wurden die Parasiten-Populationen 26 Tage bei 25°C kultiviert, wobei die Kulturen bei Erreichen der Stationärphase ( $2-3 \times 10^7$  Zellen/ml) im Verhältnis 1: 500 in frisches Kulturmedium verdünnt wurden. Da bereits gezeigt worden ist, dass sowohl *L. major*  $\Delta clpB$  als auch *L. donovani*  $\Delta clpB$  durch den Verlust von *ClpB* *in vitro* keine Einschränkung der Lebensfähigkeit als Promastigote erkennen lassen (Hübel *et al.*, 1997, Krobitch *et al.*, 1999), wurde das Kultivierungsmedium mit G418 versetzt, um einen Verlust der Cosmide zu verhindern. Nach 26 Tagen wurden die Cosmide aus den Parasiten isoliert und in *E. coli* transformiert. 50 Einzelklone wurden einer Restriktionsanalyse mit EcoRV und XbaI unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 gezeigt:



**Abbildung 30: Analyse des Fragmentmusters der reisolierten Cosmide nach *in vitro* Selektion.** Die nach der *in vitro* Selektion aus den Parasiten reisolierten Cosmide wurden mit EcoRV und XbaI behandelt, und die resultierenden Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt 0,7%-ige, Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele, in denen die Fragmente von 100 reisolierten Cosmiden aufgetrennt worden sind. DNA-Längenstandards sind auf der linken Seite markiert (M: Marker, kb: Kilobasen).

Auch bei der *in vitro* Selektion ist die Dominanz bestimmter Cosmid-Spezies zu verzeichnen. Auffällig hierbei sind zwei Cosmidtypen, die auch bei der Selektion in der Amastigote

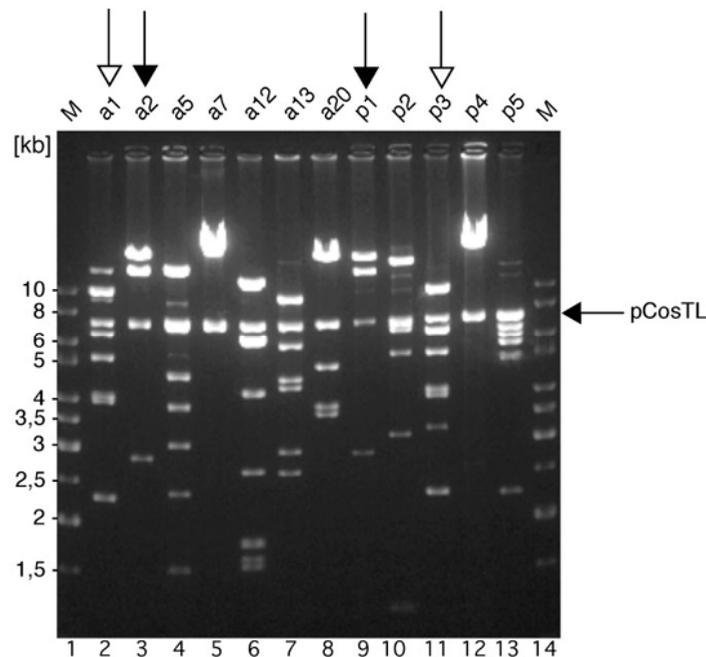
während der Mauspassage aufgetreten sind. Hierbei handelt es sich um die Cosmidtypen p1 (=a2) und p3 (=a1). Das führt zu dem Schluß, dass in der Sequenz des Inserts dieser beiden Cosmidtypen Gene liegen, die der  $\Delta clpB$  Mutante sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen Vorteil verschaffen. Auch in der Promastigote kann also das Vorhandensein eines definierten Episoms den Verlust eines essentiellen Gens überbrücken.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
in vitro I.1	50		24	14		2			
in vitro I.2		68			20		4	4	2

**Abbildung 31: Auflistung und Häufigkeit der reisolierten Cosmide nach der ersten *in vitro* Selektionsrunde.** Die Abbildung zeigt eine tabellarische Auflistung der reisolierten Cosmide. Die Cosmidpräparation wurde in zwei verschiedenen Ansätzen in *E. coli* transformiert. Aus jedem Transformationsansatz wurden 50 Einzelklone einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die reisolierten Cosmide wurden nummeriert (p: Selektion in der Promastigote), und ihre Häufigkeit in Prozent angegeben.

### 3.2.9 Analyse der reisolierten Cosmidspezies durch Feldinversionsgelelektrophorese

Eine Analyse der EcoRV/XbaI-behandelten Cosmidspezies durch Auftrennung der Fragmente mittels Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE) sollte Aufschluß darüber geben, ob es sich bei p1 und a2 bzw. p3 und a1 tatsächlich um identische, oder lediglich um ähnliche Cosmide handelt. Eine Auftrennung der Fragmente in der FIGE eignet sich deshalb, da diese Methode eine hohe Auflösung verspricht.



**Abbildung 32: Analyse der prominenten Cosmid-Spezies in der Feldinversionsgelelektrophorese.** Die Abbildung zeigt ein 1%-iges, Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Nach einem Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI der Cosmidtypen a1-p5 wurden die entstandenen Fragmente durch Feldinversionsgelelektrophorese aufgetrennt. Die Größen der Fragmente eines DNA-Längenstandards (M: Marker, Bahn 1 und 14, 1kb-Marker) sind auf der linken Seite markiert. Auf der rechten Seite weist der Pfeil auf das pCosTL-Vektorrückgrat (8,5kb) hin. Identische Fragmentmuster sind durch senkrechte Pfeile markiert (a1=p3, a2=p1)

Bei der FIGE handelt es sich um einen Vorläufer der Pulsfeldgelelektrophorese, bei der DNA nicht in einem konstanten elektrischen Feld, sondern in einem Feld mit wechselnder Polarität aufgetrennt wird. In freier Lösung liegt ein DNA Molekül in globulärer Form vor. Beim

Anlegen einer Spannung wird es im elektrischen Feld ausgerichtet, und aufgrund seiner negativen Ladung zur Anode wandern. Wird die Spannung aufgehoben, geht das Molekül wieder in seine globuläre Form über. Beim erneuten Anlegen einer Spannung wird sich das Fragment dann wieder im Feld ausrichten. Die Relaxierung des Moleküls bzw. das erneute Ausrichten im elektrischen Feld ist zeitlich von der Größe des Moleküls abhängig, wobei größere Moleküle proportional mehr Zeit zum Relaxieren und Ausrichten benötigen. Dementsprechend ist die zur Wanderung im elektrischen Feld verbleibende Zeit während eines Pulses geringer als bei kleineren Molekülen.

Bei der FIGE werden zwei verschiedene elektrische Felder angelegt, deren Orientierung sich um 180° unterscheidet. Dabei wird die Netto-Vorwärtsbewegung durch eine höhere Stärke des elektrischen Feldes oder einen zeitlich längeren Puls in der Vorwärtsbewegung gewährleistet (Lottspeich & Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, 1998).

Die Cosmide a1-p5 wurden einem Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI unterzogen, und die resultierenden Fragmente in einem Agarosegel durch FIGE aufgetrennt.

In Abbildung 32 ist eindeutig zu erkennen, dass die Cosmide a2 und p1 (Bahn 3 und 9) bzw. die Cosmide a1 und p3 (Bahn 2 und 11) dasselbe Bandenmuster aufweisen. Dabei resultiert die oberste Bande in Bahn 2 aus einem nicht vollständigen Restriktionsverdau und ist daher in Bahn 11 nicht zu finden. Somit ist bestätigt, dass die Cosmide a1/p3 bzw. a2/p1 sowohl in der *in vivo* als auch in der *in vitro* Selektion den  $\Delta clpB$  Parasiten einen Vorteil vermitteln, der in der Selektion auf diese Cosmidtypen resultiert.

Andere Cosmide zeigen untereinander keine Übereinstimmungen in ihren Fragmentmustern.

### 3.2.10 Selektionsrunde 2

#### a) *In vivo* Selektion Runde 2.I

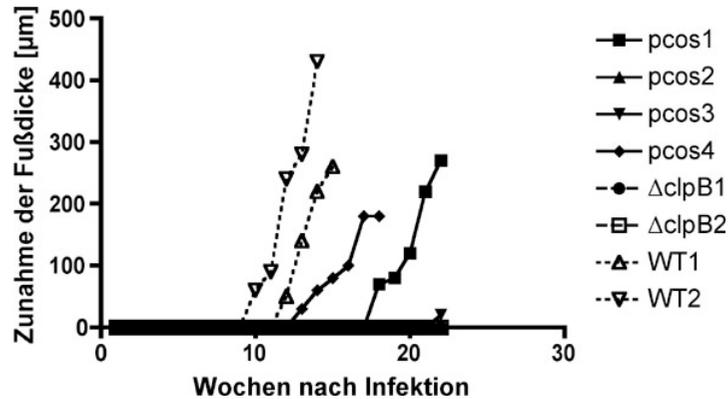
Um eine weitere Selektion auf das Cosmid mit dem stärksten Effekt zu forcieren, wurde eine zweite Selektionsrunde gestartet. Dazu wurden zunächst alle Cosmide, die in der ersten Selektionsrunde mit hoher Präferenz selektiert worden waren (zweistelliger prozentualer Anteil im Gesamtisolat) einzeln in die *L. major*  $\Delta clpB$  Mutante transfiziert (*L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup> Klon 2). Nach Abschluß der Selektion wurden die Stämme *L.m. a1/p3*, *L.m. a2/p1*, *L.m. a5*, *L.m. a12*, *L.m. a13*, *L.m. a20*, *L.m. p2*, *L.m. p4* und *L.m. p5* zu gleichen Teilen gemischt, und als spätlogarithmische Kulturformen jeweils mit einer Gesamtzellzahl von  $1,35 \times 10^7$  ( $1,5 \times 10^6$  pro Stamm) in die rechten hinteren Fußballen von 4 BALB/c Mäusen inokuliert. Zur Kontrolle wurden jeweils 2 Mäuse mit  $1,35 \times 10^7$  5ASKH Wildtyp Parasiten bzw. mit  $1,35 \times 10^7$  Parasiten der  $\Delta clpB$  Mutante infiziert. Die BALB/c Mäuse für diese Infektion wurden, abweichend zu früheren Experimenten aus der Haltung im Max Planck Institut für Infektionsbiologie (Berlin) bezogen, da die hauseigene Mausezucht im BNI eingestellt worden war.

Der Infektionsverlauf wurde durch das Messen der Fußschwellung dokumentiert und ist in Abbildung 33 gezeigt:

Nach 10 bzw. 12 Wochen beginnt die Läsionsbildung bei den mit *L. major* WT-infizierten Mäusen. Obwohl die Läsionsbildung gegenüber der ersten Infektionsrunde um 8 Wochen verzögert ist, ist jedoch der Verlauf vergleichbar: innerhalb von 3-4 Wochen nach Beginn ist eine kontinuierliche Steigerung der Fußballenschwellung zu beobachten, die in der Ulzeration der Läsion endet.

Die  $\Delta clpB$  Mutanten verursachen während des Beobachtungszeitraums von 25 Wochen keine Entwicklung von Fußläsionen.

Der Mix aus den rekombinanten Parasiten *L.m. a1/p3-p5* dagegen verursacht in 2 von 4 Mäusen nach 13-18 Wochen eine Läsionsbildung, die damit gegenüber der Wildtypinfektion um 3-8 Wochen verzögert eintritt. Damit ist die leichte Verzögerung in der Läsionsentwicklung durch die Cosmid-komplementierten  $\Delta clpB$  Mutanten aus der ersten Infektionsrunde bestätigt. Zwei weitere Mäuse, die mit den komplementierten Parasiten infiziert wurden, blieben während des Beobachtungszeitraums von 25 Wochen läsionsfrei. Zur Analyse der Cosmide, die die Läsionsbildung durch die  $\Delta clpB$  Mutanten gefördert haben, wurden die Mäuse *pcos1* und *pcos4* getötet, deren Fußballen und Lymphknoten homogenisiert und in Kuturmedium aufgenommen.



**Abbildung 33: Infektionsverlauf der *in vivo* Selektionsrunde 2.I**

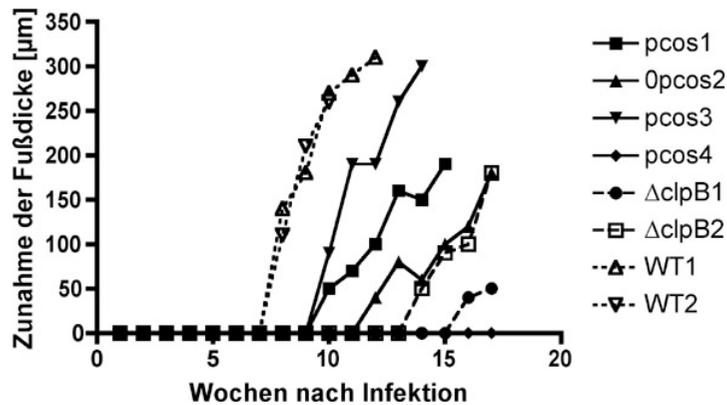
Die dominanten reisolierten Cosmidspezies (zweistellige Prozentzahl) aus der ersten *in vivo* und *in vitro* Selektion wurden einzeln in *L.m.ΔclpB* transfiziert, die rekombinanten Parasiten zu gleichen Teilen gemischt und in den rechten Hinterfußballen von 4 BALB/c Mäusen inokuliert. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei weitere Tiere mit *L. major* WT (Positivstandard) sowie mit *L.m.ΔclpB* (Negativstandard) infiziert. Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Messungen der Fußballen dokumentiert, und als Differenz zum uninfizierten Fußballen in  $\mu\text{m}$  angegeben.

### b) Runde 2.II

Um eine statistisch vertretbare Aussage über den prozentualen Anteil der Virulenzvermittelnden Cosmide zu erhalten, wurde eine weitere Infektionsrunde mit den Parasiten *L.m. a1/p3-p5* initiiert. Da in der Infektionsrunde 2.I nur 2 von 4 Mäusen eine Läsion entwickelt hatten, wurde die Infektionsdosis in diesem Experiment erhöht. In dieser Runde war jeder Cosmid-tragende Stamm mit  $5 \times 10^6$  Parasiten vertreten. Bei neun Stämmen betrug die Gesamtzellzahl des Inokulats folglich  $4,5 \times 10^7$  Parasiten. Es wurden erneut 4 Mäuse mit dem Gemisch aus Cosmid-tragenden Parasiten infiziert, zur Kontrolle 2 Mäuse mit  $4,5 \times 10^7$  *L. major* WT, und 2 weitere Mäuse mit  $4,5 \times 10^7$  Parasiten der  $\Delta clpB$  Mutante. Die BALB/c Mäuse für dieses Experiment waren männlich und wurden wiederum aus Berlin bezogen. Der Infektionsverlauf ist in Abbildung 34 gezeigt.

*L. major* WT verursacht in beiden Mäusen 8 Wochen nach Infektion eine Läsionsentwicklung. Nach 2-4 Wochen kontinuierlichen Läsionswachstums begannen die Fußläsionen zu ulzerieren. In Einklang mit den Ergebnissen vorheriger Infektionsrunden begannen die Parasiten, die mit dem Cosmidgemisch transfiziert waren, etwas zeitversetzt zum Wildtyp eine Schwellung des Fußballens zu induzieren. Zwei dieser Mäuse (*L.m. pcos3* und *L.m. pcos1*) wurden zur Identifizierung der Virulenz vermittelnden Cosmide eingesetzt. Ihre Fußballen sowie drainierende Lymphknoten wurden homogenisiert und zur Reisolierung der Parasiten in Kulturmedium aufgenommen.

In diesem Experiment zeigten erstmals auch *L.m. ΔclpB* eine Läsionsbildung. 14-16 Wochen nach Inokulation der Parasiten konnte eine Schwellung des Fußballens beobachtet werden. Dieser Verlauf ist wahrscheinlich auf die erhöhte zur Infektion eingesetzte Parasitenzahl zurückzuführen, die mit  $4,5 \times 10^7$  erheblich höher war als in vorangegangenen Experimenten. Die *L.m. pcos1*-infizierte Maus zeigte einen ähnlichen Infektionsverlauf wie die *L.m. pcos*-infizierte Maus, der jedoch mit einem Beginn der Läsionsentwicklung nach 12 Wochen eher mit dem durch die *ΔclpB* Mutante verursachten Infektionsverlauf vergleichbar war. Die *L.m. pcos2*-infizierte Maus wurde daher nicht in die Analyse der Virulenz vermittelnden Cosmide einbezogen. Die Maus, die mit *L.m. pcos4* infiziert worden war, zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Fußballenschwellung.



**Abbildung 34: Infektionsverlauf der *in vivo* Selektion 2.II.** Je vier BALB/c Mäuse wurden mit  $4,5 \times 10^7$  Parasiten durch Inokulation in den rechten Hinterfußballen infiziert. Die Läsionsentwicklung wurde anhand wöchentlicher Messungen der Fußballen festgehalten, und ist als Zunahme der Fußdicke in Abhängigkeit von der Zeit (Wochen nach Infektion) dargestellt. Pcos1-4: Mit dem Gemisch der verschiedenen Cosmid-tragenden Parasiten infizierten Mäuse.

### c) Runde 2.III

Eine dritte Infektionsrunde wurde unter denselben Bedingungen wie Runde 2.II initiiert. Es wurden erneut  $4,5 \times 10^7$  *L. major* WT,  $4,5 \times 10^7$  *ΔclpB* Parasiten sowie ein Gemisch aus je  $5 \times 10^6$  Parasiten der Stämme *L.m. a1-p5* in den Fußballen von BALB/c Mäusen inokuliert. Die Mäuse für dieses Experiment waren weiblich und wurden von einem kommerziellen Lieferanten (Charles River) bezogen. Der Infektionsverlauf ist in Abbildung 35 gezeigt:



**Abbildung 35: Infektionsverlauf der *in vivo* Selektion 2.III.**  $4,5 \times 10^7$  Parasiten wurden in den rechten Hinterfußballen von BALB/c Mäusen inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde durch wöchentlicher Messungen der Fußballenschwellung dokumentiert, und ist in der Abbildung als Zunahme der Fußdicke in Abhängigkeit von

der Zeit nach Infektion dargestellt. Pcos1-4: Mit dem Gemisch der verschiedenen Cosmid-tragenden Parasiten infizierten Mäuse.

