Charakterisierung verschiedener Formen des *Leishmania* Kmp-11 Proteins

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Melanie Selka

Berlin

2014

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, in der Klinischen Forschergruppe „Tumorimmunologie“ der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Professor Dr. Peter Walden durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Walden

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 23.04.2015

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
APC	Antigenpräsentierende Zelle, *antigen presenting cell* oder Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure, *bicinchoninic acid*
BHU	*Banares Hindu University*
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BP	Band Pass
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CTL	zytotoxische T-Zelle, *cytotoxic T cell*
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle, *dendritic cell*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, *desoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZ	Durchflusszytometrie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung, *fluorescence activated cell sorting*
FCS	fötales Kälberserum, *fetal calf serum*
FSC	Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*
FT	Frequenzteiler
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s) oder Generationszeit
GFP	Grün fluoreszierendes Protein, *green fluorescent protein*
h	Stunde
HASPB	*hydrophilic acylated surface protein B*
HIS	Histidin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen, *human leucocyte antigen*
HRP	Merrettich-Peroxidase, *horseraddish peroxidase*
HYG	hygromycin phosphotransferase
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
k	kilo
Kan	Kanamycin
Kmp	Kinetoplastid Membran Protein, *kinetoplastid membrane protein* *Kmp*-, DNA*;* Kmp-, Protein
K.o.	Knock-out
L.	*Leishmania*

LB	Luria-Bertani
LP	Long Pass
m	milli
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex*
min	Minute
NEO	neomycin phosphotransferace
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriessigsäure
NK	Natürliche Killerzelle, *natural killer cell*
ORF	offener Leserahmen, *open reading frame*
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, *phosphate-buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion, *polymerase chain reaction*
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht, *side scatter*
T.	*Trypanosoma*
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	tris-gepufferte Kochsalzlösung, *tris buffered saline*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Th	T Helfer, *T helper*
TSA	*thiol-specific antioxidant*
Tris	Tris-hydroxylmethyl-aminomethylamin
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region, untranslated region
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation, *World Health Organiszation*
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein, *yellow fluorescent protein*
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Trytophan
Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

Abkürzungen Aminosäuren VI

Zusammenfassung 1

Summary 2

1 Einleitung 3

1.1 Das Immunsystem 3
1.1.1 Angeborenes Immunsystem 3
1.1.2 Adaptives Immunsystem 4

1.2 Infektionskrankheiten 5

1.3 Der Parasit *Leishmania* 5
1.3.1 Taxonomie von *Leishmania* 6
1.3.2 Lebenszyklus des Parasiten 8
1.3.3 Verbreitung und klinische Erscheinungsbilder von Leishmaniosen 10
1.3.3.1 Kutane Leishmaniose 10
1.3.3.2 Mukokutane Leishmaniose 11
1.3.3.3 Viszerale Leishmaniose 11
1.3.4 Diagnostik und Therapieformen von Leishmaniosen 12
1.3.5 Evasionsstrategien von *Leishmania* 14
1.3.6 Transkription und Regulation der Genexpression in Kinetoplastida 16
1.3.7 Das Kinetoplastid Membran Protein 11 17
1.3.7.1 Kmp-11 als Antigen 19

1.4 Zielstellung 20

2 Material und Methoden 21

2.1 Material 21
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien 21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 22
2.1.3 Instrumente und Zubehör 22
2.1.4 Antikörper 23
2.1.5 Enzyme 23
2.1.6 Kommerzielle Kits 24
2.1.7 Vektoren 24
2.1.8 DNA- und Proteingrößenstandards 24
2.1.9 Oligonukleotidprimer 24
2.1.10 Zelllinien, Bakterien, Parasiten 25

2.2 Medien, Puffer und Lösungen 26
2.2.1 Medien 26
2.2.2 Puffer und Lösungen 26

2.3 Zellbiologische Methoden 28
2.3.1 Kultivierung von Zellen 28
2.3.2 Zellzahlbestimmung 28
2.3.3 Kryokonservierung 29
2.3.4 Auftauen von Zellen 29
2.3.5 Infektion von Makrophagen mit *Leishmania* 29

2.3.6 Transfektion von *Leishmania* 30
2.3.7 Durchflusszytometrie 30
2.3.8 Bestimmung der Generationszeit von *Leishmania* 31
2.3.9 Calcein-Färbung 32
2.3.10 Fluoreszenzmikroskopie 32

2.4 Molekularbiologische Methoden 34
2.4.1 Polymerasekettenreaktion 34
2.4.2 Gradienten-PCR 34
2.4.3 Kolonie-PCR 35
2.4.4 Agarose- Gelelektrophorese 35
2.4.5 Restriktionsverdau 35
2.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 36
2.4.7 Ligation 36
2.4.8 Transformation von Bakterien 36
2.4.9 Plasmidisolierung 36
2.4.10 Isolierung genomischer DNA 36
2.4.11 Klonierung des Kmp-11-Inserts in den Expressionsvektor pQE-30 zur Herstellung von His-getaggtem Kmp-11 37
2.4.12 Isolierung des His-getaggten Kmp-11 aus *E.coli* 37
2.4.13 Überexpression von Kmp-11 in *Leishmania* 38

2.5 Proteinchemische Methoden 38
2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 38
2.5.2 Western Blot 39
2.5.3 Coomassiefärbung 39
2.5.4 Silberfärbung 39
2.5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zwei Dimensionen zum Nachweis einer Dimerisierung des Kmp-11 Proteins 40
2.5.6 Proteinbestimmung mit BCA Proteinassay 40
2.5.7 In-Gel-Verdau und Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie 41
2.5.8 Aufnahme der MS-Spektren und Fragmentierung von Peptiden mit ESI-qTOF Massenspektrometrie 41