Eine Läsionsentwicklung ist bei den *L. major* WT-infizierten Mäusen in dieser Infektionsrunden nach 4 bzw. 8 Wochen zu erkennen. Die Cosmid-komplementierten Parasiten *L.m. pcos1*, *-3* und *-4* verursachen 5-9 Wochen nach Infektion eine Fußballenschwellung. Damit wird ein weiteres Mal eine dem Wildtyp gegenüber leicht verzögerte Läsionsbildung beobachtet. Es wurde außerdem wiederholt gezeigt, dass Episom-tragende *L.m. Δc1pB* Mutanten wieder zu einer Läsions- bzw. Infektionsetablierung in der Lage sind.

*L.m. pcos2* blieb ebenso wie eine *L.m. Δc1pB* ( $\Delta c1pB1$ ) avirulent. Die zweite, *L.m. Δc1pB*-infizierte Maus entwickelte wahrscheinlich wegen der hohen Infektionsdosis nach 14 Wochen eine Läsion. Da die *L.m. pcos0*, *-2* und *-3* infizierten Mäuse bereits vorher eine Fußballenschwellung entwickelten, wurden diese drei Mäuse getötet und die Lymphknoten sowie die Fußläsionen zur Reisolierung von Parasiten eingesetzt.

Nachfolgend wurden alle aus Fuß und Lymphknoten reisolieren Parasiten zur Gewinnung von Cosmid-DNA eingesetzt. Diese wurde in *E. coli* transformiert, und durch anschließenden Restriktionsverdau von 50 Einzelklonen pro Organisolat analysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente wurde der prozentuale Anteil jedes Cosmidtyps pro Organisolat bestimmt. Das Ergebnis zeigt die Tabell in Abbildung 36:

	a1 (=p3)	a2 (=p1)	a5	a12	a13	a20	p2	p4	p5
Maus 1: Fuß LK	2%				56% 74%		42% 26%		
Maus 2: Fuß LK								100% 100%	
Maus 3: Fuß LK		74% 34%			2% 12%	16% 42%		4% 8%	
Maus 4: Fuß LK		4%			72% -	14%			
Maus 5: Fuß LK	14% 4%	8% 4%	20% 8%		20% 8%	32% 60%			

**Abbildung 36: Tabellarische Auflistung der dominanten Cosmidtypen nach der zweiten *in vivo* Selektion**

Abgebildet ist eine tabellarische Auflistung der reisolieren Cosmidtypen nach den zweiten *in vivo* Selektionsrunden. Die Ergebnisse stellen die Zusammenfassung aus den drei voneinander unabhängigen Mauseinfektionsrunden 2.I- 2.III dar. Die Parasiten wurden aus Fußballen und Lymphknoten von insgesamt fünf Mäusen reisolieren. Nach der Präparation von Cosmid-DNA wurde diese in *E. coli* transformiert, und durch die Isolierung von Cosmid-DNA aus jeweils 50 Einzelklonen pro Organ und anschließendem Restriktionsverau mit EcoRV und XbaI untersucht. Durch die Auftrennung der charakteristischen Fragmentmuster in Agarosegelen wurde der prozentuale Anteil der Cosmidtypen bestimmt.

In den Organisolaten sind jeweils zwischen zwei und fünf verschiedene Cosmidtypen identifiziert worden. Damit hat in der zweiten Selektionsrunde eine Einengung der 9 eingesetzten Cosmidtypen aus der ersten Selektionsrunde stattgefunden. Eine Fokussierung auf ein definiertes Cosmid ist jedoch nicht zu verzeichnen. Die Cosmidtypen sind nach der zweiten Selektionsrunde in drei verschiedene Gruppen einteilbar:

- 1) Cosmide, die in der zweiten Selektionsrunde in amastigoten Leishmanien verloren gegangen sind: Cosmid a12 und p5

- 2) Cosmide, die jeweils aus einer Maus reisoliert werden konnten: Cosmid a1 (=p3), a5 und p2 (wobei Cosmid a1 zu einem extrem geringen Anteil auch im Fußläsionsisolat einer zweiten Maus identifiziert wurde)
- 3) Cosmide, die aus 3 und mehr Mäusen isoliert wurden und damit häufig reisoliertere Cosmidtypen darstellen: a2 (=p1), a13 und a20

Aus dem Lymphknotenisolat von Maus 1 aus Infektion 2.II konnte zwar Cosmid- DNA gewonnen werden, doch ließ sich diese nicht in *E.coli* transformieren. Deshalb konnten keine Daten für die Cosmidverteilung in den Parasiten dieses Lymphknotens erhoben werden. In allen anderen Mäusen wurden in den Parasiten aus Fußläsion und Lymphknoten dieselben Cosmidtypen reisoliert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass auch im Lymphknoten von Maus pcos1, 2.II eine ähnliche Cosmidverteilung wie in den Parasiten der Fußläsion vorhanden war. Aus diesem Grund wurde das Cosmid a2 (=p1) der Gruppe 3 zugeteilt.

Insgesamt wurde in der zweiten Selektionsrunde bestätigt, dass die Überexpression von Genen von einem Episom die Virulenz der  $\Delta clpB$  Mutante positiv beeinflusst.

### 3.2.11 Selektion in der Promastigote

Parallel zur zweiten Selektionsrunde in amastigoten Parasiten sollte die Zahl der für die Promastigoten nützlichen Cosmide weiter eingeschränkt werden. Dazu wurden die unterschiedlichen Stämme (*L.m.* a1-p5) zu gleichen Anteilen in Kulturmedium eingesäht. Beim Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Parasiten im Verhältnis 1: 500 in frisches Kulturmedium verdünnt. Nach 34-tätiger Kultivierung bei 25°C erfolgte die Isolierung von Cosmid-DNA, welche anschließend in *E.coli* transformiert wurde. Eine Analyse von 50 Einzelklonen durch Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI ergab folgendes Ergebnis:

a1(=p3)	a2(=p1)	a5	a12	a13	a20	p2	p4	p5
		2%	8%	2%	2%		48%	26%

#### Abbildung 37: Häufigkeit der reisolierten Cosmidtypen nach zweiten *in vitro* Selektion

Die rekombinanten Parasiten *L.m.* a1- *L.m.* p5 wurden zu gleichen Teilen gemischt und bei 25°C kultiviert. Nach der Isolation von Cosmid-DNA wurde diese in *E. coli* transformiert, und durch die Isolation von DNA aus 50 Einzelklonen, Restriktionsverdau der Cosmid-DNA mit EcoRV und XbaI und anschließender Auftrennung der Fragmente in Agarosegelen analysiert. Gezeigt ist eine tabellarische Auflistung des prozentualen Anteils der Cosmidspesies nach der zweiten *in vitro* Selektionsrunde.

Mit signifikanter Häufigkeit traten im Cosmidisolat die Cosmide p4 und p5 auf. Die Cosmide, die vorher während der Selektion in Amastigoten isoliert wurden, spielen in der Promastigote offenbar eine untergeordnete Rolle. Die Cosmide a1(=p3) und a2 (=p1) wurden nach der 2. *in vitro* Selektion nicht wieder reisoliert.

Weiterhin wurden in 12 % der Fälle Cosmide beobachtet, deren Fragmentmuster mit keinem der ursprünglich eingesetzten Cosmide übereinstimmte. Diese Konstrukte sind vermutlich durch Rekombinationsereignisse in *E.coli* oder *L. major* entstanden, und werden bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

In einer weiteren *in vitro* Selektion sollte untersucht werden, ob die Prävalenz der Cosmide a1/p3 bzw. a2/p1 induziert werden kann, wenn die dominanten Cosmide p4 und p5 dem

Parasiten nicht zur Auswahl stehen. Zu diesem Zweck wurden die Parasiten *L.m.* a1-p2 zu gleichen Anteilen gemischt und in frisches Kulturmedium eingesät. Bei Erreichen der Stationärphase wurden die Zellen im Verhältnis 1:500 in frisches Kulturmedium überführt. Nach 47 Tagen wurden Cosmide isoliert und mittels Restriktionsanalyse mit EcoRV und XbaI untersucht.

a1(=p3)	a2(=p1)	a5	a12	a13	a20	p2
				6%		82%

**Abbildung 38: Häufigkeit der reisolierten Cosmide nach einer *in vitro* Selektionsrunden ohne *L.m.* p4 und *L.m.* p5.** Die rekombinanten Parasiten *L.m.* a1- *L.m.* p2 wurden zu gleichen Teilen gemischt und bei 25°C kultiviert. Nach der Isolation von Cosmid-DNA wurde diese in *E. coli* transformiert, und durch die Isolation von DNA aus 50 Einzelklonen, Restriktionsverdau der Cosmid-DNA mit EcoRV und XbaI und anschließender Auftrennung der Fragmente in Agarosegelen analysiert. Gezeigt ist eine tabellarische Auflistung des prozentualen Anteils der Cosmidspezies nach der zweiten *in vitro* Selektionsrunde ohne die Cosmide p4 und p5.

Bei einer längeren Selektionsdauer und ohne die Cosmide p4 und p5 setzt sich eindeutig das Cosmid p2 in der *in vitro* Selektion durch.

Neben den identifizierten Cosmiden traten wieder mit einem Anteil von 12% nicht identifizierbare Cosmidtypen auf, die vermutlich durch Rekombinationsereignisse in *E.coli* bzw. *L. major* entstanden sind.

### 3.2.12 Sequenzanalyse der prominenten Cosmidtypen

Um Anhaltspunkte über offene Leserahmen zu erhalten, die auf den jeweiligen Fragmenten genomischer DNA der Cosmide enthalten sind, wurden die Inserts der isolierten Cosmide von den Enden her ansequenziert (Kettenabbruch Methode nach Sanger, siehe Kapitel 2.2.18). Die Oligonukleotide CH2 und M13R (siehe Kapitel 2.2.11) binden dabei im pCosTL-Rückgrat der Cosmide unmittelbar neben den BamHI Schnittstellen (folglich am Anfang und Ende des DNA Inserts), und stellen den Ansatzpunkt für die Synthese des komplementären DNA Stranges durch die DNA-Polymerase dar. Die Sequenzen wurden anhand der Computersoftware Sequencing Analysis, Version 3.0, Applied Biosystems erstellt, und zur Identifizierung der chromosomalen Lokalisation des untersuchten Cosmidinserts mit Hilfe der *Leishmania* GeneDatabase analysiert. Nachdem die Sequenz eines Cosmidinserts identifiziert worden war, wurde diese mit der Software MacMolly bzw. MacVector auf das Vorhandensein offener Leserahmen überprüft, und mit den offenen Leserahmen in der GeneDatabase-Sequenz verglichen. Dazu wurde als Minimalgröße für ein resultierendes, potentielles Polypeptid eine Größe von 20 kDa angenommen. Die DNA Sequenzen der zugehörigen offenen Leserahmen wurde in der *Leishmania* Gene Database analysiert, oder in Proteinsequenzen übersetzt und in der NCBI Protein/Protein Datenbank untersucht. Eine Übersicht der identifizierten offenen Leserahmen der Cosmide a13, p2 und p4 ist in Abbildung 39 gezeigt:

#### ORFs Cosmid a13, Chromosom 33:

ORF Nr.	Größe In bp	MW In kDa	E- Wert	
1	3221	114,8	0	Hypothetisches Protein
2	4301	156	0	ABC Transporter Protein
3	2489	90,1	0	Tyrosyl DNA Phosphodiesterase
4	1253	45,8	0	Hypothetisches Protein

5	unvollst.	820	0	<i>Cyst Germination specific acid repeat protein</i>
---	-----------	-----	---	--

### ORFs Cosmid p4, Chromosom 7:

ORF Nr.	Größe In bp	MW In kDa	E-Wert	
1	5621	174	0	Proteinkinase, putativ
2	2747	99	0	DNA Topoisomerase-ähnliches Protein
3	560	20	2.3 <sup>-122</sup>	Centrin
4	3770	135	0	Karyopherin/Importin
5	2462	89	0	Malonyl-CoA-Decarboxylase

### Cosmid p2, Chromosom 23:

ORF Nr.	Größe in bp	MW in kDa	E- Wert	Potentiell Protein
1	4703	173,8	0	<i>Multidrug resistance protein</i>
2	1256	46,3	1,3 <sup>-280</sup>	Argininosuccinat Synthase
3	863	30,4	1,1 <sup>-191</sup>	Pteridine Reductase 1
4	3449	123	0	Hypothetisches Protein Zinkfinger Motiv vorausgesagt
5	992	37,2	7,1 <sup>-221</sup>	Hypothetisches Protein
6	1469	54,9	7,6 <sup>-276</sup>	Tryptophanyl tRNA Synthetase Oxidoreduktase Aktivität
7	3935	140,5	0	Hypothetisches Protein
8	818	28,8	1,7 <sup>-181</sup>	Hypothetisches Protein

**Abbildung 39: Tabelle ORFs p2, p4, a13.** Eine Ansequenzierung der Genbank-DNA-Fragmente in pCosTL und eine anschließende Ergänzung der Sequenzen in der *Leishmania Gene DataBase* führte zur Identifizierung der vollständigen Sequenz des *Inserts* der aufgelisteten offenen Leserahmen (ORF). Mit Hilfe der MacMolly Software wurden offene Leserahmen (ORFs) identifiziert, wobei von einer Minimalgröße für das resultierende Protein von 20 kDa ausgegangen wurde.

#### 3.2.13 Verifizierung der Virulenzsteigerung in *in vitro* Makrophagen-Infektionsstudien

In *in vitro* Makrophagen-Infektionsexperimenten wurde gezeigt, dass *L.m. Δc1pB* Parasiten eine eingeschränkte Fähigkeit zur Parasitierung von isolierten Makrophagen aufweisen. Nach 48-stündiger Inkubation waren nur 29 % der Makrophagen mit *L.m. Δc1pB* Parasiten infiziert, während *L. major WT* über 90 % der Makrophagen zu finden war. Außerdem zeigte *L.m. Δc1pB* auch nach 48 Stunden keine Amastigoten-typische Zellform, sondern war noch immer durch einen länglichen Zellkörper charakterisiert (Hübel *et al.*, 1997).

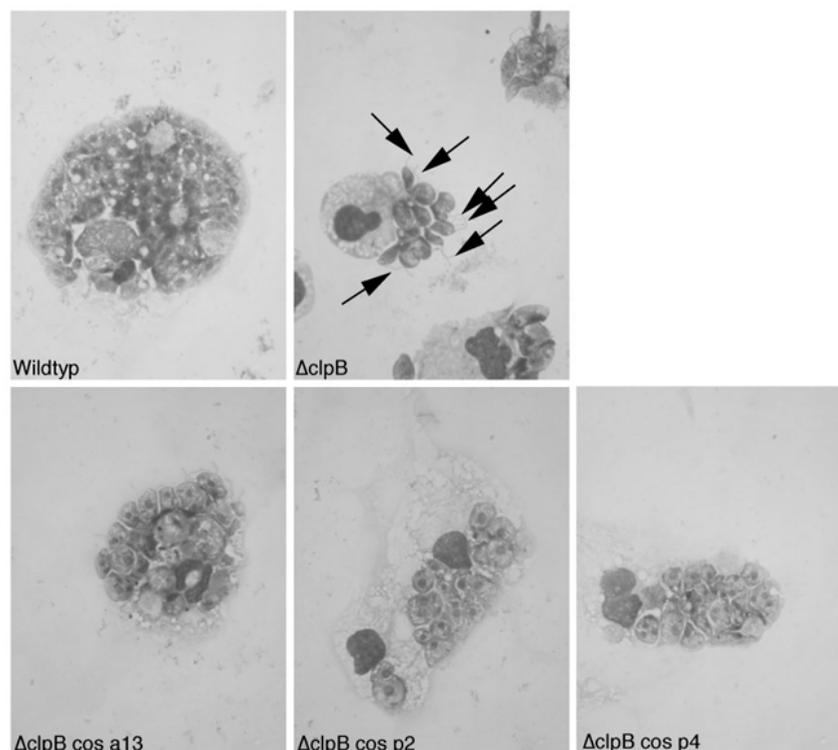
In Mausinfektions-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die verminderte Virulenz der *Δc1pB* Mutanten durch das Vorhandensein definierter Cosmide kompensiert bzw. komplementiert werden kann. Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob sich das Vorhandensein dieser Cosmide auf die Fähigkeit zur Infektion von Makrophagen bzw. auf die Fähigkeit zur Persistenz und Replikation der *L.m. Δc1pB* Parasiten in den Makrophagen auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden durch mehrfaches Spülen des Peritoneums Makrophagen von NMRI Mäusen isoliert. Diese wurden anschließend mit einer Zelldichte von  $1,25 \times 10^5$  in

*chamber slides* eingesäht, und nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C zum Adhären der Zellen mit je  $2 \times 10^5$  Parasiten (*L. major* WT, *L.m.Δc1pB*, *L.m.Δc1pB a13*, *-p2* und *-p4*) infiziert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand entfernt, die Zellen wurden fixiert, einer Giemsa-Färbung unterzogen und mikroskopisch untersucht.

Abbildung 40 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der gefärbten Objektträger. Wie bereits beschrieben unterscheiden sich *L. major* WT- und *L.m. Δc1pB*-infizierte Makrophagen durch die Anzahl der phagozytierten Leishmanien (Hübel *et al.*, 1997). *L. major* WT ist nach 48 Stunden vollständig zur Amastigote differenziert, und parasitiert einen großen Teil (ca. 64%) der Makrophagen. Dagegen scheint *L.m.Δc1pB* den Differenzierungsprozess nicht abzuschließen, wie ebenfalls bereits von Hübel *et al.* (1997) beobachtet: die in bzw. an den Makrophagen weisen eine längliche, eher promastigoten-ähnliche Gestalt auf, und in fast allen Fällen sind noch Flagellen der Parasiten erkennbar. Lediglich 4% der Makrophagen zeigen intrazelluläre Parasiten.

Eine Infektion mit *L.m.Δc1pB a13*, *-p2* und *-p4* dagegen ist vergleichbar mit der Infektion durch *L. major* WT: die in den Makrophagen vorliegenden Parasiten weisen die für Amastigoten typische rundliche Zellgestalt auf, und die Geißeln sind vollständig zurückgebildet. Die Zahl der infizierten Makrophagen (48% mit *L.m.Δc1pB a13* bzw. 66% mit *L.m.Δc1pB p4*) ist höher als die Zahl der *L.m.Δc1pB* infizierten Makrophagen.



**Abbildung 40: Bestätigung der Infektiosität von Cosmid-transfizierten *L.m.Δc1pB* Parasiten in *in vitro* Makrophagen Infektionen.** Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1,6 Parasiten (*L. major* WT, *L.m.Δc1pB*, *L.m.Δc1pB* cos a13, *-cos p2* und *-cos p4*) pro Makrophage infiziert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 35°C wurden die Zellen in Methanol fixiert, der Objektträger getrocknet und gefärbt. Die Abbildung zeigt Giemsa-gefärbte Präparate bei 63-facher Vergrößerung. Schwarze Pfeile deuten auf nicht-zurückgebildete Geißel und damit auf promastigoten-ähnliche Leishmanien.