2.6 DNA-Sequenzierungen und Sequenzanalysen 42

2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse 42

3 Ergebnisse 43

3.1 Vergleich des Kmp-11 von *L.infantum* und *L.major* 43

3.2 Untersuchung des *Leishmania-Kmp-11* Locus in verschiedenen Spezies 45

3.3 Subzelluläre Lokalisation von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK 54

3.4 Infektiosität von Kmp-11 überexprimierenden *Leishmania* 59

3.5 Einfluss der *Leishmania*-Infektion auf die HLA-Expression von THP-1 Zellen 64

3.6 Strategie zur Herstellung von Kmp-11 Knock-out Mutanten 68

3.7 Untersuchung der Infektiosität von L.inf.Kmp-11^{low} 71

3.8 Einfluss von Kmp-11 auf das Wachstumverhalten der Leishmanien 73

3.9 Herstellung von rekombinatem Kmp-11-NMCK und Kmp-11-YPSK 75

3.10 Dimerisierung des Kmp-11-NMCK Proteins 77

4 Diskussion 80

5 Literaturverzeichnis 89

6 Abbildungsverzeichnis 101

7 Anhang 103

8 Publikationen 105

9 Eidesstattliche Erklärung 106

10 Danksagung 107

Zusammenfassung

Das Kmp-11 Protein ist ein hochkonserviertes Protein innerhalb der Kinetoplastiden. Durch seine nachgewiesene hohe Immunogenität steht Kmp-11 seit langem im Fokus für die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen viszerale Leishmaniose beim Menschen. Die Funktion des Proteins ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Sequenzanalysen zeigten, dass in verschiedenen Spezies von Leishmanien der Kmp-11 Locus unterschiedlich aufgebaut ist. Das Kmp-11 wird durch mehrere Gen-Kopien kodiert, die z.B. im Fall von *L.infantum* zusätzlich einen Polymorphismus aufweisen und zur Expression von zwei unterschiedlichen Varianten des Kmp-11 führen, einmal mit den C-terminalen Aminosäuren YPSK und einmal mit NMCK.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Kmp-11 Locus verschiedener *Leishmania* Spezies detailliert analysiert. Um weitere Kenntnisse über das Protein zu gewinnen, wurden beide Varianten des Kmp-11 auf zell- und molekularbiologischer sowie auf proteinchemischer Ebene untersucht. PCR- und Sequenzanalysen wiesen erstmals das Vorhandensein von *Kmp-11-NMCK* Sequenzen im Genom von *L.tropica* und *L.aethiopica* nach. Zudem konnten sowohl bei *L.donovani*, *L.tropica* als auch bei *L.aethiopica* erstmals auch zwei *Kmp-11-YPSK* Sequenzen gefunden werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass der Kmp-11 Locus ähnlich dem des schon bekannten *L.infantum* aufgebaut ist. Die Alignments der *Kmp-11* Nukleotidsequenzen zeigten, dass *L.tropica* mehr Homologien in den *Kmp-11* Sequenzen zu *L.aethiopica* aufweist als zu *L.infantum*.

Eine Überexpression von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK ergab, dass beide Proteine in Leishmanien gleich lokalisiert sind. Infektionsversuche mit humanen Makrophagen zeigten, dass eine Überexpression von Kmp-11-YFP im Vergleich zu einer Überexpression von YFP allein, einen inhibierenden Effekt auf die Infektiosität der Parasiten hat. Ein differenzieller Einfluss von Kmp-11-YPSK und –NMCK war hierbei nicht zu beobachten. Ein Knock-down des Kmp-11 führte zu keiner Änderung der Infektiosität, was vermuten lässt, dass Kmp-11 nicht an den unmittelbaren Mechanismen der Infektion von Zellen durch den Parasiten beteiligt ist. Eine verminderte Expression von Kmp-11 führte allerdings zu einer signifikanten Verlängerung der Generationszeit der Leishmanien.

In vitro Analysen mit aufgereinigtem Kmp-11 zeigten deutlich, dass das Kmp-11-NMCK im Gegensatz zu Kmp-11-YPSK in der Lage ist Dimere zu bilden. Eine Dimerisierung *in vivo* könnte für eine differentielle Funktion des Kmp-11-NMCK gegenüber -YPSK sprechen.

Summary

The Kmp-11 protein is a highly conserved protein within the kinetoplastids. Through its proven high immunogenicity Kmp-11 has long been in the focus for the development of new therapeutic approaches against visceral leishmaniasis in humans. However, the function of the protein has not yet been clarified.

Sequence analysis showed that in different species of *Leishmania* the Kmp-11 locus is structured differently. The Kmp-11 is encoded by multiple gene copies, which show for example in the case of *L.infantum* an additional polymorphism and lead to the expression of two different variants of the Kmp-11, with either the C-terminal amino acids YPSK or NMCK.

In the present work, the Kmp-11 locus of different *Leishmania* species was analyzed in detail. In order to gain further knowledge of the protein, both variants of the Kmp-11 were investigated on cellular and molecular biological, as well as on protein chemical level. PCR and sequence analysis first revealed the presence of *Kmp-11-NMCK* sequences in the genome of *L.tropica* and *L.aethiopica*. In addition, two copies of the *Kmp-11-YPSK* sequences were found for the first time in *L.donovani*, *L.tropica* as well as *L.aethiopica,* indicating that the Kmp-11 locus is similar to that of the already known *L.infantum*. The alignments of the *Kmp-11* nucleotide sequences showed that *L.tropica* has more homologies in the *Kmp-11* sequences to *L.aethiopica* than to *L.infantum*.