### 3.2.14 Identifizierung des Virulenz vermittelnden ORFs auf Cosmid a13

Cosmid a13 führte in 4 von Mäusen sowie in geringem Ausmaß während der *in vitro* Passage zu einem Vorteil für die  $\Delta clpB$  Parasiten. Weiterhin wurde die Vermittlung von Virulenz in *in vitro* Makrophageninfektionen bestätigt. Aus diesem Grund sollte dieses Cosmid für die Identifizierung eines einzelnen, für die Virulenz verantwortlichen ORFs eingesetzt werden.

### 3.2.15 Durchmustern der Genbank nach Cosmid a13-Homologen

Im Folgenden sollte der Bereich von Cosmid a13 genauer charakterisiert werden, der den  $\Delta clpB$  Mutanten Virulenz vermittelt. Um eine Eingrenzung auf einen offenen Leserahmen zu ermöglichen, standen zwei verschiedene Strategien zur Auswahl. Zum einen bestand die Möglichkeit, jeden einzelnen Leserahmen des Cosmidinserts mittels PCR zu amplifizieren, und ihn in einen Expressionsvektor zu klonieren. Dazu stand der Vektor pIRSAT zur Verfügung, der eine promastigoten- bzw. eine amastigotenspezifische Expression von Genen erlaubt. Da jedoch nichts über die Expressionkinetik des Kandidaten-ORFs von Cosmid a13 bekannt war, sollten die einzelnen Leserahmen möglichst in ihren natürlichen flankierenden Sequenzen kloniert werden. Eine Klonierung der vollständigen Geneinheit inklusive 5'- und 3'-untranslatierter Region kann jedoch wegen zunehmender Größe des Fragments (und damit einhergehendem gehäuften Auftreten von Restriktionsschnittstellen) mit Schwierigkeiten verbunden sein.

Daher wurde die zweite Strategie gewählt, die auf der Auswahl von mit a13 verwandten Cosmiden beruht. Dabei sollte zunächst die Cosmid-Genbank nach Cosmiden durchmustert werden, die eine partielle Überlappung mit der Sequenz von Cosmid a13 aufweisen.

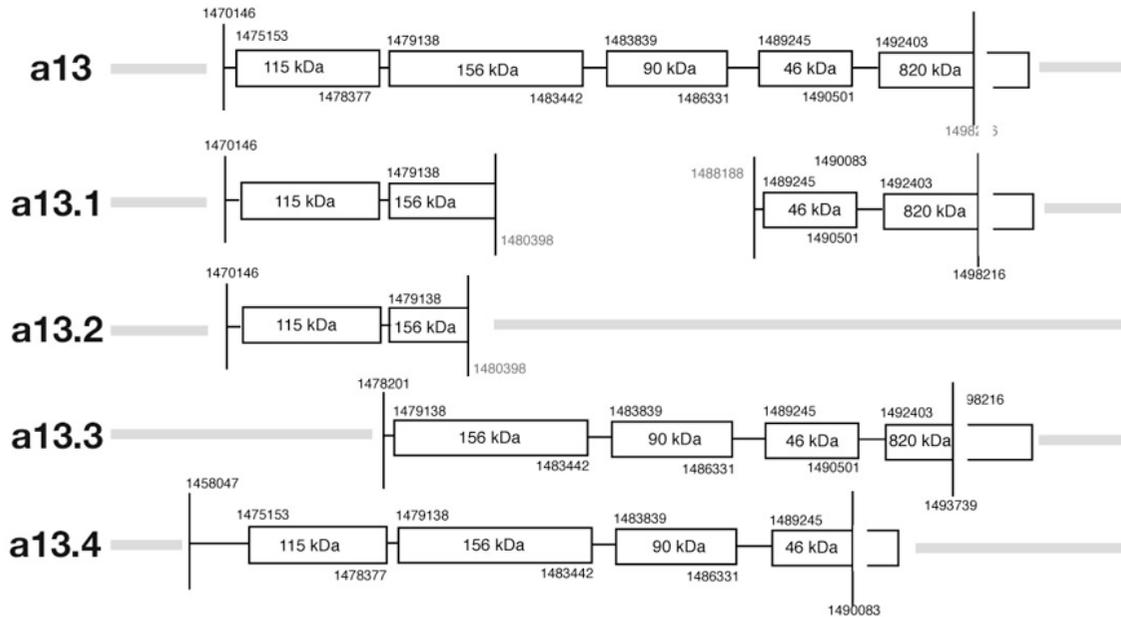
Zu diesem Zweck wurden ca. 8 x 1000 cfu der Cosmid Genbank ausplattiert und anschließend auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Durch Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden vom ersten und letzten vollständigen ORF des DNA-Inserts von Cosmid a13 wurden Kolonien identifiziert, die a13-überlappende Inserts enthielten. Nach jeweils einer Maxipräparation wurden diese Cosmide von den Enden des Inserts ansequenziert, wobei die Oligonukleotidstarter CH2 und M13R jeweils nahe der BamHI Schnittstellen im pCosTL-Rückgrat binden, und so eine Ansequenzierung von Anfang und Ende des DNA Inserts erlauben.

Cosmide, die in der Sequenz ihres DNA Inserts zu a13 identisch waren, wurden verworfen. Ein Schema der verbliebenen teilweise überlappenden Cosmide (Cosmide a13.3 und a13.4) ist in Abbildung 41 gezeigt.

### 3.2.16 Variierung des Inserts von Cosmid a13 durch Restriktionsverdau

Da nach der Analyse der homologen Cosmide lediglich zwei Cosmide zur Eingrenzung des relevanten Bereichs auf Cosmid a13 eingesetzt werden konnten, sollte das Ursprungscosmid a13 durch Deletionen modifiziert werden. Dazu wurde zunächst die Sequenz von a13 auf Restriktionsschnittstellen untersucht. Interessant waren solchen Schnittstellen, die im subklonierten DNA Fragment, aber nicht im Vektorrückgrat vertreten waren oder aber in der Nähe der BamHI Schnittstelle des Vektors lagen, in welche das Insert ligiert worden war. Diese Voraussetzungen wurden von den Restriktionsendonukleasen BglII bzw. XbaI erfüllt. Durch einen Restriktionsverdau mit BglII wurde ein Fragment von 7790 bp, und damit ein Teil des zweiten ORFs sowie der vollständige dritte ORF aus dem Insert entfernt.

Die Restriktionsendonuklease XbaI entfernte ein Fragment von 17818 bp und damit einen Teil des zweiten ORFs, die vollständigen ORFs 3 und 4 sowie das Ende des Inserts bis zur XbaI *site* im Vektorrückgrat. Die Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, wobei das pCosTL-Rückgrat mit den verbleibenden Insert-Sequenzen aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und zur Religation eingesetzt wurde. Die entstandenen, modifizierten Cosmidsequenzen a13-BglII (a13.1) sowie a13-XbaI (a13.2) sind in Abbildung 41 gezeigt:



**Abbildung 41: Schematische Darstellung der a13-homologen Cosmide**

Die Abbildung zeigt die zu a13 homologen Cosmide, die durch eine Durchmusterung der ausplattierten Cosmid-Genbank identifiziert wurden, oder durch Restriktionsverdau des Ursprungscosmids a13 entstanden sind. a13: Ursprungscosmid; a13.1: Cosmid a13-BglII; a13.2: Cosmid a13-XbaI; Cosmide 13.3 und 13.4: überlappende Cosmide aus der Cosmidbank. Die schwarz umrandeten Boxen stellen die identifizierten ORFs mit Angabe des Molekulargewichtes des putativen Proteins dar. Zahlen über bzw. unter den Boxen sind bp-Angaben, und kennzeichnen die Lokalisation sowie Beginn und Ende der ORFs auf dem *Leishmania*-Chromosom. Die grauen Balken symbolisieren das pCosTL-Vektorrückgrat.

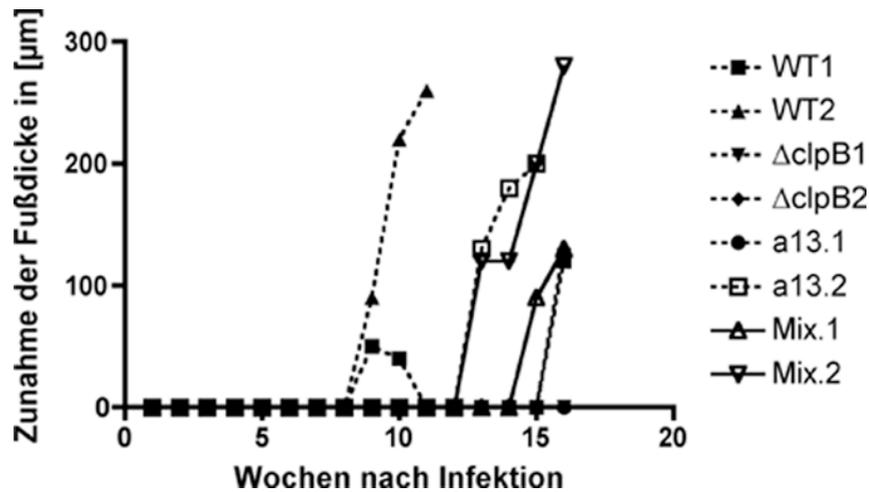
### 3.2.17 *in vivo* Selektion auf a13-homologe Cosmide

Die Cosmide a13 und a13.1-a13.4 wurden einzeln in *L. major*  $\Delta clpB$  Puro<sup>r</sup>/Hygro<sup>r</sup> transfiziert. Nach Abschluss der Selektion wurden die mit a13.1-4 transfizierten Leishmanien zu gleichen Teilen gemischt ( $2 \times 10^6$  pro Stamm) und zur Infektion von 2 BALB/c Mäusen eingesetzt. Zur Kontrolle wurden je zwei weitere Mäuse mit *L. major* WT, *L.m.*  $\Delta clpB$  sowie *L.m.*  $\Delta clpB$  a13 infiziert. Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Messungen der Fußballen dokumentiert. Der Verlauf ist in Abbildung 42 gezeigt.

Nach 9-wöchiger Infektion ist eine beginnende Fußballenschwellung bei den WT-infizierten Mäusen zu beobachten. Wie bereits in der ersten *in vivo* Selektionsrunde beobachtet, verursacht der WT jedoch zunächst nur in einer von zwei Mäusen eine Läsionsentwicklung, die Fußballenschwellung der zweiten Maus bildet sich zunächst wieder zurück. Erst nach 16 Wochen ist eine Läsionsentwicklung auch bei der zweiten WT-infizierten Maus zu beobachten. Auch von der zweiten Positivkontrolle (*L.m.*  $\Delta clpB$ -a13) wird nur eine von zwei Mäusen (nach 13 Wochen) erfolgreich infiziert. Der Grund für diese uneinheitlichen Infektionsverläufe ist nicht bekannt.

Die Parasiten, die mit den a13-homologen Cosmiden (a13.1-4) transfiziert wurden, verursachen nach 13 bzw. 15 Wochen eine progressive Läsionsentwicklung, die auf eine Komplementation bzw. einen kompensatorischen Mechanismus zum Ausgleich des  $\Delta clpB$

Phänotyps schließen läßt. Nach 16 Wochen zeigt eine  $\Delta clpB$ -infizierte Maus (Negativkontrolle) ebenfalls eine beginnende Fußballenschwellung.



**Abbildung 42: *in vivo* Selektion auf a13-homologe Cosmide: Infektionsverlauf.** Je  $8 \times 10^6$  Parasiten wurden in den rechten Hinterfüßballen von BALB/c Mäusen inokuliert (*L. major* WT und *L.m.* $\Delta clpB$ -a13: Positivkontrolle, *L.m.* $\Delta clpB$ : Negativkontrolle, Mix von a13-Homolog-tragenden Parasiten:  $2 \times 10^6$  pro Stamm, je zwei Mäuse pro Gruppe). Der Infektionsverlauf wurde anhand wöchentlicher Messungen der Fußballen dokumentiert. Die Zunahme der Fußdicke ist in der Abbildung in Abhängigkeit der Zeit nach Infektion aufgetragen.

### 3.2.18 Analyse der reisolierten Cosmide durch Restriktionsverdau

Da die mit den a13-Homolog-transfizierten Parasiten vor der  $\Delta clpB$ -Mutante eine Läsionsentwicklung induzieren, wurden die Füße und Lymphknoten beider Mäuse auf rekombinante Parasiten untersucht. Dazu wurden zunächst die Parasiten aus dem Gewebe reisoliert, *in vitro* zu Promastigoten differenziert, und so lange kultiviert, bis eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung von Cosmid-DNA vorlag. Aufgrund einer Kontamination der Leishmanienkultur wurde der Fußballen der Mix.1-infizierten Maus verworfen. Die isolierte Cosmid-DNA wurde dann in *E. coli* transformiert, und durch DNA-Minipräparationen sowie anschließenden Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI untersucht. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse von 50 Minipräparationen aus den Cosmiden der Parasiten aus Fuß 1 gezeigt.

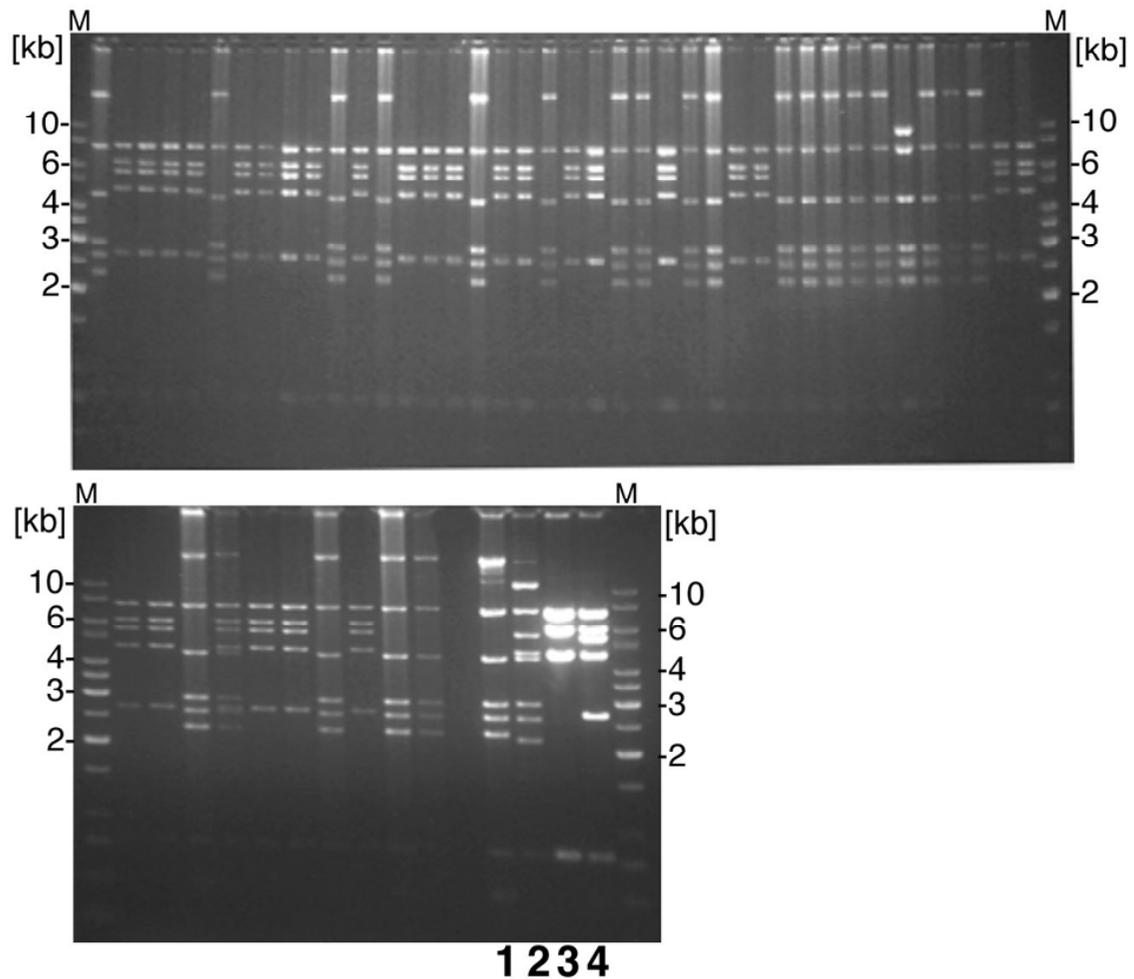
Zu Vergleichszwecken wurde jeweils ein Aliquot der ursprünglich transfizierten Cosmide a13.1-a13.4 ebenfalls einem Restriktionsverdau mit EcoRV und XbaI unterzogen. Die entstandenen Fragmente wurden im Agarosegel mit aufgetrennt.

Die Cosmidanalyse zeigt eindeutig, dass nur zwei Cosmid-Spezies aus den Parasiten reisoliert wurden. Vergleicht man die Fragmentmuster der reisolierten Cosmide mit den Fragmentmustern der Mustercosmide (in Abbildung 43 mit 1, 2, 3 und 4 gekennzeichnet), ergibt sich, dass nur die Cosmide a13.1 und a13.3 reisoliert wurden. Unter Berücksichtigung der schematisierten Cosmide in Abbildung 41 ergibt sich, dass nur diese beiden Cosmide den offenen Leserahmen (ORF) für das 46 kDa Protein tragen. Wäre beispielsweise die Expression des ORF für das 115 kDa Protein relevant, hätte zusätzlich eine Selektion auf das Cosmid a13.2 stattfinden müssen. Dem entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des 46 kDa Protein den entscheidenden kompensatorischen bzw. komplementatorischen Mechanismus darstellt, der der *L.m.* $\Delta clpB$  Mutante wieder Virulenz vermittelt.

Unter Berücksichtigung der reisolierten Cosmide aus den Lymphknoten beider Mäuse wurde insgesamt Cosmid 13.1 zu 74,6 % reisoliert, Cosmid 13.3 zu 22,6 %. Da in keiner einzigen

DNA-Minipräparation eines der beiden anderen homologen Cosmide identifiziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Ergebnis repräsentativ ist, und das 46 kDa Protein für die Aufhebung des avirulenten Phänotyps der  $\Delta$ clpB-Mutante verantwortlich ist.