Overexpression of Kmp-11-YPSK and Kmp-11-NMCK indicated that both proteins are localized similar in *Leishmania*. Infection experiments with human macrophages showed that overexpression of Kmp-11-YFP has an inhibiting effect on the infectivity of the parasites in comparison to overexpression of YFP alone. A differential effect of Kmp-11-YPSK and –NMCK was not observed. A knock-down of the Kmp-11 resulted in no change in infectivity, suggesting that Kmp-11 is not involved in the direct mechanisms of infection of cells by the parasite. Decreased expression of Kmp-11, however, resulted in a significant prolongation of the generation time of *Leishmania*.

In vitro analyses using purified Kmp-11 clearly demonstrated that the Kmp-11-NMCK unlike Kmp-11-YPSK is able to form dimers. Dimerization *in vivo* could indicate for a differential function of the Kmp-11-NMCK compared to -YPSK.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat als biologisches Abwehrsystem die Aufgabe in den Körper eingedrungene fremde Substanzen und Mikroorganismen zu bekämpfen sowie fehlerhaft programmierte körpereigene Zellen zu zerstören. Alle Organismen verfügen über unspezifische Schutzmechanismen einer angeborenen Immunabwehr. Im Laufe der Evolution hat sich das Immunsystem zu einem komplexeren System ausgebildet. Vertebraten entwickelten eine zusätzliche adaptive Immunabwehr, die spezifisch auf einen Krankheitserreger reagieren kann und ein immunologisches Gedächtnis etabliert. Beide Komponenten des Immunsystems, die angeborene und die adaptive Immunabwehr, beruhen auf unterschiedlichen Wirkmechanismen, existieren aber nicht abgegrenzt voneinander sondern beeinflussen sich gegenseitig.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Werden die physikalischen und mechanischen Schutzbarrieren (Haut, Schleimhäute) des Körpers von einem Erreger überwunden, wird die angeborene bzw. unspezifische Immunabwehr an der Eintrittstelle des Pathogens in den Organismus aktiviert. Die angeborene Immunabwehr hat den großen Vorteil, dass sie sofort und ohne weitere Expansion der Zellen eine Art „erste Verteidigungslinie“ darstellt. Zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems gehören vor allem die phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (DC), außerdem die Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK). Pathogene besitzen bestimmte Muster und Molekülstrukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), die auf den körpereigenen Zellen nicht vorkommen. Die Immunzellen des angeborenen Immunsystems besitzen Oberflächenrezeptoren zur Erkennung dieser fremden Moleküle, die Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) (Mogensen 2009). Zu den PRRs gehören u.a. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR) (Chalifour 2004). Makrophagen nehmen Krankheitserreger durch Phagozytose auf, indem sie den Fremdkörper mit ihrer Zellmembran umschließen, wodurch ein großes intrazelluläres Vesikel, das Phagosom, entsteht. Das Phagosom verschmilzt anschließend mit Lysosomen zu einem Phagolysosomen, was mit dem Abtöten des aufgenommenen Mikroorganismus

einher geht. Dazu wird dieser einem niedrigen pH-Wert, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS; *reactive nitrogen species*, RNS) und hydrolytischen Enzymen ausgesetzt.

Neben den zellulären Komponenten spielt bei der unspezifischen Immunabwehr auch das Komplementsystem, ein System aus Plasmaproteinen, eine große Rolle und trägt ebenfalls zur Zerstörung von Krankheitserregern bei. Damit können die Zielzellen direkt durch Porenbildung in ihrer Zellwand lysiert oder durch Opsonierung für die Eliminierung durch Phagozyten markiert werden.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Die adaptive bzw. spezifische Immunabwehr wird zum größten Teil durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Diese sind in der Lage spezifische Antigene der Erreger zu erkennen und so gezielt und effektiv das Pathogen zu eliminieren.

Eine wichtige Rolle bei der Antigenerkennung spielen membrangebundene Glykoproteine, die HLA (*human leukocyte antigen)*- Moleküle, die vom Hauphistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) codiert werden. HLA-Klasse I Moleküle werden auf der Zelloberfläche fast aller kernhaltiger Zellen exprimiert und „präsentieren" Peptide aus Proteinen, die im Zytoplasma prozessiert wurden. So werden sowohl Peptide aus normalen, als auch aus viralen oder mutierten Proteinen präsentiert. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die Bindung des Peptids an das HLA-Klasse I Molekül. Der HLA-Klasse I-Peptid-Komplexes wird an die Zelloberfläche transportiert und von T-Zell-Rezeptoren (TCR, *T cell receptor*) der $CD8^+$ T-Zellen gebunden (Vyas 2008). Von den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), zu denen die Makrophagen, DC und B-Zellen gehören, werden HLA-Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert (Choo 2007). Sie präsentieren in der Regel Peptide, die von extrazellulären Erregern stammen, die z.B. durch Phagozytose aufgenommen und prozessiert wurden. Die HLA-Klasse II-Peptid-Komplexe werden vom TCR der $CD4^+$ T-Zellen gebunden (Cresswell 1994).