**Abbildung 43: Restriktionsanalyse der reisolierten Cosmide.** Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes, 0.7%-iges Agarosegel, in dem die Fragmente von 50 EcoRV- und XbaI-behandelten DNA-Minipräparationen (resultierend aus den Parasiten des Fußballens der Mix.1-infizierten Maus) aufgetrennt wurden. Zu Kontrollzwecken wurden die Mustercosmide a13.1-a13.4 ebenfalls EcoRV- und XbaI behandelt, und die resultierenden Fragmente aufgetrennt (Bahnen **1, 2, 3, 4**: a13.3: **1**; a13.4: **2**; a13.2: **3**; a13.1: **4**). DNA-Längenstandards (M) sind jeweils in den ersten und letzten Bahnen eines Gels aufgetrennt worden, und ihre Größen wurden am rechten und linken Bildrand gekennzeichnet (kb).



## 4. Diskussion

### 4.1 Eine kompensatorische $\Delta clpB$ *escape*-Variante verursacht eine Wildtyp-vergleichbare Läsionsentwicklung

Das *Leishmania* HSP100 Homolog wurde als Virulenzfaktor beschrieben. *L. major*  $\Delta clpB$ -Deletionsmutanten, die kein HSP100 exprimieren, zeigen eine stark verzögerte Läsionsbildung bei der Infektion von BALB/c Mäusen. Vermutlich spielt HSP100 dabei eine Rolle in der frühen Phase der Infektion, da eine Differenzierung vom promastigoten- zum amastigoten Stadium bei der *in vitro* Infektion von Makrophagen beeinträchtigt war. (Hübel *et al.*, 1997).

Während einer Mauspassage wurde eine *L.m.*  $\Delta clpB$ - Variante isoliert, die wie der *L. major* WT bereits 4 Wochen nach Inokulation der Parasiten eine Läsionsentwicklung verursachte. Da in wiederholten Mauspassagen mit bis zu vier Mäusen der frühe Beginn der Infektion durch die  $\Delta clpB$  Mutanten dokumentiert werden konnte, kann ein zufälliges Auftreten des modifizierten Infektionsverlaufs (beispielsweise durch einen bereits vorher veränderten Immunstatus der Maus/Mäuse) ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde in Immunblot-Analysen nachgewiesen, dass keine Kontamination der *escape*-Population mit HSP100 exprimierenden Wildtyp-Parasiten vorlag. Daher handelt es sich bei der reisolierten Zellpopulation offenbar um eine „echte“ *escape*-Variante mit gesteigerter Infektiosität gegenüber der  $\Delta clpB$  Deletionsmutante.

In einer Studie von Späth *et al.* (2004) wurde eine *lpg2*-defiziente Mutante von *L. major* beschrieben, die -ursprünglich avirulent- in BALB/c Mäusen wieder eine Läsionsentwicklung induzierte. Da eine Kontamination mit Wildtyp-Parasiten sowie eine wiederhergestellte Fähigkeit zur Synthese von LPG2 ausgeschlossen werden konnte, postulieren die Autoren eine kompensatorische Mutation, welche die fehlende LPG2 Aktivität ausgleicht. In Analogie zu dieser Studie kann bei der von uns isolierten  $\Delta clpB$  *escape*-Population von einem Mechanismus ausgegangen werden, der das Fehlen von ClpB ausgleicht. Dabei handelt es sich vermutlich ebenfalls um einen kompensatorischen Mechanismus, der eine Modulation der Immunantwort beinhaltet (siehe 4.3).

### 4.2 Die Läsionsgröße korreliert nicht mit der Parasitenlast

Eine Infektion mit der *escape*-Population sowie eine Infektion mit dem klonierten *escape*-Stamm 2 führt zu einer Infektion, die einer Wildtypinfektion in verschiedenen Punkten ähnlich ist: Die Fußballenschwellung setzt ca. 4 Wochen nach Inokulation der Parasiten ein, und im Infektionsverlauf ist eine vergleichbare Progression der Fußballenschwellung zu verzeichnen. Die drainierenden Lymphknoten sind nach einer Wildtyp- bzw. einer *escape*-Infektion im Gegensatz zu einer Infektion mit  $\Delta clpB$  Parasiten stark geschwollen.

Im Kontrast zu diesen vergleichbaren Parametern steht eine signifikant reduzierte Parasitenlast in den drainierenden Lymphknoten nach einer Infektion mit der *escape*-Mutante. Damit wurde gezeigt, dass die Läsionsgröße bzw. das Ausmaß der Fußballenschwellung nicht mit der Parasitenlast korrelieren muß, wie es von Hill (1986) gezeigt wurde. Offenbar ist diese Korrelation abhängig von der Immunantwort des Wirtes: In der Studie von Hill (1986) wurde die Infektion von BALB/c Mäusen mit *L. major* untersucht, die üblicherweise in einer Th2-Antwort resultiert. Im Fall der *escape*-Mutante führte wahrscheinlich die Induktion der Th1-Antwort zu einer Eliminierung der meisten Parasiten,

und zumindest die beobachtete Lymphknotenschwellung resultierte nicht aus einer hohen Parasitenlast, sondern aus der verstärkten Einwanderung von Immunzellen.

### **4.3 Infektion mit der *escape*-Variante führt zur Induktion einer Th1-Antwort im BALB/c Modell**

Eine Infektion von BALB/c Mäusen mit *L. major* führt üblicherweise durch eine sehr frühe Produktion von Interleukin 4 (IL 4) zu einer ausgeprägten Polarisierung von CD4+ T- Zellen in Richtung einer Th2-Antwort (Himmelrich *et al.*, 1991; Heinzel *et al.*, 2000). Diese Th2-Zellen verlieren darauf hin ihre Fähigkeit, auf IL12 zu reagieren, und eine Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) zu induzieren (Launois *et al.*, 1997). Weiterhin wurde die Produktion von IL10 durch CD4+ T-Zellen aus *L. major* infizierten BALB/c Mäusen beschrieben, die ebenfalls in einer Inhibierung der IFN $\gamma$ -Produktion resultiert (Heinzel *et al.*, 1991). Dagegen wird eine Induktion der Th1-Antwort unter normalen Umständen in C57BL/6 Mäusen beobachtet, die durch die Produktion von IFN $\gamma$  Makrophagen aktivieren, und so eine Infektion mit *Leishmania major* kontrollieren können.

Die von uns isolierte *escape*-Variante scheint auch in BALB/c Mäusen eine Th1-Antwort zu etablieren, die es den Tieren ermöglicht, die Infektion zu kontrollieren. Dafür sprechen mehrere Beobachtungen:

Der durch die *escape*-Parasiten hervorgerufene Infektionsverlauf ist bezüglich des Beginns mit einer WT-Infektion vergleichbar. Die Läsionsgröße jedoch bleibt immer leicht hinter der WT-induzierten Läsionsgröße zurück. Auch konnte bisher keine Ulzeration der Fußballenschwellungen beobachtet werden.

Untermauert werden diese Daten durch die Analyse der Parasitenlast: diese ist in den *escape*-infizierten Lymphknoten gegenüber den WT-infizierten Lymphknoten erheblich verringert, wie eine *real time* PCR Analyse ergab. Auch die histologische Untersuchung der Lymphknoten bestätigt, dass in *L.m.  $\Delta$ clpB escape* infizierten Lymphknoten nachweislich weniger Parasiten zu finden sind. Begleitet wird diese Reduktion der Parasitenzahl durch eine erhöhte Infiltration von Zellen, die eine starke Vergrößerung des Lymphknotens trotz geringer Parasitenlast hervorrufen.

Die *L.m.  $\Delta$ clpB escape*-Variante kann also offensichtlich vom Immunsystem des Wirtes unter Kontrolle gehalten werden, wie es bei resistenten C57BL/6 Mäusen beschrieben wird, die eine Th1-Antwort entwickeln.

Die Analyse von Zytokinmustern der lymphatischen Organe nach Infektion mit *L.m.  $\Delta$ clpB escape* bestätigt die Vermutung, dass eine Differenzierung der T-Lymphozyten zu Th1-Zellen die Kontrolle der Parasiten verursacht. Üblicherweise ist das Zytokinmuster eine *L. major* infizierten BALB/c Maus von einer dauerhaften Produktion von IL 4 geprägt, wie in einer Zytokin-mRNA Analyse von infizierten BALB/c Mäusen gezeigt wurde (Heinzel *et al.*, 1989). Eine Expression von IFN $\gamma$  dagegen wird in resistenten C57BL/6 Mäusen beobachtet, die eine Th1-Antwort entwickeln (Heinzel *et al.*, 1989). Die hohe Expression von IFN $\gamma$  sowie die verringerte Expression von IL 4 in *L.m.  $\Delta$ clpB escape*-infizierten BALB/c Mäusen sprechen daher eindeutig für eine Induktion der Th1-Antwort.

Makrophagen sind wesentlich an der Kontrolle einer *Leishmania*-Infektion beteiligt, da ihre Aktivierung durch IFN $\gamma$  leishmanizide Mechanismen wie die Expression von iNOS (induzierbare Stickoxid (NO)-Synthase) in Gang setzen kann. Einen weiteren Hinweis für die Induktion einer Th1-Antwort lieferte das Ergebnis des *air pouch* Experiments, in dem eine verstärkte Infiltration von Makrophagen an die Inokulationsstelle 24 Stunden nach Infektion

beobachtet wurde. Allerdings wurde dabei nicht untersucht, ob die erhöhte Produktion von IFN $\gamma$  auch in einer Aktivierung der verstärkt eingewanderten Makrophagen resultierte. Während die Infiltration der Makrophagen bereits nach 24 Stunden beobachtet wurde, wurde die Analyse des Zytokinmusters erst 6 Tage nach Infektion vorgenommen. Von Reiner *et al.* (1994) wurde jedoch bereits beschrieben, dass während der ersten 4 Tage nach Infektion ein Anstieg an IFN $\gamma$  mRNA in BALB/c Mäusen zu verzeichnen war, während der IL 4 mRNA Gehalt während dieser Zeit konstant blieb. Daher ist zu vermuten, dass die erhöhte Zahl eingewanderter Makrophagen durch IFN $\gamma$  aktiviert wurde, und so zu einer Eliminierung der Parasiten führte.

Charakteristisch für eine Th2-Antwort ist neben anderen Aspekten die Aktivierung der humoralen Immunantwort durch die Stimulierung von Antikörper-sezernierenden B-Zellen. Die Anfälligkeit von BALB/c Mäusen bei Induktion der Th2-Antwort beruht u.a. auf der Tatsache, dass intrazelluläre Parasiten wie Leishmanien nicht für die Markierung durch Antikörper und anschließende Aufnahme durch phagozytierende Zellen zugänglich sind. Charakteristisch für eine Th2-Antwort ist die Expression von IgG1 und IgE (Ig: Immunglobulin).

Die Th1-Antwort dagegen zeichnet sich durch eine verstärkte zelluläre Immunantwort und durch einen *switch* in der Expression der Immunglobulin Subtypen aus, so dass bei der Polarisierung Richtung Th1 hauptsächlich Ig-Isotypen produziert werden, die Komplementkomponenten fixieren können.

Die Analyse von aufgereinigten Antiseren aus BALB/c Mäusen, die mit *L. major* WT bzw. *L.m.  $\Delta$ clpB escape* infiziert waren, deutet dabei auf eine modifizierte humorale Antwort in den *escape*-infizierten Mäusen hin, da im Immunblot nach Hybridisierung mit dem Antiserum aus der *escape*-infizierten Maus insgesamt weniger Antigen erkannt wurde. Da der Sekundärantikörper lediglich gegen eine definierte Ig-Subklasse gerichtet war, spricht dieses Ergebnis für die Expression unterschiedlicher Ig-Subklassen in WT- bzw. *escape*-infizierten Mäusen. Auch diese Beobachtung untermauert die Vermutung, dass die *escape*-Population eine Th1-Antwort in BALB/c Mäusen induziert. Um eine genauere Aussage über diesen *switch* in der Expression der Immunglobulin-Subklassen zu erhalten, müsste untersucht werden, welche Subtypen im Serum der WT- bzw. *escape* infizierten Mäuse nachzuweisen sind.

#### **4.4 Die modifizierte Immunantwort beruht nicht auf einer variierten kostimulatorischen Aktivität**

In einer ruhenden T-Zelle wird nur ein Rezeptor für IL 2 mit geringer Affinität für IL 2 exprimiert. Dieser kann IL 2 nur dann binden, wenn es hoch konzentriert vorliegt. Ein Kontakt zwischen dem prozessierten Antigen einer APZ und einer CD4+ T-Zelle löst bei gleichzeitiger Kostimulation des T-Zell-CD28 Rezeptors durch das Molekül B7.1 oder B7.2 (B.7) auf der APZ eine stark induzierte Expression der fehlenden Untereinheit des IL 2 Rezeptors (CD25) sowie eine erhöhte IL 2 mRNA Stabilität aus (Janeway, „Immunologie“, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002). Die Expression der IL 2-Rezeptor-Untereinheit CD25 kann also als Maß für die Stimulation einer T-Zelle durch das kostimulatorische Molekül B7 gesehen werden.

Die FACS-Analyse von isolierten Lymphknoten-T-Zellpopulationen zeigte jedoch, dass der Anteil von CD25+ Zellen unter den CD4+ Zellen 6 Tage nach Infektion nicht signifikant zwischen den *L. major* WT- und den *L.m.  $\Delta$ clpB escape*-infizierten Lymphknoten variierte. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass eine Infektion mit der *escape*-Mutante nicht

in eine erhöhte Aktivierung der CD4+ T-Zellpopulation resultiert. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass möglicherweise eine erhöhte Aktivierung nicht nachgewiesen werden konnte, da aktivierte T-Zellen bereits aus dem Lymphknoten in das infizierte Gewebe ausgewandert sein könnten, und nicht mehr im Lymphknoten nachweisbar waren.

Für die effiziente Aktivierung einer T-Zelle ist neben der Präsentation von prozessiertem Antigen durch einen MHC-Komplex auch die Kostimulation des T-Zell-Moleküls CD28 durch das APZ-Oberflächenmolekül B7 (B7.1 oder B7.2) notwendig.

In *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte durch Blockierung von B7.1 bzw. B7.2 nachgewiesen werden, dass nach einer *Leishmania major*-Infektion das Molekül B7.2 für die frühe Expression von IFN $\gamma$  in resistenten C3H-Mäusen bzw. für die IL 4-Produktion in anfälligen BALB/c-Mäusen verantwortlich ist. Das in geringerem Maße exprimierte B7.1 scheint dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen, obwohl es in Abwesenheit von B7.2 seine Rolle übernehmen kann (Elloso und Scott, 1999). Eine Blockierung von CD86 (entspricht B7.2) führte zu einer verringerten IL 4-Produktion und damit einhergehend zu einer Kontrolle der Infektion in BALB/c Mäusen (Elloso und Scott, 1999; Brown *et al.*, 1996). Demnach scheint das Molekül B7.2 auf der Oberfläche von Makrophagen bei der Induktion der Th2-Antwort in BALB/c Mäusen durch das Einleiten der IL4 Expression eine erhebliche Rolle zu spielen.

In unserer Untersuchung des Oberflächenmarkers CD86 (entspricht B7.2) auf dendritischen Zellen konnte keine differentielle Expression und damit keine differentielle Induktion der Reifung nach einer Stimulierung mit verschiedenen *Leishmania*-Stämmen beobachtet werden (*L.m. WT*, *L.m.  $\Delta$ C1pB*, *L.m.  $\Delta$ C1pB escape 1* und *-2*). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die verringerte Produktion von IL 4 nach Infektion mit der *escape*-Population auf eine geringere Expression von B7.2 durch *escape 1* oder *-2* zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine gleiche Stimulierung der T-Zellen durch alle untersuchten *Leishmania*-Stämme hin, und werden von der Beobachtung untermauert, dass eine Stimulierung dendritischer Zellen mit den verschiedenen *Leishmania*-Stämmen zu keiner Veränderung der B7.2 Expression gegenüber den naiven, unstimulierten DCs führte.

Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu einer Studie von Frosch *et al.* (1997), in der gezeigt wurde, dass eine spezifische verstärkte Expression von B7.2 auf der Oberfläche isolierter Makrophagen zu verzeichnen war, wenn diese mit *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), infiziert waren. Die infizierten Makrophagen stimulierten *in vitro* klonierte Th1-Zellen in gleichem Maße wie klonierte Th2-Zellen. Demnach zeigt diese Studie, dass die Kostimulation durch das Molekül B7.2 nicht entscheidend für die Ausprägung einer Th1- oder Th2-Antwort zu sein scheint, sondern lediglich die Proliferation der (bereits vorstimulierten) T-Zellen stimuliert. Mögliche Gründe für die unterschiedliche Induktion der B7.2 Expression nach Infektion mit *T. cruzi* bzw. *L. major* könnten in der Art der untersuchten Zellen liegen: möglicherweise reagieren DCs mit ihrer B7.2 Expression anders auf eine Infektion mit *Leishmania* als Makrophagen. Weiterhin kann trotz der nahen Verwandtschaft von *T. cruzi* und *L. major* ein parasitenspezifischer Faktor den Unterschied in der B7.2 Expression ausmachen. Beispielsweise wurde bereits für *L. donovani* gezeigt, dass eine Infektion von BALB/c Makrophagen in verringerter Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 resultiert (Kaye *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1995). Um den Einfluß einer veränderten kostimulatorischen Aktivität auszuschließen, müssten die Versuche mit Makrophagen wiederholt werden.

#### 4.5 Die *L.m. ΔclpB escape*-Population besteht aus verschiedenen Einzelklonen mit unterschiedlicher Infektiosität

Die Klonierung der *escape*-Population führte zur Etablierung der Einzelklone *L.m. ΔclpB escape* 1, -2 und -3, die neben morphologischen Unterschieden verschiedene Infektiositätsprofile zeigen.

Die Analyse der *in vitro* Infektionsstudien zeigt, dass *L.m. ΔclpB escape* 1 erfolgreich in isolierten Makrophagen persistieren und replizieren kann. In *in vivo* Infektionsstudien dagegen ist dieser Stamm avirulent, einhergehend mit einer Beobachtung aus der Zytokinanalyse, dass *L.m. ΔclpB escape* 1 für die erhöhte Produktion von IFN $\gamma$  (nicht gezeigt) und damit für die Auslösung der Th1-Antwort verantwortlich ist. Eine Untermauerung der Daten erfolgte durch die Analyse der IL 12 Sezernierung dendritischer Zellen nach einer Stimulierung mit *Leishmania* Antigenen. Hier führte die Inkubation der dendritischen Zellen mit *escape* 1 zu einer erhöhten Produktion des Th1-induzierenden Zytokins IL 12. Demnach ist offensichtlich dieser Stamm für die Induktion der Th1-Antwort in BALB/c Mäusen verantwortlich, obwohl er erfolgreich in Makrophagen persistieren und replizieren kann. Die Fähigkeit, erfolgreich isolierte Makrophagen zu parasitieren wird also vom *escape* 1-Stamm mit der Auslösung der Th1-Antwort „bezahlt“.

*L.m. ΔclpB escape* 2 zeigt eine geringe Fähigkeit, sich in Makrophagen zu etablieren. Im Gegensatz dazu ist dieser Stamm als einziger dazu fähig, eine Mauspassage zu überleben, und eine Läsionsentwicklung zu induzieren. Damit im Einklang steht die verminderte Sezernierung von IL 12 dendritischer Zellen nach einer Stimulation mit *Leishmania* Antigenen, d.h. eine Beeinflussung der Differenzierung in Richtung Th2. Vermutlich deshalb kann allein dieser Stamm eine Infektion in BALB/c Mäusen etablieren, die mit einem WT-induzierten Infektionsverlauf vergleichbar ist. Dabei ist zu vermuten, dass die Replikation der Parasiten in anderen Wirtszellen als Makrophagen erfolgt. Diesbezüglich wurde von Laufs *et al.* (2002) postuliert, dass auch neutrophile Genulozyten als Wirtszellen für Leishmanien dienen.

Der dritte klonierte *escape*-Stamm zeigt ein ähnliches Infektionsprofil wie der Stamm *L.m. ΔclpB escape* 1. Daher ist zu vermuten, dass dieser Stamm einen ähnlichen oder denselben Mechanismus entwickelt hat, um das Fehlen von ClpB zu kompensieren. Da dieser Stamm jedoch während einer Mauspassage verloren gegangen ist, und nicht wieder aus den Organen der Maus reisoliert werden konnte, wurde der Stamm in die Untersuchungen bezüglich der IL 12 Sezernierung dendritischer Zellen nicht mehr mit einbezogen.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sich in einer Population avirulenter Parasiten, die alle auf einen Ursprungsklon zurückzuführen sind, verschiedene Mechanismen entwickeln können, den avirulenten Phänotyp zu überbrücken. Dabei war in diesem Fall zu beobachten, dass die Strategie der Klone *escap*- 1 und -3 nicht geeignet war, um ein eigenständiges Überleben im Wirt zu gewährleisten, da von ihnen eine Th1-Antwort ausgelöst wurde, die zur Kontrolle der Infektion führt. *L.m. ΔclpB escape* 2 dagegen zeigte eine erhöhte Proliferationsfähigkeit im Wirt, wie anhand der erhöhten Parasitenlasten gegenüber der *escape*-Mutante 1 und 3 festgestellt wurde. Offensichtlich ist Klon 2 derjenige, der eine Infektion etablieren kann, während die Klone 1 und 3 persistieren konnten, und so in der Mischpopulation mitisoliert wurden. Eine Persistenz konnte für Klon 1 bestätigt werden, denn obwohl keine Läsionsbildung zu verzeichnen war, konnten Parasiten aus dem kultivierten Fussballen isoliert werden. Eine solche Persistenz von *Leishmania*- Parasiten wurde bereits von Späth *et al.* (2003) beschrieben. In dieser Studie wurde gezeigt, dass LPG2-defiziente Parasiten keine Läsionsbildung verursachten, aber bis zu 759 Tagen in der BALB/c Maus

persistierten. Von Bogdan *et al.* (2000) wurde nachgewiesen, dass Haut- oder Lymphknotenfibroblasten als sogenannte *safe targets* für die Parasiten in Frage kommen können.

#### **4.6 Verstärkte Expression von PFR- Protein führt nicht zu einer Stimulierung von dendritischen Zellen oder zur Aktivierung von Makrophagen**

Die von uns isolierte *escape*-Population induzierte in T-Lymphozyten aus Milz- und Lymphknoten eine erhöhte Produktion von IFN $\gamma$  sowie eine abgeschwächte Produktion von IL 4, was charakteristisch für eine Verschiebung der T-Zell-abhängigen Immunantwort von Th2 zu Th1 ist.

In einem Giemsa-gefärbten Zellausstrich wurden bei der *escape*-Population signifikant längere Flagellen beobachtet, und eine vergleichende 2D Gelelektrophorese bestätigte die Überexpression von PFR-Proteinen. Ein Zusammenhang zwischen den verlängerten Geißeln und der Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts zugunsten einer Th1-Antwort konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In der Rückschau ist dieses Ergebnis erklärbar und das Postulat „PFR induziert Th1“ hinfällig, da aus der *escape*-Population im Verlauf späterer Experimente verschiedene Einzelklone herangezogen wurden, von denen nachweislich *L.m.  $\Delta$ clpB escape 1* die Th1-Antwort induzierte, welcher im Gegensatz zu *L.m.  $\Delta$ clpB escape 2* eine normale Flagellenlänge aufwies. Im Folgenden sollen dennoch die Ergebnisse der Untersuchungen zur PFR-Überexpression angesprochen werden, um den Einfluss des verstärkt exprimierten PFR-Proteins auf verschiedene Parameter des Immunsystems zu diskutieren.

Der Einfluss von PFR-Proteinen bei der Aktivierung der zellulären Immunantwort wurde bereits am *T. cruzi*-Infektionsmodell beschrieben. In einer Studie von Luhrs *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass durch Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit rekombinant exprimierten PFR-Proteinen eine protektive Th1-Antwort induziert werden konnte. In dieser Studie wurde der Einfluss von PFR-Protein auf T-Zellen aus Milz- und Lymphknoten von mit PFR-Protein-immunisierten Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese T-Zellen nach einer Immunisierung mit PFR-Protein IFN $\gamma$  exprimierten, und damit eine Aktivierung von Makrophagen induzierten. Diese konnten daraufhin die intrazellulären Parasiten durch vermehrte NO-Produktion eliminieren.

Eine Inkubation mit Zelllysaten von PFR1d-überexprimierenden Parasiten führte zu keiner nachweisbaren Aktivierung von dendritischen Zellen in Bezug auf ihre IL12 Sekretion und auf die Expression des Oberflächenmarkers CD86. Ein Einfluss von pfr1d auf diese Parameter kann folglich ausgeschlossen werden. Der direkte Einfluss von PFR-überexprimierenden Parasiten auf die Zytokinproduktion von T-Zellen wurde von unserer Seite nicht untersucht. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass eine erhöhte Expression von PFR-Protein wie in *T. cruzi* einen Einfluss auf diese Zellpopulation hat.

Die Ergebnisse einer nicht gezeigten *air pouch* Analyse besagen, dass 24 Stunden nach Inokulation der pfr- Überexprimierer in den *Air Pouch* weder signifikant mehr Makrophagen noch T-Zellen eingewandert waren als bei der Inokulation von Kontrollzellen. Folglich kann eine vermehrte Aktivierung von T-Zellen und/oder Makrophagen durch überexprimiertes PFR-Protein ebenfalls ausgeschlossen werden. Offensichtlich ist die Überexpression dieses Proteins nach diesen Ergebnissen nicht an der Induzierung der Th1-Antwort beteiligt, was durch spätere Untersuchungen mit den *escape*-Einzelklonen bestätigt werden konnte.

Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Studien von Luhrs *et al.* mit rekombinanten Protein durchgeführt wurde, das zunächst zur Immunisierung eingesetzt wurde, bevor die immunisierten Tiere mit *T. cruzi* infiziert wurden. In *Leishmania* werden möglicherweise überexprimierte PFR-Proteine ungebraucht in der Zelle eingelagert, da für eine erfolgreiche Verlängerung der Geißel ebenfalls die übrigen Komponenten überexprimiert werden müssten. Möglicherweise weisen die rekombinanten Leishmanien zwar einen erhöhten Gehalt an PFR-Protein auf; jedoch konnte nicht nachgewiesen werden, dass diese dem Immunsystem des Wirtes zugänglich sind.

Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, dass eine rekombinante Expression von PFR-Proteinen in *E. coli* von unserer Seite erwogen wurde. Da jedoch eine äußerst sorgfältige (praktisch unmögliche) Aufreinigung der rekombinanten Proteine nötig ist, um LPS-Kontaminationen zu vermeiden, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Geringste Spuren von bakteriellen LPS können eine Immunantwort stark induzieren, so dass eine Unterscheidung des Einflusses von PFR-Protein bzw. LPS unmöglich werden kann.

#### 4.7 Ergänzung des $\Delta clpB$ Phänotyps durch funktionelle Komplementation

##### 4.7.1 Herstellung einer vollständigen und heterogenen Cosmid-Genbank

Die funktionelle Komplementation bietet sich als *forward genetics*-Ansatz an, um Gene zu identifizieren, die einen Deletionsphänotyp komplementieren bzw. kompensieren können. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass im Gegensatz zur reversen Genetik nichts über die zu untersuchenden Gene bekannt sein muss. Auf diese Weise wurden bereits mehrere Gene identifiziert, die an der Synthese von LPG beteiligt sind (Ryan *et al.*, 1993b; Beverley und Turco, 1995; Descoteaux *et al.*, 2002). Das *Leishmania* Genomprojekt bietet mit der fortschreitenden Annotierung von Genen die Möglichkeit, isolierte Gene zu identifizieren, zu charakterisieren, und ihren Beitrag an der Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps zu untersuchen.

Die Isolierung und Charakterisierung der *escape*-Population führte bislang nicht zur Identifizierung Parasiten-spezifischer Faktoren, die zur Induktion der Th1-Immunantwort und zur Überbrückung des  $\Delta clpB$  Phänotyps geführt haben. Da es sich bei der *escape*- Variante um eine spontane Variation handelt, die aufgrund der ihr zur Verfügung stehenden Gene eine Möglichkeit zu Proliferation entwickelt haben musste, sollte mit Hilfe der funktionellen Komplementation untersucht werden, ob eine verstärkte Expression definierter Gene zur Wiedererlangung der Proliferationsfähigkeit der  $\Delta clpB$  Mutante im Tiermodell führen kann. Dazu sollte zunächst die  $\Delta clpB$  Mutante mit einer Cosmidbank aus genomischer DNA der  $\Delta clpB$  Mutante transfiziert werden. Anschließend sollte in *in vivo* Studien im BALB/c Modell untersucht werden, ob die Expression definierter Cosmide in amastigoten Zellen zu einem *rescue* des  $\Delta clpB$  Phänotyps führen kann. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Überexpression definierter Gene auch in promastigoten  $\Delta clpB$  Zellen einen Selektionsvorteil verschafft.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Cosmid-Genbank aus genomischer DNA der  $\Delta clpB$  Deletionsmutante hergestellt. Der Restriktionsverdau mit Sau3AI lieferte Fragmente der gewünschten Größenordnung, die daraufhin in den Cosmid *shuttle* Vektor pCosTL kloniert wurden. Dieser Vektor lässt sich mit unveränderter Sequenz wieder aus den Parasiten reisolieren, was für die Sequenzanalyse sowie für die Identifizierung von Genen unerlässlich ist (Kelly *et al.*, 1994).

Von Ryan *et al.* (1993a) wird postuliert, dass eine Scherung der DNA für die Erstellung einer Cosmidbank von Vorteil sei, da nach einem Partial-Restriktionsverdauen telomere Sequenzen unterrepräsentiert sein könnten. Da jedoch in *Leishmania* bisher keine Hinweise auf codierende Sequenzen im Telomerbereich vorliegen, wurde aufgrund der höheren Klonierungseffizienz ein Partialverdau mit Sau3AI bevorzugt.

Die Restriktionsanalyse der Cosmidbank-DNA ergab, dass keine Sequenzen genomischer DNA bevorzugt auftraten, und die Heterogenität der Bank somit gegeben war. Bei der durchschnittlichen Verpackungseffizienz von  $1,85 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g DNA ist das *Leishmania*-Genom ca. 39-fach in der Bank vertreten. Die Cosmid-Genbank schien demnach vollständig und heterogen zu sein.

Die durchschnittliche Insertgröße der einzelnen Cosmide der Bank betrug ca. 35 kb, so dass unter Berücksichtigung der Größe des *Leishmania*-Genoms ( $3,6 \times 10^7$  bp) nach der Poisson'schen Verteilung 4736 Klone für die vollständige Repräsentierung notwendig waren. Die Genbank wurde nach einem Transfektionsprotokoll von Kapler *et al.* (1990) in die Leishmanien eingebracht. In dieser Studie wurde eine Transfektionseffizienz von  $2,8 \times 10^{-5}$  beobachtet, d.h. unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA Menge ergaben sich 62 Transfektanden pro  $\mu$ g DNA. Bei einer eingesetzten Menge von 50  $\mu$ g DNA bei der Transfektion mit der Cosmid-Genbank würde sich damit bei linearer Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der eingesetzten DNA Menge eine Zahl von 3100 rekombinanten Zellen pro Ansatz ergeben. Bei 4 unabhängigen Transfektionsansätzen wäre unter Berücksichtigung der Poisson Verteilung das *Leishmania*-Genom 2,6-fach repräsentiert.

Von Ryan *et al.* (1993a) wird eine ähnliche Transfektionseffizienz beschrieben: bei Transfektionen von 40  $\mu$ g DNA werden im Durchschnitt 41 rekombinante Zellen pro  $\mu$ g DNA erhalten. Bei einer eingesetzten Menge von 50  $\mu$ g DNA würden demnach 2,3 Ansätze zur vollständigen Repräsentierung des *Leishmania*-Genoms ausreichen.

Im Gegensatz zur Studie von Kapler *et al.* (1990) und Ryan *et al.* (1993a) erreichten Kelly *et al.* (1994) bei der Transfektion eines pCosTL Konstruktes lediglich eine sehr geringe Transfektionseffizienz von  $4 \times 10^{-6}$  / $\mu$ g DNA. Das würde bei einer Transfektion von 50  $\mu$ g DNA zu  $2 \times 10^{-4}$  rekombinanten Zellen führen, so dass über 2 Millionen Ansätze zur vollständigen Repräsentierung des *Leishmania*-Genoms nötig wären. Diese äußerst geringe Transfektionseffizienz ist möglicherweise auf ein unterschiedliches Transfektionsprotokoll zurückzuführen, und wurde deshalb bei unserer Berechnung nicht weiter berücksichtigt.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Dr. K. Mellenthin ergab 10 rekombinante Transfektanden pro  $\mu$ g DNA, d.h. 500 Cosmid-tragende Zellen pro Transfektionsansatz (Dissertation K. Mellenthin, 2003, Universität Hamburg). Sollte die Transfektion der  $\Delta$ *clpB* Cosmidbank in *L.m. \Delta**clpB* mit einer vergleichbaren Effizienz erfolgt sein, wären damit ca. 9,5 Ansätze notwendig gewesen, um das *Leishmania*-Genom nach der Poisson'schen Verteilung vollständig zu repräsentieren. Mit nur 4 Ansätzen wäre das Genom demnach bestenfalls zur Hälfte repräsentiert.

Da die Transfektionseffizienz bei der Einbringung der  $\Delta$ *clpB* Cosmidgenbank in *L.m. \Delta**clpB* nicht bestimmt wurde, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob das *Leishmania*-Genom vollständig repräsentiert wurde.

#### **4.7.2 Cosmid-transfizierte $\Delta$ *clpB* Parasiten zeigen eine erhöhte Virulenz in der BALB/c Maus im Vergleich zu untransfizierten Zellen**

In *L. donovani* scheint ClpB eine Rolle bei der erfolgreichen Stadiendifferenzierung zur Amastigote, sowie bei der Parasitierung von Makrophagen zu spielen (Krobitsch *et al.*, 1998,

Krobitch *et al.*, 1999).  $\Delta clpB$  Deletionsmutanten von *L. major* zeigen ebenfalls eine stark herabgesetzte Fähigkeit zur Parasitierung von Makrophagen sowie eine stark verzögerte oder fehlende Läsionsbildung bei der Infektion von BALB/c Mäusen (Hübel *et al.*, 1997). Dieser Effekt war eindeutig auf das Fehlen von HSP100 zurückzuführen, da eine Komplementation mit einem ClpB codierenden Plasmid wieder zur Infektiosität der  $\Delta clpB$  Parasiten im BALB/c Modell führte (Hübel *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob die Expression definierter Gene auf den transfizierten Cosmiden den avirulenten Phänotyp der  $\Delta clpB$  Mutanten komplementieren können, wurde daher eine Selektion auf virulente Parasiten nach einer Infektion von BALB/c Mäusen durchgeführt.

Bereits während der ersten Mauspassage konnte eine Läsionsentwicklung durch die Cosmid-transfizierten  $\Delta clpB$  Mutanten beobachtet werden. Da die  $\Delta clpB$  Parasiten während des Beobachtungszeitraums avirulent blieben, kann davon ausgegangen werden, dass eine funktionelle Komplementierung bzw. eine Kompensation des  $\Delta clpB$  Phänotyps in den Cosmid-transfizierten Parasiten gegeben war. Dabei war eine zeitliche Verzögerung von 5-8 Wochen bezüglich des Beginns der Fußballenschwellung gegenüber der Wildtyp-infizierten Maus zu verzeichnen. Diese verzögerte Läsionsbildung ist möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen, dass bei einer Inokulationsdosis von  $1 \times 10^7$  Parasiten und einer zur Abdeckung des Genoms notwendigen Zahl von 4736 Cosmiden jedes individuelle Cosmid rechnerisch nur ca. 2100 mal ( $2,1 \times 10^3$ ) in dem Parasitengemisch vertreten war. Damit ist die Zahl der potentiell virulenten Parasiten ca. 4800-fach geringer als im Wildtyp- Inokulat.

Eine weitere Möglichkeit des verzögerten Infektionsbeginns liegt in der Bedeutung der Genkopienzahl für die regulierte Funktion eines Genprodukts. Bei *clpB* handelt es sich um ein *single copy*-Gen. Die Deletion der beiden ClpB Allele in *L. major* führte in Mausinfektionsexperimenten zu einem avirulenten Phänotyp. Das Wiedereinbringen einer Genkopie von *clpB* auf einem in mehr als einer Kopienzahl vorliegenden Episom führte zwar zur Wiederherstellung der Virulenz, jedoch zeigten diese Parasiten in Mausinfektionsstudien einen intermediären Infektionsverlauf (Hübel *et al.*, 1997). Da bereits postuliert wurde, dass beispielsweise die Expression von LPG-Synthese Komponenten von einem Episomen möglicherweise nicht ausreichend reguliert wird (Ryan *et al.* 1993b, de Lafaille *et al.*, 1992), kann ein Gen-Dosis Effekt die leicht verspätete Läsionsentwicklung der Cosmid-transfizierten  $\Delta clpB$  Parasiten verursacht haben.