Die Bindung eines HLA, das ein fremdes Peptid präsentiert, durch den TCR einer T-Zelle führt zu deren Aktivierung. $CD8^+$ T-Zellen können ihre Zielzellen mit Hilfe von Perforinen und Granzymen lysieren, können aber auch über FasL (CD95L) Apoptose in der Zelle induzieren (Arens 2010). Daher werden sie auch als zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) bezeichnet. Zudem sezernieren $CD8^+$ T-Zellen Zytokine wie IFN (Interferon)-γ, das u.a. zur Steigerung der HLA-Klasse II Expression führt und

Makrophagen aktiviert. $CD4^+$ T-Zellen werden unterschieden in Th (*T helper*)1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren das für die T-Zellproliferation essentielle Zytokin IL (Interleukin)-2 sowie IFN-γ. Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die z.B. die Differenzierung und Aktivierung der B-Lymphozyten beeinflussen. Dadurch wird die auf der Bildung hochaffiner Antikörper basierende humorale Immunantwort unterstützt.

1.2 Infektionskrankheiten

Eine durch einen Erreger verursachte Erkrankung wird in der Regel als Infektionskrankheit bezeichnet. Das Ausmaß und die Symptomatik der Krankheit werden durch die Pathogenität und Virulenz des Krankheitserregers bestimmt, dabei ruft aber nicht jede Infektion zwingend eine Erkrankung hervor. Als Auslöser von Infektionen kommen viele Organismen in Frage wie Bakterien (Auslöser von z.B. Tuberkulose, Borreliose), Pilze (Aspergillose, Kandidose) oder Viren (Hepatitis, Masern). Viele Infektionskrankheiten wie Malaria und Toxoplasmose werden durch einzellige Protozoen verursacht. Typische Vertreter dieser parasitären Einzeller sind die humanpathogenen Leishmanien.

1.3 Der Parasit *Leishmania*

Im Jahre 1903 wiesen die Wissenschaftler William B. Leishman und Charles Donovan fast zeitgleich und unabhängig voneinander den Parasiten in der Milz von Patienten nach, der daraufhin nach seinen beiden Entdeckern als *Leishmania (L.) donovani* bezeichnet wurde (Bailey and Bishop 1959).

Leishmanien sind obligat intrazelluläre Parasiten, die der Klasse der Kinetoplastida zugeordnet werden. Der Grund hierfür, liegt in dem Vorhandensein des Kinetoplasten, der ein namensgebendes Merkmal für diese Gruppe ist. Der Kinetoplast liegt im Bereich des Basalapparates der Geißel und ist ein Mitochondriensegment bestehend aus einem dichten Netzwerk zirkulärer DNA-Moleküle.

Leishmanien werden durch weibliche Sandmücken (*Phlebotominae*) der Gattungen *Phlebotomus* (Asien und Afrika) und *Lutzomyia* (Mittel- und Südamerika) auf den Säugetierwirt (Mensch, Hund) übertragen (Liew and O'Donnell 1993).

Die Leishmanien zeichnen sich durch einen biphasischen Lebenszyklus aus. Sie kommen als 10-20 µm lange begeißelte promastigote Formen extrazellulär im Darmlumen des

Insektenvektors vor. Die Umwandlung in die kleinere, rundliche, amastigote Form (2 µm) erfolgt bei der Übertragung auf den Säugetierwirt, in dessen Wirtszellen sie sich intrazellulär vermehren. Das amastigote Stadium besitzt nur ein rudimentäres Flagellum, aufgrund dessen eine aktive Bewegung nicht möglich ist.

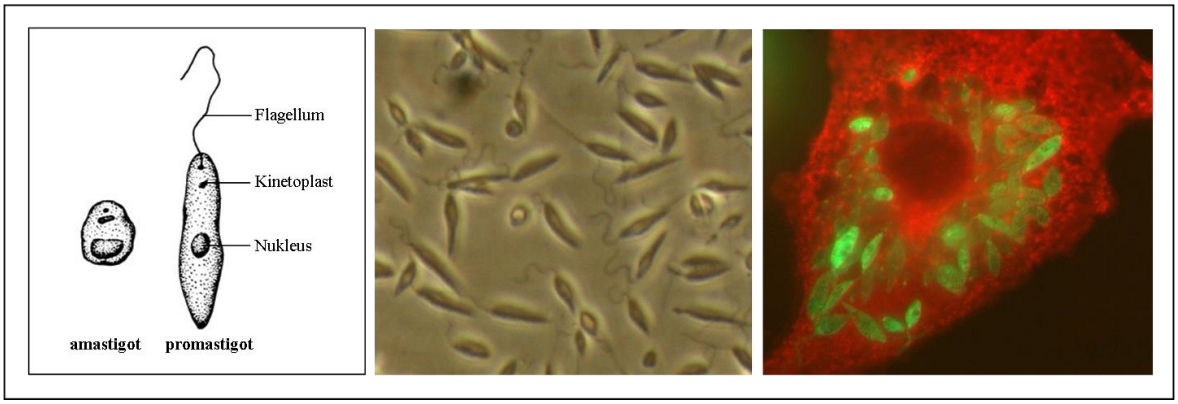

Abb.1.1 Erscheinungsformen von *Leishmania* Links: amastigote und promastigote Form (verändert nach http://www.spektrum.de); Mitte: promastigote Form von *L.major* (Diese Arbeit); Rechts: mit *L.donovani* infizierter Makrophage (Diese Arbeit)

1.3.1 Taxonomie von *Leishmania*

Innerhalb der Ordnung *Kinetoplastida* werden die Leishmanien der Familie der *Trypanosomatidae* zugeordnet. Ebenfalls zu dieser Gruppe angehörend und den Leishmanien am nächsten verwandt, sind die einzelligen Parasiten der Gattung *Trypanosoma*, die Erreger der Schlafkrankheit und Chagaskrankheit sind.