#### 4.7.3 *in vivo* Selektionsrunden führen zur Selektion auf definierte Cosmidtypen

Während der ersten *in vivo* Selektionsrunde wurden in vier verschiedenen Mäusen insgesamt 20 unterschiedliche Cosmide isoliert. Eine Analyse der charakteristischen Cosmidfragmente in einer Feldinversionsgelelektrophorese sowie Sequenzanalysen mit Hilfe der *Leishmania Gene Database* zeigte, dass es sich bei den prominenten Cosmidtypen nicht um Cosmide mit überlappender Sequenz handelte. Folglich waren alle isolierten Cosmide unabhängig voneinander, und codierten für vollkommen verschiedene Genloci. Diese unerwartet hohe Anzahl von Cosmiden führt zunächst zu vier möglichen Schlussfolgerungen:

Möglicherweise handelt es sich bei der Selektion auf die isolierten Cosmide um unspezifische Effekte, d.h., es ist kein Gen in der Bank vorhanden, das den Verlust von ClpB kompensieren oder komplementieren kann. Dabei besteht wiederum die Möglichkeit, dass kein Gen den Verlust von ClpB ausgleichen kann, oder dass dieses

potenziell komplementierende bzw. kompensierende Gen wegen einer zu geringen Transfektionseffizienz nicht in die Leishmanien transfiziert wurde.

Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass bereits nach der Transfektion während der *in vitro* Selektion auf Neomycin-resistente Zellen eine Selektion auf definierte Cosmide stattgefunden hat. Beispielsweise wurde von Hoyer *et al.* (2004) die Identifizierung eines Gens von *L. donovani* beschrieben, dass für ein schnelleres Anwachsen aus der Stationärphase oder nach Serummangel verantwortlich zu sein scheint. Da in der *Leishmania Gene Database* das Vorhandensein eines *L. major* Homologs dieses Gens postuliert wird, ist es wahrscheinlich, dass dieses Gen bei Vollständigkeit der Bank und bei einer ausreichender Transfektionseffizienz auch in *L.m. ΔclpB* transfiziert wurde. Während der ca. 10 Tage dauernden Selektion auf rekombinante Zellen können sich also bereits Parasiten durchgesetzt haben, die Zellzyklus-regulierende Gene auf den transfizierten Cosmiden tragen. Diese Möglichkeit wurde jedoch in Kauf genommen, da der Transfektionsansatz direkt nach der Transfektion üblicherweise große Mengen von Zelltrümmern enthält, die bei einer sofortigen Inokulation des Transfektionsansatzes in die Versuchstiere eine überproportionale Immunantwort ausgelöst hätte. Damit wäre der Infektionsverlauf nicht mehr mit dem Wildtyp- bzw. *L.m. ΔclpB* induzierten Infektionsverlauf vergleichbar gewesen.

Die zweite Möglichkeit zieht in Betracht, dass es sich bei den identifizierten Cosmiden um solche handelt, die nicht für Gene codieren, welche ClpB in seiner Funktion ersetzen, sondern für Gene, die als Reaktion auf das Vorhandensein oder Fehlen von ClpB exprimiert werden. Von Wiesgigl und Clos (2001) wurde postuliert, dass HSP90 ein Protein ist, dessen freie Verfügbarkeit das promastigote Stadium von *L. donovani* aufrecht erhält. Bei einer chemischen Inhibierung von HSP90 wird dem freien Pool der Zelle HSP90 entzogen, und die Parasiten differenzieren in ein Amastigoten-vergleichbares Stadium. Ein Gegenspieler von HSP90 scheint HSP100 zu sein, dessen Expression das Amastigoten-Stadium stabilisiert, da in *ΔclpB* Mutanten die Redifferenzierung von der Amastigote zur Promastigote signifikant schneller erfolgt als in Wildtyp Zellen (Krobitsch *et al.* 1999). Wird folglich in der *ΔclpB* Mutante das Promastigoten-Stadium durch das Fehlen von HSP100 aufrecht erhalten, kann möglicherweise die verstärkte Expression Amastigoten-spezifischer Proteine die vollständige Differenzierung zur Amastigote einleiten. Für *L. donovani* wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von ClpB in einer deutlich reduzierten Expression der Amastigoten-spezifischen A2-Proteine resultierte (Krobitsch *et al.*, 1998). Möglicherweise werden in *L. major* andere Amastigoten-spezifische Virulenzfaktoren exprimiert, deren Überexpression die vollständige Differenzierung zum amastigoten Stadium unterstützt. Die Überbrückung des *ΔclpB* Phänotyps könnte folglich auch durch die Expression von Genen ermöglicht werden, deren Genprodukte die Funktion von ClpB weder komplementieren noch kompensieren (also nicht gleiche Funktion durch anderes Protein), sondern eine Kompensation durch einen anderen Mechanismus auslösen.

Ein weiterer Grund für die Selektion auf 20 verschiedene Cosmidtypen könnte darin liegen, dass eine „echte“ Komplementation bzw. Kompensation durch wenige Cosmide stattgefunden hat, und diese Parasiten weitere rekombinante Parasiten die Möglichkeit geben, vom Immunsystem unentdeckt zu persistieren. Einen Hinweis darauf liefert die Beobachtung, dass einige Cosmide einen großen Prozentsatz der reisolierten Cosmide

stellen („echte“ Komplementation oder Kompensation), während andere mit einem sehr geringen Prozentsatz vertreten waren („Mitläufer“). Ein solcher Mechanismus wurde bereits bei der *in vivo* Infektionsstudie mit den *escape*-Stämmen 1-3 beobachtet: Nach einer Infektion von BALB/c Mäusen mit der *escape*-Mischpopulation konnte eine Zellpopulation reisoliert werden, die die Einzelklone *L.m. ΔclpB escape* 1-3 enthielt. Von diesen war jedoch nur Klon 2 in der BALB/c Maus zu einer Läsionsbildung in der Lage, während die Klone 1 und 3 einen avirulenten Phänotyp zeigten, und *L.m. ΔclpB escape* 3 offenbar auch nicht persistierte.

Die vierte Interpretationsmöglichkeit zieht einen additiven Effekt in Betracht. Dabei wird davon ausgegangen, dass das Fehlen von ClpB möglicherweise durch das Zusammenspiel mehrerer verstärkt exprimierter Komponenten überbrückt werden kann, die auf verschiedenen Cosmiden codiert werden. Für ClpB wurde bereits gezeigt, dass eine Expression von ClpB, die nicht dem Wildtyp Ausmaß entsprach, einen nachteiligen Effekt auf die Virulenz hatte (Hübel *et al.*, 1997). Auch die Überexpression von HSP70 erwies sich als unvorteilhaft für die Parasiten (S. Krobtsch, unveröffentlicht). Möglicherweise ist es also notwendig, dass alle Komponenten einer Reaktionsweges überexprimiert werden, so dass eine Homeostase der einzelnen Komponenten gegeben ist.

Nachfolgend sind alle dominanten Cosmide (mit zweistelliger Prozentzahl vertreten) aus der *in vivo* und *in vitro* Selektion einzeln in *L.m. ΔclpB* transfiziert worden (a1=p3, a2=p1, a5, a12, a13, a20, p2, p4, p5), und ein Gemisch aus den rekombinanten Parasiten wurde in weitere kompetitive Selektionsrunden eingesetzt. Dabei konnte die Zahl der reisolierten Cosmide in *in vivo* Selektionen weiter eingengt werden (auf: a1=p3, a2=p1, a5, a13, a20, p2 und p4), jedoch wurden immer mehrere Cosmidtypen aus den Parasiten der Organe (Fuß und Lymphknoten) einer Maus isoliert. Dabei wurden die Cosmide a1=p3 und a2=p1 sowie a5, p2 und p4 nur zu einem geringen Prozentsatz identifiziert. Damit wurde unter Berücksichtigung der *in vitro* Selektionsversuche eine Rolle dieser Cosmide bei der Überbrückung des *ΔclpB* Phänotyps ausgeschlossen. Da allein das Cosmid a13 in den reisolierten Parasiten aus 4 von 5 Mäusen zu finden war, sollte dieses einer genaueren Analyse unterzogen werden (s.u.).

#### 4.7.4 Cosmide vermitteln auch einen Vorteil bei der *in vitro* Infektion von Makrophagen

Im BALB/c Mausmodell können üblicherweise avirulente Parasiten persistieren. Späth *et al.* (2003) konnten nachweisen, dass Parasiten einer Deletionsmutante keine Läsionsentwicklung mehr verursachten, aber bis zu 759 Tagen nach Infektion noch im Wirt nachweisbar waren. Bogdan *et al.* (2000) postulierten, dass auch Fibroblasten als sogenannte *safe targets* für eine latente Leishmaniose sein können. Da jedoch auch in *in vitro* Infektionsexperimenten mit isolierten Makrophagen nachgewiesen werden konnte, dass *L.m. ΔclpB* a13-, p2 und p4 eine Virulenzsteigerung gegenüber der *ΔclpB* Deletionsmutante verzeichnen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Selektion dieser Cosmide (a13, p2 und p4) nicht um unspezifische Effekte handelte, die eine Persistenz der Parasiten in *safe targets* vermitteln. Weiterhin konnte durch diese Experimente ausgeschlossen werden, dass ein additiver Effekt für die Selektion mehrerer Cosmidtypen in den *in vivo* Selektionsrunden verantwortlich war. Da jedoch als Marker für eine funktionelle Komplementation bzw. Kompensation des *ΔclpB* Phänotyps eine wiederhergestellte Fähigkeit zur Virulenzsteigerung in BALB/c Mäusen festgelegt wurde, wurde eine Analyse der Cosmide p2 und p4 nicht weiter verfolgt, da diese Cosmide in nur einer bzw. zwei Mäusen wieder eine Fußballenschwellung induzierten.

#### 4.7.5 ORF 4 von Cosmid a13 ist für die Virulenz der $\Delta clpB$ Deletionsmutante verantwortlich

Die Durchmusterung der Cosmid-Genbank sowie die enzymatische Modifizierung des Ursprungscosmids a13 führte zur Identifizierung und Isolation verschiedener Cosmidtypen, die in Teilen ihrer Sequenz mit a13 überlappen. Durch die einzelne Transfektion dieser Cosmide in *L.m.*  $\Delta clpB$  sollte in einer anschließenden *in vivo* Selektion mit einer Mischung dieser rekombinanten Parasiten untersucht werden, auf welchen Abschnitt des Ursprungscosmids a13 ein hoher Selektionsdruck bestand. Nachdem wieder eine Wiederherstellung der Virulenz der ursprünglich avirulenten  $\Delta clpB$ -Parasiten beobachtet werden konnte, wurde in einer Cosmidanalyse die Selektion auf zwei definierte Cosmidtypen (13.1 und 13.3) festgestellt. Bei dem Sequenzvergleich der transfizierten Cosmide wurde deutlich, dass nur der offene Leserahmen (ORF), der für das 46 kDa Protein codiert, die Selektion auf diese beiden Cosmidtypen bedingt haben kann. Dieser ORF war auf keinem der anderen Cosmide vollständig erhalten, während andere ORFs, die auf a13.1 und a13.3 codiert waren, zusätzlich noch auf anderen, aber nicht selektierten Cosmiden vorhanden waren.

Demzufolge wurde in dieser letzten Selektionsrunde bestätigt, dass der avirulente Phänotyp der  $\Delta clpB$ -Mutante durch Überexpression eines definierten Gens wieder aufgehoben werden kann. Die Ergebnisse aus den *in vitro* Makrophagen-Infektionsexperimenten werden damit ebenfalls bestätigt. Es kann definitiv ausgeschlossen werden, dass es sich bei Isolierung von 20 verschiedenen Cosmid-Typen in der ersten *in vivo* Selektion um additive Effekte handelt.

Da auf beiden reisolierten Cosmiden der relevante ORF vollständig erhalten war, wäre ein ca. 50 %-iges Auftreten beider Cosmide zu erwarten gewesen. In den reisolierten Parasiten eines Fußisolats wurde auch annähernd eine solche Verteilung gefunden: a13.1 wurde in 52 % der untersuchten Cosmide identifiziert, a13.3 in 48 %. Anders als vermutet war jedoch die Verteilung in den Parasiten der Lymphknotenisolats, so dass sich insgesamt für ein Fußisolat und 2 Lymphknotenisolats ein Verhältnis von 74,6 (a13.1) zu 22,6 (a13.3) ergab. Da auf Cosmid a13.1 zwar der ORF vollständig erhalten war, jedoch unmittelbar vor Beginn des ORF Fragmente durch Restriktionsverdau entfernt worden waren, kommt der Verlust von möglicherweise relevanten intergenischen Sequenzen für die bevorzugte Expression des ORF 4 auf Cosmid a13.3 in Frage.

#### 4.7.6 Komplementation oder Kompensation?

Der Ansatz der funktionellen Komplementation führte nachweislich zu Wiederherstellung der Virulenz in sonst avirulenten  $\Delta clpB$  Deletionsmutanten. Damit wird neben bereits publizierten Studien (Ryan *et al.*, 1993b; Beverley und Turco, 1995; Descoteaux *et al.*, 2002) einmal mehr dokumentiert, dass avirulente (Deletions-) Mutanten durch das Einbringen komplementierender oder kompensierender Gene in BALB/c Mäusen wieder Läsionsbildungen verursachen können.

Jedoch muss zusammenfassend festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Studie nicht zwischen einer Kompensation und einer funktionellen Komplementation unterschieden werden konnte. Wie bereits einleitend geschildert, ist/wäre es möglich, dass es sich bei ORF 4, der für das 46 kDa Protein codiert, um ein stadienspezifisches Gen handelt, dessen Expression den Amastigoten-Zustand fördert (wie HSP90, Wiesgigl und Clos, 2001, siehe auch 4.7.3). In einem solchen Fall würde es sich um eine kompensatorische Expression eines Gens handeln, um den avirulenten  $\Delta clpB$  Phänotyp zu überbrücken.

Um diese Frage abschließend zu klären, müssten weitere Studien durchgeführt werden (siehe Ausblick, 4.8).

#### 4.7.7 Auch bei der *in vitro* Selektion findet eine Selektion auf definierte Cosmide statt

Während der *in vitro* Kultivierung von promastigoten Leishmanien, die mit der Cosmidbank transfiziert worden waren, wurde eine Selektion auf 5 dominante Cosmidtypen beobachtet (p1-p5). Dabei wurden zwei dieser Cosmidtypen auch während der *in vivo* Selektion reisoliert (p1=a2; p3=a1). Das führte zunächst zu der Vermutung, dass auf diesen beiden Cosmiden Gene lokalisiert sein müssten, die für einen „echten“ *rescue* der  $\Delta clpB$  Mutanten in Frage kommen.

In einer weiteren *in vitro* Selektionsrunde wurde ein Gemisch aus Parasiten eingesetzt, die einzeln mit den dominanten Cosmiden aus der ersten *in vivo* und *in vitro* Selektionsrunde transfiziert worden waren (a1=p3, a2=p1, a5, a12, a13, a20, p2, p4, p5). Mit signifikanter Häufigkeit wurde die Cosmide p4 (48%) und p5 (26%) aus den Parasiten reisoliert. Die Cosmide, die zuvor in der *in vivo* und *in vitro* Selektion isoliert worden waren (a1=p3; a2=p1) konnten in dieser Runde nicht mehr identifiziert werden.

Eine Sequenzanalyse der *in vitro* selektierten Cosmide und ein Vergleich mit den in der *Leishmania Gene Database* annotierten Sequenzen sowie mit Sequenzen in der NCBI *Protein/Protein Database* führte zu Identifizierung einer putativen Proteinkinase (E value: 0) und eines Centrin/Caltractin-Gens (E value:  $2.3^{-122}$ ) auf Cosmid p4.

In *L. donovani* resultierte die Expression eines modifizierten Centrin-Proteins in einer signifikanten Wachstumsverzögerung. Die Autoren postulieren einen Einfluss des Centrins auf die Vervollständigung der Mitose (Selvapandiyani *et al.*, 2001). Eine Überexpression des Centrins führte zwar nicht zu einer veränderten Wachstumsrate; Da jedoch über Centrine in *Leishmania* bisher sehr wenig bekannt ist, kann ein positiver Einfluss auf die Proliferation nicht generell ausgeschlossen werden. Zudem wurde die Studie von Selvapandiyani *et al.* (2001) in *L. donovani* durchgeführt, und ein *L. major* Homolog könnte eine leicht modifizierte Funktion ausüben. Möglicherweise resultiert also die *in vitro* Selektion des Cosmids p4 aus einem Einfluss des Cosmids auf die Zellteilung, und nicht auf einer Komplementation /Kompensation von  $\Delta clpB$ .

Das Cosmid p4 wurde in der zweiten *in vivo* Selektionsrunde nur aus Parasiten von zwei Mäusen reisoliert. In den Parasiten aus einer der beiden Mäuse war das Cosmid zu 100% vertreten, in den Parasiten der zweiten Maus dagegen nur zu 4% bzw. 8% (Fuss und Lymphknoten). *In vivo* vermittelte dieses Cosmid offensichtlich keinen Selektionsvorteil. Diese Beobachtung stimmt mit einer Beobachtung von Hoyer *et al.* (2004) überein, in der eine Überexpression des Gens LdGF1 (*Leishmania donovani growth factor 1*) zwar in der *in vitro* Selektion einen Vorteil bei Anwachsen G1-arretierter Zellen vermittelt, sich aber während einer BALB/c Passage eher nachteilig auf den Infektionsverlauf auswirkt. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren *in vitro* Selektionsrunde das Cosmid p4 nicht mit einbezogen.

Das zweite dominante Cosmid aus der *in vitro* Selektion war Cosmid p5, dessen Sequenz und ORF- Annotierung keinen Hinweis auf einen Bestandteil der Zellzyklusregulation lieferte; Allerdings waren von 12 annotierten offenen Leserahmen 6 Leserahmen ohne Hinweis auf Funktion des codierten hypothetischen Proteins, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch p5 aufgrund einer schnelleren Proliferation selektiert wurde.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Cosmide a1=p3 und a2=p1 in der *in vitro* Selektion eine Rolle spielen, und die damit transfizierten Parasiten in der zweiten Selektionsrunde lediglich von Parasiten mit den potenziell Proliferations-fördernden Cosmiden p4 und p5 überwachsen wurden, wurde eine weitere Selektion ohne die Parasiten *L.m. ΔclpB*-p4 bzw. p5 durchgeführt. Auch in dieser Selektion konnten die Cosmide a1=p3 und a2=p1 nicht reisoliert werden. Den größten Anteil der reisolierten Cosmide stellte in dieser Runde p2 (82%). Auf diesem Cosmid sind neben einigen hypothetischen Proteinen einige *housekeeping proteins* wie eine Argininosuccinat-Synthase, eine Pteridin-Reduktase 1 und eine Tryptophanyl tRNA-Synthase codiert, die eventuell bei der allgemeinen Proliferation einen Vorteil verschaffen. Weiterhin ist auf diesem Cosmid das *multidrug resistance protein* codiert, welches durch 10 hypothetische Transmembranhelices wahrscheinlich eine ABC-Transporteraktivität aufweist. Beachtenswert ist dieses Gen, da auf Cosmid a13, einem dominanten Cosmid in der *in vivo* Selektion ebenfalls eine Sequenz für einen ABC-Transporter vorhanden ist. In der letzten *in vivo* Selektion wurde jedoch nachgewiesen, dass dieses Protein keinen Einfluss auf die Virulenz hat, und das das Vorkommen von zwei transmembranen Proteinen aufverschiedenen Cosmiden damit eher zufälliger Natur zu sein scheint.

Die Ergebnisse aus der *in vitro* Selektion führen zu dem Schluss, dass eine Selektion auf *ΔclpB* komplementierenden bzw. kompensierende Gene im promastigoten Stadium der Leishmanien uneindeutiger und mit mehr Schwierigkeiten verbunden ist als eine Selektion im amastigoten Stadium. Wahrscheinlich ist das darauf zurückzuführen, dass ClpB als Amastigoten-Protein in der Promastigote ohnehin nur eine marginale Expression erfährt (Hübel *et al.*, 1995). Zudem wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von HSP100 keine beobachtbaren Auswirkungen auf die Proliferation unter axenischen Kulturbedingungen hat (Hübel *et al.*, 1997, Krobitsch *et al.*, 1999). Der Selektionsdruck ist offenbar während der *in vitro* Kultivierung bei 25°C nicht hoch genug, um eine Ergänzung des *ΔclpB* Phänotyps zu erzielen. Bei der Analyse der einzelnen Cosmide sollte daher beachtet werden, dass die Selektion dominanter Cosmidtypen auch auf der Überexpression von Genen beruhen könnte, die Vorteile bei der allgemeinen Proliferation promastigoter Zellen verschaffen. Dieses sollte auch bei der Untersuchung der Cosmide beachtet werden, die während der *in vivo* Selektion identifiziert wurden. Auch hier kann es während des Anwachsens nach der Isolation aus den infizierten Organen zur Selektion auf Cosmide kommen, die den Parasiten einen Vorteil bei der Proliferation verschaffen.

#### 4.8. Funktion von ClpB

Im Rahmen dieser funktionellen Komplementationsstudie sollte untersucht werden, ob durch eine Überexpression relevanter Gene/Proteine der avirulente Phänotyp der *ΔclpB*-Mutante überbrückt werden kann. Anhand der identifizierten Faktoren sollte Einblick in die Funktion von ClpB in *Leishmania* gewonnen werden. Dabei wurde wie bereits beschrieben festgestellt, dass der Verlust von ClpB durch die Überexpression einer 46 kDa Proteinspezies umgangen werden kann. Da über die Identität dieses Proteins jedoch bislang nichts bekannt ist, können jedoch (zumindest vorläufig) noch keine Aussagen über die Funktion dieses Proteins und damit über den Mechanismus des ClpB-Ersatzes getroffen werden.

Unabhängig von den Ergebnissen der Komplementationsstudie kann jedoch bereits jetzt in Betracht gezogen werden, dass das ClpB-Homolog in *Leishmania* eine andere Funktion ausübt als seine homologen Proteine in der Hefe oder in prokaryotischen Zellen. In *S. cerevisiae* ist HSP104 für die induzierbare Thermotoleranz verantwortlich, während das

*Leishmania*-Homolog nur marginale Auswirkungen auf dieses Phänomen zeigte (Sanchez *et al.*, 1990; Hübel *et al.*, 1997, Krobitch *et al.*, 1999). In der Hefe *S. cerevisiae* konnte dabei das Fehlen von HSP104 teilweise durch eine Überexpression von *hsp70* ausgeglichen werden. Weder in der *Proteomics*-Studie, noch in der funktionellen Komplementations-Analyse wurde jedoch ein Hinweis auf eine Wiederherstellung des virulenten Phänotyps durch Überexpression von HSP70 gewonnen.

Die Überexpression von beispielsweise anderen Hitzeschock- bzw. Stressproteinen hätte auch in der *Proteomics*-Studie der *escape*-Varianten klar erkennbar sein müssen. Auch in der Pulsfeldgelelektrophorese gab es keinen Hinweis auf die Etablierung von extrachromosomalen *hsp70* Kopien, während ein Selektionsdruck auf HSP90 die Generation eines solchen *hsp90*-Amplikons induzierte (Wiesiggl & Clos, 2001). Demnach scheint das HSP100- bzw. ClpB-Homolog in *Leishmania* zumindest nicht die identische Funktion des Hefe-HSP104 zu übernehmen.

Dem in der Komplementationsanalyse identifizierten 46 kDa Protein konnte zwar im *Leishmania* Genomprojekt noch keine Funktion zugeordnet werden, so dass prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um ein Stress-Protein handelt. Aber fehlende Hinweise auf signifikante Homologien zu bekannten Proteinen führen zu der Annahme, dass der *rescue* des  $\Delta$ clpB Phänotyps nicht durch eine kompensierende Expression anderer Stress- oder Hitzeschockproteine statt gefunden hat.

Weitere Hinweise auf Unterschiede zwischen den HSP100-Molekülen liefern Daten zum Wirkmechanismus von bakteriellen ClpB-Proteinen. Für die ClpB Maschinerie wurde gezeigt, dass 6 ClpB-Monomere in Form eines Hexamers wirksam sind (Lee *et al.*, 2003). Substratproteine werden dabei durch die zentrale Pore in den Kern des hexameren Ringes geführt werden (Weibezahn *et al.*, 2004). Für *Leishmania*-ClpB dagegen wurde eine Anordnung in trimeren Strukturen postuliert (Krobitch *et al.*, 1998), was die Bildung einer identischen zentralen Pore unmöglich machen würde.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der Verlust von ClpB von *L.m.* $\Delta$ clpB umgangen werden kann. Ob es sich dabei um eine funktionelle Komplementation oder einen kompensatorischen Effekt handelt, lässt sich aufgrund der noch nicht erfolgten Charakterisierung des zu Grunde liegenden Mechanismus bei der *escape*-Mutante bzw. des noch nicht weiter charakterisierten 46 kDa Proteins zu diesem Zeitpunkt nicht sagen. Festgehalten werden sollte jedoch, dass ClpB Proteine in *Leishmania* eine andere Funktion ausüben könnten als ihre bislang charakterisierten Homologe anderer Organismen.

#### 4.9 Ausblick

Sowohl die Studien an der *escape*-Variante als auch die funktionelle Komplementation ergaben Hinweise darauf, dass der avirulente Phänotyp der *L. major*  $\Delta$ clpB Mutante durch kompensatorische Mechanismen aufgehoben werden kann. Auch eine Studie von Späth *et al.* (2003) befasst sich mit der Charakterisierung einer ursprünglich avirulenten Gendelektionsmutante, die in Mauspassagen wieder eine Läsionsentwicklung hervorrief.

Bislang konnte in der Komplementationsstudie zwar nachgewiesen werden, dass die Überexpression eines relevanten und möglicherweise komplementatorische Proteins (46 kDa-Protein) für diese Reversion zum virulenten Phänotyp verantwortlich war, jedoch ist über das Protein selber und daher auch über den Mechanismus der Virulenzvermittlung nichts bekannt. Es konnten folglich bislang keine Aussagen darüber getroffen werden, ob ClpB in seiner Funktion ersetzt wurde, oder ein kompensatorischer Mechanismus das Fehlen von

ClpB ausgeglichen hat. Die Untersuchung dieser Mechanismen erscheint jedoch insbesondere im Licht der Lebend-Vaccine-Entwicklung notwendig. Zukünftig sollte deshalb untersucht werden, durch welche Mechanismen Revertanten entstehen und ein Überleben im Wirt ermöglichen.

Daher müsste zunächst das 46 kDa Protein eingehender charakterisiert werden. Dazu gehören die gezielte Überexpression des offenen Leserahmens in *L.m.ΔclpB* und die Erstellung von Expressionskinetiken. Auch in *L. major* WT sollte das Protein überexprimiert werden, um zu untersuchen, ob es sich um einen allgemeinen Virulenzfaktor handelt. Ferner kann Aufschluss über das Virulenz-vermittelnde Prinzip erhalten werden, indem die anderen in der Komplementationsanalyse identifizierten Cosmide auf den relevanten ORF und das zugehörige Protein untersucht werden. Da bereits für einige dieser Cosmide in *in vitro* Makrophagen-Infektionsstudien eine Virulenz-Vermittlung beobachtet wurde, liegt nahe, dass auch hier eine Eingrenzung auf einen relevanten Bereich des Cosmids möglich sein sollte.

Weiterhin soll die *escape*-Variante auf das Virulenz-vermittelnde Prinzip untersucht werden. Proteom-Studien wurden von unserer Seite bereits ausgiebig durchgeführt. Da nach unseren Erfahrungen ein Großteil der Proteine des *Leishmania*-Proteoms einen isoelektrischen Punkt zwischen pH4 und pH7 aufweist, wurden die meisten Studien in diesem pH-Bereich durchgeführt. Erweiterte Studien sollten jedoch auch den pH-Bereich jenseits dieses Kernbereichs untersuchen, um definitiv bestimmen zu können, ob eine kompensierende/komplementierende Protein-Spezies verstärkt exprimiert wird bzw. durch eine verminderte Expression eine Homeostase in einem betroffenen Reaktionsweg wiederhergestellt wird.

Da 2D-Gele lediglich eine mangelhafte Untersuchung kleiner Proteinspezies zulassen, könnte darüberhinaus insbesondere die Fraktion der kleinen Proteine (5-30 kDa) auf chemotaktische Aktivitäten untersucht werden. Die Ergebnisse aus den *air pouch* Experimenten legen nahe, dass die verstärkte Infiltration verschiedener Zellen des Immunsystems durch Chemotaxis verursacht werden könnte.

Aus verschiedenen Gründen wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass das *Leishmania*-ClpB Homolog eine andere Funktion haben könnte als seine homologen Proteine aus der Hefe und den Prokaryoten. Um weiterhin Aufschluss über die Funktion des *Leishmania*-ClpB zu erhalten, sollten vergleichende *in vitro* Funktionsstudien durchgeführt werden. Eine Funktions-Homologie ließe sich auch überprüfen, indem beispielsweise das Hefe-Homolog in der *L. major ΔclpB* Mutante überexprimiert würde.

## 5. Zusammenfassung

Leishmanien durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus, in dessen Verlauf eine Stadiendifferenzierung vom promastigoten Insektenstadium zum amastigoten Säugerstadium erfolgt. Während der Übertragung vom Insektenvektor auf einen Säugerwirt erfahren die Parasiten veränderte Umweltbedingungen wie eine erhöhte Umgebungstemperatur und einen niedrigen pH Wert im Phagolysosom der Wirtsmakrophagen, die als Schlüsselreize für die nachfolgende Stadiendifferenzierung gelten.

Durch die Temperaturerhöhung wird die Synthese von Hitzeschockproteinen (HSPs) induziert, deren generelle Aufgabe darin besteht, die Akkumulierung von denaturierten Proteinen zu verhindern. In *Leishmania* wurden bislang verschiedene Familien von HSPs charakterisiert (Hübel et al., 1995; Brandau et al., 1995; Krobitch et al., 1998; Krobitch & Clos, 1999; Schlüter et al., 2000; Wiesgigl & Clos, 2001). Eine wichtige Rolle kommt dabei dem HSP100 Homolog der Leishmanien zu, einem Verwandten der ClpB-Proteasen.

Als geeignetes Tiermodell wird für eine *Leishmania*-Infektion häufig die BALB/c Maus ausgewählt. Diese Tiere sind anfällig für eine Infektion mit *L. major*, und reagieren mit einer Polarisierung ihrer T-Zellen in Richtung Th2. Im Gegensatz dazu zeichnen sich C57BL/6 Mäusen durch eine Resistenz gegenüber einer *L. major* Infektion aus, die mit einer ausgeprägten Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1 einhergeht.

Eine  $\Delta clpB$  Deletionsmutante von *L. major* zeigte eine stark reduzierte Virulenz in *in vivo* Infektionsstudien im BALB/c Modell (Hübel et al., 1997). Ebenso wie die *L. major*  $\Delta clpB$  Mutante zeigte auch eine *L. donovani*  $\Delta clpB$  Mutante in *in vitro* Infektionsstudien von isolierten Makrophagen eine eingeschränkte Virulenz und Proliferationsfähigkeit (Krobitch & Clos 1999). Die Expression von ClpB scheint also von elementarer Bedeutung für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion zu sein.

Während einer Mauspassage im BALB/c Modell wurde eine  $\Delta clpB$  Variante von *L. major* isoliert, die eine spontane, *L. major* WT vergleichbare Läsionsentwicklung bei BALB/c Mäusen hervorrief. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Charakterisierung dieses *escape*-Isolates (*L.m.  $\Delta clpB$  escape*) vorgenommen, um einen Einblick in die Funktion von ClpB zu erhalten bzw. über den kompensatorischen/komplementierenden Mechanismus, der zu Wiedererlangung der Virulenz führte.

- Wiederholte Mauspassagen des *escape*-Isolates zeigten immer einen identischen Infektionsverlauf. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich um einen „echten“ *escape*-Mechanismus handelt, und nicht um ein zufälliges Ereignis.
- Eine Infektion mit der *escape*-Mutante führte zu einer starken Lymphknotenschwellung wie nach einer WT-Infektion. Histologische Untersuchungen zeigten, dass eine verstärkte Infiltration von Immunzellen zur hohen Masse des Lymphknotens führte, und dass die Parasitenzahl im Gegensatz zu einer Infektion mit *L. major* WT stark reduziert war. Diese Beobachtungen wiesen auf eine Kontrolle der Infektion durch die BALB/c Maus hin.
- Die Analyse des vorherrschenden Zytokinmusters bestätigte, dass während der frühen Phase der Infektion der Spiegel des Th1-charakterisierenden Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) nach Infektion von BALB/c Mäusen mit dem *escape*-Isolates stark erhöht war. WT- und  $\Delta clpB$ -infizierte Mäuse zeichneten sich jedoch durch eine Th2-typische Produktion von Interleukin 4 (IL 4) aus. Nach *air pouch* Infektionen konnte zudem eine erhöhte

Infiltration von Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen an die Inokulationsstelle nach einer Infektion mit der *escape*-Population beobachtet werden.

- In Proteom- und Immunblotanalysen konnte gezeigt werden, dass die *escape*-Mischpopulation eine erhöhte Expression von *para flagellar rod* (PFR)-Proteinen vorwies. Eine Überexpression von PFR1d führte jedoch nicht zu einer veränderten Stimulierung von dendritischen Zellen, wie anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD86 und der Sezernierung von Interleukin 12 (IL 12) nachgewiesen wurde. Folglich hat PFR offenbar keinen Einfluss auf die modifizierte Immunantwort.
- Nach einer Klonierung der *escape*-Population wurden drei Klone mit unterschiedlicher Infektiosität isoliert. Während *escape* -1 und -3 eine Th1-Antwort induzierten, damit aber in *in vivo* Infektionsstudien avirulent blieben, zeigte *escape*-2 ein Th2-typisches Zytokinmuster sowie eine gesteigerte Virulenz gegenüber  $\Delta clpB$  in *in vivo* Infektionsexperimenten. Daraus ist zu schließen, dass ein Gemisch aus virulenten und avirulenten Parasiten eine Infektion etablieren kann, und dass avirulente Parasiten im „Windschatten“ von virulenten Parasiten persistieren können. Zudem zeigten die drei Einzelklone Unterschiede in der Zellmorphologie, wobei sich nur der virulente *escape* Klon 2 durch ein verlängertes Flagellum auszeichnete. Da dieser Klon wie *L. major* WT eine Th2-Antwort in der BALB/c Maus induziert, wurden die Ergebnisse bestätigt, dass eine Überexpression von PFR-Protein keinen Einfluss auf die Modifikation der Immunantwort hat.
- Da in den Proteomanalysen kein Faktor identifiziert werden konnte, der für die beobachtete Virulenzsteigerung verantwortlich sein könnte, wurde eine genetische Komplementationanalyse durchgeführt, in deren Verlauf auf Cosmide selektiert wurde, die den  $\Delta clpB$  Phänotyp bezüglich seines Virulenzverlustes aufheben. Dazu wurde eine Cosmidgenbank aus genomischer DNA der  $\Delta clpB$  Mutante hergestellt. Nach der Transfektion der Genbank in *L.m* $\Delta clpB$  wurde in *in vivo* Selektionen (BALB/c Passage) eine begrenzte Anzahl von Cosmiden identifiziert, die den  $\Delta clpB$  Parasiten *in vivo* wieder Virulenz vermittelten.
- Auch bei aufeinander folgenden *in vitro* Selektionen bei 25°C (Promastigoten- Stadium) erfolgte eine Selektion auf definierte Cosmidtypen, die der  $\Delta clpB$ - Mutante offenbar einen Selektionsvorteil vermittelten.
- Die Virulenzsteigerung dieser isolierten Cosmide konnte durch *in vitro* Makrophageninfektionsexperimente bestätigt werden.
- Eine Einengung der Virulenz-vermittelnden offenen Leserahmen in *in vivo* Studien wurde erfolgreich vorgenommen und führte zur Identifizierung eines Gens, das für die Überbrückung des Verlustes von *clpB* verantwortlich zu sein scheint, und für ein 46 kDa Protein codiert.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass eine avirulente *L. major*  $\Delta clpB$  Mutante durch einen unbekanntem, kompensatorischen Mechanismus Virulenz wiedererlangen kann. Da die Modulation der Immunantwort von einer üblichen Th2-Polarisierung hin zu einer Th1-Antwort zu einer Eliminierung der meisten Parasiten Subklone führt, erfolgt eine Persistenz vermutlich in sogenannten *safe targets*. Eine Einzelklonzelllinie (*L.m.*  $\Delta clpB$ ) kann also in eine Population unterschiedlicher Varianten differenzieren, die unterschiedliche Infektiositätsprofile aufweisen. Generell sollte deshalb bei der Erprobung

von Lebend-Vaccinestämmen der Aspekt im Auge behalten werden, dass avirulente Parasiten offenbar spontan einen kompensatorischen Mechanismus entwickeln können, um Persistenz und Proliferieren im Wirt zu ermöglichen. Die Beobachtung, dass sich durch genetische Komplementation ein virulenter Phänotyp entwickeln kann, führt ebenfalls zu dem Schluss, dass avirulente bzw. attenuierte *Leishmania* Stämme im Zusammenhang der Lebend-Vaccinierung mit Vorsicht zu betrachten sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC.  
*Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol.* 2004 Jul;76(1):95-103. Epub 2004 Apr 01.
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH.  
Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology.* 1992 Oct;105 ( Pt 2):193-202.
- Beverley SM, Turco SJ.  
Identification of genes mediating lipophosphoglycan biosynthesis by functional complementation of *Leishmania donovani* mutants.  
*Ann Trop Med Parasitol.* 1995 Dec;89 Suppl 1:11-17. Review.
- Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski AK, Seegmuller I, Voigt H, Launois P, Levine AD, Wagner H, Heeg K, Louis JA, Rocken M  
IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice.  
*Nat Immunol.* 2001 Nov;2(11):1054-60.
- Bock JH, Langer PJ.  
Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*.  
*Mol Biochem Parasitol.* 1993 Dec;62(2):187-97.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A.  
The role of nitric oxide in innate immunity.  
*Immunol Rev.* 2000 Feb;173:17-26.
- Brandau S, Dresel A, Clos J.  
High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*.  
*Biochem J.* 1995 Aug 15;310 ( Pt 1):225-32.
- Brown JA, Titus RG, Nabavi N, Glimcher LH.  
Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response.  
*J Infect Dis.* 1996 Dec;174(6):1303-8..
- Bryceson A.  
Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis.  
*Med Microbiol Immunol (Berl).* 2001 Nov;190(1-2):81-4. Review.
- Buchner J.  
Hsp90 & Co. - a holding for folding.  
*Trends Biochem Sci.* 1999 Apr;24(4):136-41. Review.
- Bukau B, Horwich AL.  
The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.