Bis jetzt konnten 30 Spezies von *Leishmania* identifiziert werden, von denen ca. 20 Spezies humanpathogen sind (Ashford 2000). Die Gattung Leishmania gliedert sich in die Untergattungen *Leishmania* und *Viannia*, bei denen die *Leishmania* Spezies verschiedenen Komplexen zugeordnet werden. Die Untergattung *Leishmania* beinhaltet Leishmanien aus der Alten (Mittelmeerraum, Asien) sowie der Neuen Welt (Zentral- und Südamerika), Spezies der Untergattung *Vianna* kommen nur in der Neuen Welt vor (Abb.1.2).

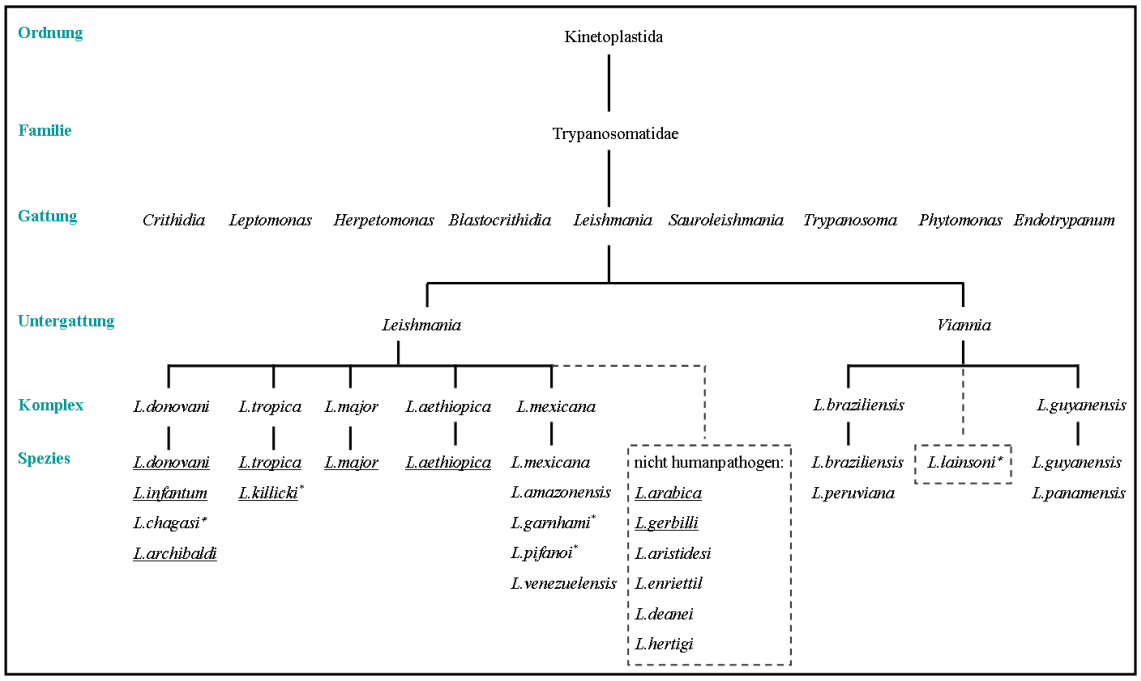

Abb.1.2 Taxonomie von *Leishmania* (verändert nach WHO 2010) Die unterstrichenen Spezies kommen in der Alten Welt vor. Die Zuordnung der mit * gekennzeichneten Spezies wurde 2010 noch diskustiert. Heute ist zumindest für *L.chagasi* eindeutig, dass es sich um einen *L.infantum* Import aus dem Mittelmeerraum handelt.

Die Zuordnung von Organismen zu verschiedenen Spezies erfolgte ursprünglich anhand von intrinsischen und extrinischen Kriterien (Lumsden 1974,1977). Extrinsische Kriterien umfassen die geographische Verteilung, die klinische Ausprägung sowie das Verhalten des Erregers in Kultur und in Versuchstieren. Intrinsische Kriterien beinhalten hingegen molekulare, immunologische und biochemische Aspekte. Eine geographische Klassifizierung der Erreger ist nicht aussagekräftig, da für einige *Leishmania*-Spezies mehrere endemische Regionen bekannt sind. So kommen z.B. in Bolivien *L.braziliensis*, *L.chagasi* als auch *L.mexicana* vor (Bastrenta 2003) und in Nordafrika wurden sowohl *L.infantum*, *L.tropica* und auch *L.major* beschrieben. Erschwert wird die Zuordnung durch den zunehmenden Reiseverkehr, da Leishmaniose-Patienten mehrere Endemiegebiete bereist haben können und dadurch auch Leishmaniosen in nicht-endemischen Gebieten beobachtet werden können (Bogdan 2001). Zudem können unterschiedliche Leishmania-Komplexe identische klinische Krankheitsbilder hervorrufen.

In den letzten Jahren sind verschiedene Techniken für die Unterscheidung sowohl zwischen als auch innerhalb der *Leishmania*-Spezies entwickelt worden, darunter die Charakterisierung von Isoenzymmustern, monoklonale Antikörper, Amplifikation von Kinetoplasten-DNA, sowie RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen)-Analysen und PCR-Fingerprinting (Rioux 1990, Kreutzer 1980, Grimaldi 1987, de Bruijn 1992, Schönian 1996). Die derzeitige Standardmethode zur Differenzierung von *Leishmania*-

Spezies ist die Multi Locus Enzym Electrophorese (MLEE) (Rioux 1990, Schönian 2010). Dabei werden die Arten aufgrund der Elektrophoresemobilität von Enzymen verschiedenen Zymodemen zugeordnet. Die MLEE beschreibt allerdings nur einen Phänotyp, einzelne Basensubstitutionen, die keinen Einfluss auf die kodierten Aminosäuren (AS) ausüben, werden nicht erkannt. Ebenfalls können Mutationen, wenn sie in nicht kodierenden Bereichen auftreten, nicht festgestellt werden. Die Methode ist zudem durch die notwendige Kultivierung der Parasiten sehr zeit- und arbeitsaufwendig (Spanakos 2008). Aus diesem Grund kommen vermehrt molekularbiologische Techniken zum Einsatz, die auf PCR basierten Methoden beruhen. Diese haben den Vorteil, dass sie auch den Genotyp charakterisieren können. Durch die Amplifikation der Erreger-DNA aus dem Gesamtgenom ist auch eine vorherige Kultivierung nicht mehr notwendig. Sequenzvergleiche und RFLP-Analysen von z.B. der 18S-rRNA (Uliana 1991), Cytochrome B (Luyo-Acero 2004), der gp63-Region (Mauricio 2001) sowie der „internal transcribed spacer“ (ITS)-Region (Cupolillo 1995, Kuhls 2005, Schönian 2001) haben sich für Stammtypisierungen als geeignet herausgestellt.

1.3.2 Lebenszyklus des Parasiten

Weibliche Sandmücken nehmen mit der Blutmahlzeit von einem infizierten Säugetierwirt Makrophagen auf, die amastigote Leishmanien enthaltenen. In den folgenden 12-24 h differenzieren die amastigoten Leishmanien im Mitteldarm der Mücke zu nicht-infektiösen prozyklischen promastigoten Formen und vermehren sich dort durch Zweiteilung. Die prozyklischen Leishmanien heften sich über ihr Hauptoberflächenmolekül, das Lipophosphoglykan (LPG), zwischen die Mikrovilli des Darmepithels und entgehen so der Ausscheidung aus dem Darm (Sacks 1994, Pimenta 1992). Nach weiteren 5-8 Tagen kommt es zur Metazyklogenese, die Umwandlung der avirulenten prozyklischen Formen in infektiöse metazyklische Stadien. Im Zuge dessen führt dieser Prozess zu Modifikationen der terminalen Zucker des LPG, wodurch die Leishmanien sich nicht mehr an das Darmepithel anheften können. Nach der Ablösung wandern die Parasiten in den Ösophagus und Pharynx, wo sie bei einer erneuten Blutmahlzeit in die Wunde regurgitiert und auf den Säugetierwirt übertragen werden.

Die promastigoten Leishmanien gelangen im Wirt in die Zellen des mononukleär-phagozytierenden Systems, hauptsächlich in die Makrophagen. Dort liegen sie zunächst in Phagosomen, die dann mit Lysosomen zu einem Phagolysosomen verschmelzen. Im sauren Milieu des Phagolysosom erfolgt die Differenzierung in die rundliche amastigote Form

durch Regression des Flagellums und Reduzierung der Zellgröße. Die Amastigoten werden innerhalb des Phagolysosom von einer parasitophoren Vakuole umgeben. Es folgt eine starke Vermehrung der Amastigoten durch Zweiteilung, bis es zur Lyse des Makrophagen kommt. Die freigesetzten amastigoten Leishmanien können dann weitere Zellen infizieren oder werden über die Blutbahn systemisch verteilt. Bei einem erneuten Biss einer Sandmücke nimmt diese die infizierten Zellen oder freie Parasiten aus dem Blut auf und der Kreislauf ist geschlossen (Abb. 1.3).