Cell. 1998 Feb 6;92(3):351-66. Review.

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR.

Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(7):2453-7

Chang TL, Shea CM, Urioste S, Thompson RC, Boom WH, Abbas AK.  
Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. III. Responses of IL-2- and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells.  
J Immunol. 1990 Nov 1;145(9):2803-8.

Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW.  
Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+].  
Science. 1995 May 12;268(5212):880-4.

Clos J, Brandau S, Hoyer C.  
Chemical Stress does not induce Heat Shock Protein Synthesis in *Leishmania donovani*  
Protist.1998 May; 149: 167-172

Curotto de Lafaille MA, Laban A, Wirth DF.  
Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):2703-7.

Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL.  
CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages.  
J Immunol. 1989 Jul 15;143(2):617-22.

Descoteaux A, Avila HA, Zhang K, Turco SJ, Beverley SM.  
*Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability.  
EMBO J. 2002 Sep 2;21(17):4458-69.

Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ, Beverley SM.  
A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*.  
Science. 1995 Sep 29;269(5232):1869-72.

Descoteaux A, Turco SJ.  
Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity.  
Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 8;1455(2-3):341-52. Review.

Desjardins M, Descoteaux A.  
Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan.  
J Exp Med. 1997 Jun 16;185(12):2061-8.

Elloso MM, Scott P.  
Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection.  
J Immunol. 1999 Jun 1;162(11):6708-15.

- Fischer C, Voss A, Engel J.  
Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis.  
Med Microbiol Immunol (Berl). 2001 Nov;190(1-2):85-7. Review.
- Frosch S, Kuntzlin D, Fleischer B.  
Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity.  
Infect Immun. 1997 Mar;65(3):971-7.
- Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, Fitch FW.  
Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations.  
J Immunol. 1991 Mar 15;146(6):1750-8.
- Glover JR, Lindquist S.  
Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins.  
Cell. 1998 Jul 10;94(1):73-82.
- Gorham JD, Guler ML, Steen RG, Mackey AJ, Daly MJ, Frederick K, Dietrich WF, Murphy KM.  
Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 29;93(22):12467-72.
- Grunstein M, Hogness DS.  
Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Oct;72(10):3961-5.
- Guy RA, Belosevic M.  
Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages.  
Infect Immun. 1993 Apr;61(4):1553-8.
- Hall LR, Titus RG.  
Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production.  
J Immunol. 1995 Oct 1;155(7):3501-6.
- Hartl FU.  
Molecular chaperones in cellular protein folding.  
Nature. 1996 Jun 13;381(6583):571-9. Review.
- Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM.  
Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):7011-5.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM.  
Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets.

J Exp Med. 1989 Jan 1;169(1):59-72.

Hill JO.

Pathophysiology of experimental leishmaniasis: pattern of development of metastatic disease in the susceptible host.

Infect Immun. 1986 May;52(2):364-9.

Himmelrich H, Launois P, Maillard I, Biedermann T, Tacchini-Cottier F, Locksley RM, Rocken M, Louis JA.

In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease.

J Immunol. 2000 May 1;164(9):4819-25.

Hoyer C, Zander D, Fleischer S, Schilhabel M, Kroener M, Platzer M, Clos J.

A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest.

Int J Parasitol. 2004 Jun;34(7):803-11.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM.

Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.

Science. 1993 Apr 23;260(5107):547-9.

Hubel A, Brandau S, Dresel A, Clos J.

A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania spp.*

Mol Biochem Parasitol. 1995 Mar;70(1-2):107-18.

Hubel A, Krobitch S, Horauf A, Clos J.

*Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite.

Mol Cell Biol. 1997 Oct;17(10):5987-95.

Hunter KW, Cook CL, Hayunga EG.

Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins.

Biochem Biophys Res Commun. 1984 Dec 14;125(2):755-60.

Jakob U.

HSP90--news from the front.

Front Biosci. 1996 Oct 01;1:d309-17. Review.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM.

Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression.

Mol Cell Biol. 1990 Mar;10(3):1084-94.

Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ, Scott JC.

Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages.

Eur J Immunol. 1994 Nov;24(11):2850-4.

Katayama-Fujimura Y, Gottesman S, Maurizi MR.

A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*.

J Biol Chem. 1987 Apr 5;262(10):4477-85.

Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, Handman E. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3.

J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4902-6.

Keeler SJ, Boettger CM, Haynes JG, Kuches KA, Johnson MM, Thureen DL, Keeler CL Jr, Kitto SL.

Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean.

Plant Physiol. 2000 Jul;123(3):1121-32.

Kelly JM, Das P, Tomas AM.

An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector.

Mol Biochem Parasitol. 1994 May;65(1):51-62.

Krobitsch S, Brandau S, Hoyer C, Schmetz C, Hubel A, Clos J.

*Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation.

J Biol Chem. 1998 Mar 13;273(11):6488-94.

Krobitsch S, Clos J.

A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*.

Cell Stress Chaperones. 1999 Sep;4(3):191-8.

Krobitsch S, Lindquist S.

Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 15;97(4):1589-94.

Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors.

Infect Immun. 2002 Feb;70(2):826-35.

Launois P, Himmelrich H, Tacchini-Cottier F, Milon G, Louis JA.

New insight into the mechanisms underlying Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice.

Microbes Infect. 1999 Jan;1(1):59-64. Review. No abstract available.

Launois P, Louis JA, Milon G.

The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites.

Parasitology. 1997;115 Suppl:S25-32. Review.

Lawrence F, Robert-Gero M.

Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jul;82(13):4414-7.

Lee MG, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LH.

Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*.  
Nucleic Acids Res. 1988 Oct 25;16(20):9567-85. Erratum in: Nucleic Acids Res 1988 Dec 9;16(23):11400-1.

Lee S, Sowa ME, Watanabe YH, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FT.  
The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state.  
Cell. 2003 Oct 17;115(2):229-40.

Liew FY, Dhaliwal JS.  
Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from  
*Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites.  
J Immunol. 1987 Jun 15;138(12):4450-6.

Liew FY, Hale C, Howard JG.  
Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of  
effector and specific suppressor T cells.  
J Immunol. 1982 Apr;128(4):1917-22.

Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE, Beetham JK.  
Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to  
lysis by complement.  
Mol Biochem Parasitol. 2004 Sep;137(1):185-9.

Lindquist S.  
The heat-shock response.  
Annu Rev Biochem. 1986;55:1151-91. Review.

Liu X, Chang KP.  
Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient  
*Leishmania* increases their binding to macrophages.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 1;89(11):4991-5.

Luhrs KA, Fouts DL, Manning JE.  
Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against  
*Trypanosoma cruzi* infection.  
Vaccine. 2003 Jun 20;21(21-22):3058-69.

Lum R, Tkach JM, Vierling E, Glover JR.  
Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces  
cerevisiae* Hsp104.  
J Biol Chem. 2004 Jul 9;279(28):29139-46. Epub 2004 May 05.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M,  
Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A.  
Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T  
cells.  
J Immunol. 1995 May 15;154(10):5071-9.

Maurizi MR.  
Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*.  
Experientia. 1992 Feb 15;48(2):178-201. Review.

- McNeely TB, Turco SJ.  
Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes.  
J Immunol. 1990 Apr 1;144(7):2745-50.
- Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE.  
Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease.  
Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3165-71.
- Michels AA, Kanon B, Bensaude O, Kampinga HH.  
Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells.  
J Biol Chem. 1999 Dec 17;274(51):36757-63.
- Miller JS.  
Effects of temperature elevation on mRNA and protein synthesis in *Leishmania mexicana amazonensis*.  
Mol Biochem Parasitol. 1988 Aug;30(2):175-84.
- Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC, Modabber FZ.  
Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism.  
Clin Exp Immunol. 1986 Apr;64(1):1-7.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.  
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
J Immunol. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- Mosser DM, Edelson PJ.  
Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages.  
J Immunol. 1984 Mar;132(3):1501-5.
- Mosser DM, Edelson PJ.  
The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes.  
J Immunol. 1985 Oct;135(4):2785-9.
- Mosser DM, Edelson PJ.  
The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*.  
Nature. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):329-31.
- Parsell DA, Kowal AS, Lindquist S.  
*Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes.  
J Biol Chem. 1994 Feb 11;269(6):4480-7.
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S.

- Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104.  
Nature. 1994 Dec 1;372(6505):475-8.
- Passwell JH, Shor R, Smolen J, Jaffe CL.  
Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst.  
Int J Exp Pathol. 1994 Aug;75(4):277-84.
- Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL.  
Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut.  
Science. 1992 Jun 26;256(5065):1812-5.
- Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL.  
Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Sep 13;91(19):9155-9.
- Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenberg EJ.  
Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production.  
Infect Immun. 1999 Jan;67(1):237-43.
- Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC.  
Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation.  
J Cell Sci. 2004 Jan 15;117(Pt 2):315-25. Epub 2003 Dec 02.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY.  
Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):10984-9.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY.  
Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages.  
Eur J Immunol. 1995 Mar;25(3):745-50.
- Prusiner SB.  
Biology and genetics of prion diseases.  
Annu Rev Microbiol. 1994;48:655-86. Review.
- Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA.  
Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9.  
J Immunol. 1990 Dec 15;145(12):4311-6.
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S.  
Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*.  
Plant Cell. 2000 Apr;12(4):479-92.

- Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM.  
*Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection.  
J Exp Med. 1994 Feb 1;179(2):447-56.
- Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R, Reiner NE.  
*Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences.  
Exp Parasitol. 1997 Mar;85(3):249-63.
- Rey-Ladino JA, Reiner NE.  
Expression of 65- and 67-kilodalton heat-regulated proteins and a 70-kilodalton heat shock cognate protein of *Leishmania donovani* in macrophages.  
Infect Immun. 1993 Aug;61(8):3265-72.
- Ritossa F.  
Drosophila Inf Serv. 1963, 37, 122-123
- Ronchese F, Hausmann B, Le Gros G.  
Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells can be primed on dendritic cells in vivo and do not require the presence of B cells.  
Eur J Immunol. 1994 May;24(5):1148-54.
- Russell DG, Wilhelm H.  
The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages.  
J Immunol. 1986 Apr 1;136(7):2613-20.
- Rutherford SL, Lindquist S.  
Hsp90 as a capacitor for morphological evolution.  
Nature. 1998 Nov 26;396(6709):336-42.
- Rutherford SL, Zuker CS.  
Protein folding and the regulation of signaling pathways.  
Cell. 1994 Dec 30;79(7):1129-32. Review.
- Ryan KA, Dasgupta S, Beverley SM.  
Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*.  
Gene. 1993 (a) Sep 6;131(1):145-50.
- Ryan KA, Garraway LA, Descoteaux A, Turco SJ, Beverley SM.  
Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 (b) Sep 15;90(18):8609-13.
- Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF.  
The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence.  
Parasitology. 1994;108 Suppl:S55-62. Review.
- Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC.

- Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity.  
Eur J Immunol. 1995 Sep;25(9):2492-8.
- Sanchez Y, Lindquist SL.  
HSP104 required for induced thermotolerance.  
Science. 1990 Jun 1;248(4959):1112-5.
- Sanchez Y, Parsell DA, Taulien J, Vogel JL, Craig EA, Lindquist S.  
Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70.  
J Bacteriol. 1993 Oct;175(20):6484-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.  
Biotechnology. 1992;24:104-8.
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S.  
HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions.  
Trends Biochem Sci. 1996 Aug;21(8):289-96. Review.
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G.  
*Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 15;89(20):9944-8.
- Schluter A, Wiesgigl M, Hoyer C, Fleischer S, Klaholz L, Schmetz C, Clos J.  
Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*.  
Biochim Biophys Acta. 2000 Apr 25;1491(1-3):65-74.
- Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, Kuhn R, Muller W, Palm N, Rude E.  
IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma.  
J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):3989-96.
- Schulte T, Kurrle R, Rollinghoff M, Gessner A.  
Molecular characterization and functional analysis of murine interleukin 4 receptor allotypes.  
J Exp Med. 1997 Nov 3;186(9):1419-29.
- Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C.  
Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay.  
J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1529-35.
- Searle S, McCrossan MV, Smith DF.  
Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*.  
J Cell Sci. 1993 Apr;104 ( Pt 4):1091-100.
- Seay MB, Heard PL, Chaudhuri G.

Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes.  
Infect Immun. 1996 Dec;64(12):5129-37.

Segovia M.

Leishmania gene amplification: a mechanism of drug resistance.

Ann Trop Med Parasitol. 1994 Apr;88(2):123-30. Review.

Selvapandiyan A, Duncan R, Debrabant A, Bertholet S, Sreenivas G, Negi NS, Salotra P, Nakhasi HL.

Expression of a mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite.

J Biol Chem. 2001 Nov 16;276(46):43253-61. Epub 2001 Sep 05.

Solbach W, Laskay T.

The host response to *Leishmania* infection.

Adv Immunol. 2000;74:275-317.

Spath GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM.

Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*.

Science. 2003 Aug 29;301(5637):1241-3.

Spath GF, Lye LF, Segawa H, Turco SJ, Beverley SM.

Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies.

Infect Immun. 2004 Jun;72(6):3622-7.

Van der Ploeg LH, Giannini SH, Cantor CR.

Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa.

Science. 1985 Jun 21;228(4706):1443-6.

van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T.

*Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes.

Infect Immun. 2002 Aug;70(8):4177-84.

Vogel JL, Parsell DA, Lindquist S.

Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation.

Curr Biol. 1995 Mar 1;5(3):306-17.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD.

The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 15;92(17):7804-8.

Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B.

Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB.

Cell. 2004 Nov 24;119(5):653-65.

Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD.

Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones.

J Vasc Surg. 1999 Apr;29(4):748-51. Review.

Wiesgigl M, Clos J.

Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*.

Mol Biol Cell. 2001 Nov;12(11):3307-16.

Wilson ME, Pearson RD.

Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism.

J Immunol. 1986 Jun 15;136(12):4681-8.

Zhang WW, Matlashewski G.

Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Aug 5;94(16):8807-11.

Zietkiewicz S, Krzewska J, Liberek K.

Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation.

J Biol Chem. 2004 Oct 22;279(43):44376-83. Epub 2004 Aug 09.

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Joachim Clos, bin ich für die Vergabe des Themas, die Betreuung der Arbeit sowie für seine permanente Diskussionsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach danke ich herzlich für seine Tätigkeit als Gutachter meiner Arbeit.

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an Iris Gaworski und Dr. Thomas Jacobs aus der Abteilung für Immunologie für die Durchführung der FACS- und Zytokinanalysen, sowie für die vielen informativen Diskussionen der Ergebnisse.

Dr. Sebastian Graefe aus der Abteilung Medizinische Zentraldiagnostik (BNI) danke ich für die Durchführung der *real time* PCR.

Nicht zuletzt bedanke ich mich beim gesamten Labor 11 für die tolle Zeit, das großartige Arbeitsklima und die Unterstützung in schwierigen Phasen der Arbeit. Ein besonderer Dank geht dabei an Manfred Krömer für die tolle Zusammenarbeit bei den Infektionsexperimenten und für die Anfertigung der histologischen Präparate sowie deren Färbungen.

## Lebenslauf

### **Ausbildung:**

1982- 1986: Katholische Grundschule Steinheim

1986- 1995: Städtisches Gymnasium Steinheim

1995: allgemeine Hochschulreife

1995- 2000: Studium der Biologie an der Universität Bielefeld  
Schwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie, Stoffwechsel-  
physiologie, Biochemie

2000: Abschluß: Diplom

Thema der Diplomarbeit: Die Stadiendifferenzierung in  
*Leishmania* spp.: Rolle der Amastigoten-spezifischen A2-  
Proteine  
angefertigt am Bernhard-Nocht-Institut, AG Clos

seit 10/2000: Promotionsarbeit im Bernhard-Nocht-Institut für  
Tropenmedizin  
Thema: Varianten der *Leishmania major* [Yakimov &  
Schockov]  $\Delta clpB$ -Mutante: Virulenz und Immunantwort  
Im Mausmodell

### **Praktische Arbeit:**

#### **Im Rahmen der Promotion:**

10/2000- 04/2001: wissenschaftliche Angestellte am Bernhard- Nocht-  
Institut für Tropenmedizin

05/2001- 04/2003: Stipendiatin der „Fonds der Chemischen Industrie“

05/2003- 12/2004: wissenschaftliche Angestellte am Bernhard- Nocht-  
Institut für Tropenmedizin

#### **Praktika:**

02/1998- 04/1998: AG Clos, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg

03/1999- 04/1999: Bayer AG Wuppertal, Abt. Antiinfektiva, *Herpes  
simplex I*