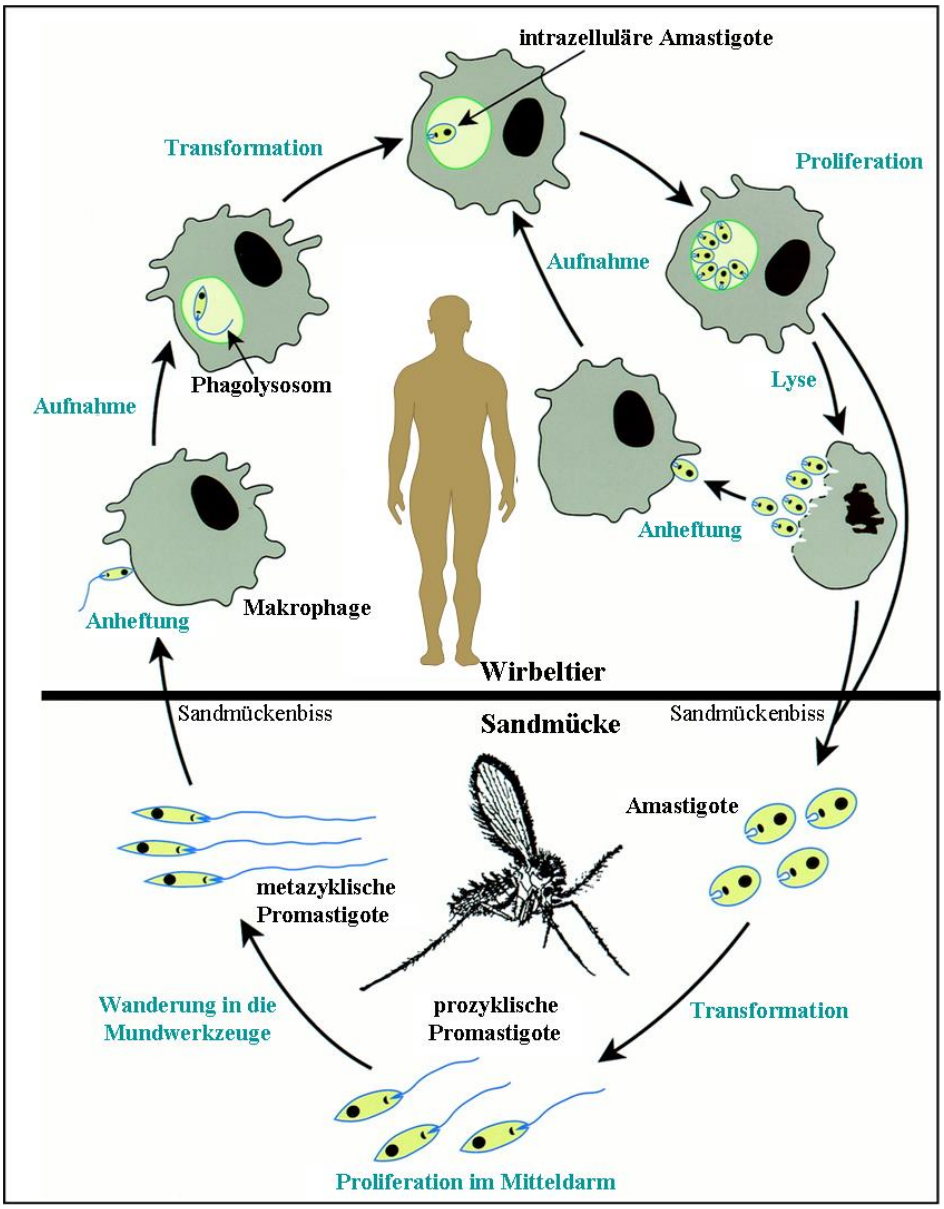

Abb.1.3 Lebenszyklus *Leishmania* (verändert nach Handman 2001) Metazyklische Promastigote werden durch den Biss der Sandmücke auf den Wirbeltierwirt übertragen. Durch Phagozytose werden sie von Makrophagen aufgenommen und wandeln sich dort im Phagolysosom in die unbegeißelte amastigote Form um. Sie vermehren sich durch Teilung und es kommt zur Lyse der Wirtszelle. Die freigesetzten Amastigoten befallen weitere Makrophagen oder gelangen über die Lymphbahn in den Blutkreislauf. Durch einen weiteren Sandmückenbiss werden aus dem Blut freie Parasiten oder infizierte Makrophagen von der Mücke aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücke wandeln sich die amastigoten Formen wieder in begeißelte promastigote Leishmanien um. Diese wandern zu den Mundwerkzeugen der Mücke, von wo erneut eine Infektion erfolgen kann und sie in einen neuen Wirt gelangen können.

1.3.3 Verbreitung und klinische Erscheinungsbilder von Leishmaniosen

Leishmanien sind Erreger von Infektionskrankheiten, die gemeinhin als Leishmaniosen bezeichnet werden. Je nach Spezies und Immunstatus des Wirtes können sie unterschiedliche klinische Manifestationen zeigen.
Leishmaniosen sind endemisch in 98 Ländern, mehr als 350 Millionen Menschen sind einem Infektionsrisiko ausgesetzt (WHO 2010). Die kutane Leishmaniose hat eine jährliche Inzidenz von 1-1,5 Millionen, für die viszerale Leishmaniose werden pro Jahr ca. 500.000 Neuinfektionen registriert (Desjeux 2004).

1.3.3.1 Kutane Leishmaniose

Die kutane Leishmaniose stellt die häufigste aber auch die mildeste Form der Ausprägung dar, da sie sich nur auf die Haut beschränkt. Erreger sind u.a. *L.major* und *L. tropica* in der Alten Welt und *L.mexicana* und *L.panamensis* in Regionen Zentral- und Südamerikas (McGwire 2013). Nach ungefähr 4 Wochen kommt es an der Einstichstelle der Sandmücke zur Entstehung einer juckenden Papel oder Beule, die sich zu einer ulzerierenden Läsion entwickeln. Medizinisch unterscheidet man bei der kutanen Leishmaniose zwischen zwei Formen. Bei der trockenen Form, die durch *L.tropica* hervorgerufen wird, bildet sich aus der Schwellung ein lokal begrenztes trockenes, brüchiges Geschwür. Die durch *L.major* verursachte feuchte Form der kutanen Leishmaniose zeigt die gleichen Anfangssymptome, jedoch bilden sich hier nässende Geschwüre, die sich auch auf weitere Hautareale ausbreiten können. Läsionen beider Formen bleiben einige Zeit bestehen, heilen aber meistens nach mehreren Monaten unter Verbleib einer Narbe ab.
In seltenen Fällen kann es durch Erreger wie *L.mexicana* und *L.aethiopica* zur Ausbildung einer diffusen kutanen Leishmaniose (DCL) kommen. Dabei kommt es ausgelöst durch Parasiten-haltige Makrophagen in der Haut zur Bildung von nicht-ulzerierenden Hautläsionen, die sich über den Körper verteilen (Lee, Hasbun 2003). Diese Form tritt vorrangig bei immunsupprimierten Patienten auf und zeigt keine Spontanheilung.
Eine chronische rezidivierende Leishmaniose (RL) tritt in einigen Fällen nach einer Infektion mit *L.tropica* vorwiegend im Iran und Zentralasien auf. Dabei bilden sich in der Nähe der abgeheilten Primärläsion rötlich-braune Papeln, die noch Jahrzehnte nach der Primärinfektion auftreten können.

1.3.3.2 Mukokutane Leishmaniose

Die Schleimhautleishmaniose oder auch Espundia ist vorwiegend auf den südamerikanischen Kontinent (Brasilien, Peru, Bolivien) beschränkt und wird durch Erreger wie *L.braziliensis* hevorgerufen (McGwire 2013).

Als Folge einer kutanen Leishmaniose kann die Krankheit auf die Schleimhäute übergehen, hauptsächlich sind die Nasen- und Rachenschleimhaut betroffen. Diese Form kann bereits während einer kutanen Leishmaniose oder erst Jahrzehnte nach Abheilung der Primärläsionen entstehen (Herwaldt 1999). Durch die Zerstörung der Haut und des Bindegewebes des Mund-Nasen-Rachen-Raums leiden die Patienten unter entstellenden Gesichtszügen. Zudem kommt es zur Behinderung der Atmungsfunktionen und Nahrungsaufnahme, unbehandelt kann diese Form der Erkrankung tödlich verlaufen.

1.3.3.3 Viszerale Leishmaniose

Bei der viszeralen Leishmaniose (VL), auch Kala-Azar genannt, handelt es sich um die schwerste Form der Erkrankung, da es zum parasitären Befall der inneren Organe kommt. Hauptsymptome sind hohes Fieber, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie. Die Krankheit verläuft unbehandelt fast immer tödlich, 20.000-40.000 Todesfälle werden pro Jahr registriert (McCall 2013). Mehr als 90 % der VL-Erkrankungen weltweit beschränken sich auf die Länder Indien, Bangladesh, Sudan, Äthiopien und Brasilien (Alvar 2012). Ausgelöst wird die Krankheit durch *L.donovani* (Alte Welt), *L.infantum* (Mittelmeerraum) und *L.infantum chagasi* (Neue Welt) (Goto 2004).

In einigen Fällen entwickeln Patienten nach einer behandelten VL eine Hautleishmaniose, bei der es zu nodulären, nichtpigmentierten (hypopigmentierten) Hauterscheinungen vorwiegend an Gesicht, Armen und Rumpf kommt, die mit Parasiten gefüllt sind. Diese Post-Kala-Azar Hautleishmaniose (*post-kala-azar dermal leishmaniasis*, PKDL) ist hauptsächlich bei mit *L.donovani* infizierten Patienten in Indien und Sudan zu finden. Jedoch sind im Sudan mit 50 % der Patienten deutlich mehr betroffen als in Indien und die Krankheit tritt auch schneller nach der VL auf (0-6 Monate) (Zijlstra 2003).

1.3.4 Diagnostik und Therapieformen von Leishmaniosen

Der Erregernachweis bei einer kutanen oder mukokutanen Leishmaniose wird erleichtert durch die Hautsymptomatik. Ein Abstrich oder eine Gewebeprobe wird aus dem Randbezirk des Hautgeschwürs bzw. des Ulcus entnommen. Bei Patienten mit viszeraler Leishmaniose ist der Erregernachweis etwas schwieriger, da ein Nadelaspirat oder eine Biopsie aus dem Knockenmark, der Leber oder der Milz entnommen werden muss. Aus dem Abstrich oder der Gewebeprobe kann der direkte Nachweis der Parasiten zum einen durch Kultivierung oder Giemsa-Färbung mikroskopisch erfolgen. Zum anderen ist mit Hilfe von PCR-Analysen auch schnell eine Identifizierung von *Leishmania*-DNA und zudem eine Speziesbestimmung möglich (Wortmann 2001, Singh 2006). Ebenfalls kommen immunologische Verfahren, die dem Nachweis von *Leishmania*-spezifischen Antikörpern und Antigenen dienen, bei der Diagnostik von Leishmaniosen zum Einsatz (Sundar 2002). Diese serologischen Testungen finden hauptsächlich nur bei viszeraler Leishmaniose Anwendung, da sie bei kutaner und mukokutaner Leishmaniose aufgrund der geringen humoralen Immunantwort häufig negativ ausfallen (Singh 2006, Ahluwalia 2004).

Zur Behandlung der meisten klinischen Formen von Leishmaniosen werden pentavalente Antimonpräparate wie Glucanthim (N-Methylglucamin-Antimonat) und Pentostam (Natriumstibogluconat) eingesetzt (Frezard 2009, McGwire 2013). Dabei blockiert z.B. Glucanthim ablaufende Fettsäure- und Glykolyseabbauvorgänge im Leishmanium. Die systemische Gabe von pentavalenten Antimonen erfolgt oft in Kombination mit anderen Medikamenten wie Allopurinol und Paromomycin (Esfandiarpour 2007, Momeni 2002, McGwire 2013). Die Heilungsraten sind mit über 90 % relativ hoch, jedoch ist die Behandlung mit den meisten verfügbaren Medikamenten zum Teil mit schweren Nebenwirkungen wie Leber– und Pankreasschäden verbunden. Daher ist eine ständige Beobachtung und Überwachung des Patienten während der Therapie nötig. Zudem hat der über Jahrzehnte konstante Einsatz der Antimon-Präparate zu Resistenzen der Parasiten geführt (Thakur 2001, Sundar 2001a, 2001b). Das Polyen Amphotericin B kommt als weiteres intravenös verabreichtes Medikament ebenfalls zum Einsatz, da es das Ergosterin der Parasitenmembran bindet, was zur Instabilität der Zellwände des Erregers führt. Liposomales Amphotericin B zeigt hierbei deutlich weniger toxische Nebeneffekte, ist aber mit sehr hohen Kosten verbunden, wodurch ein weitverbreiteter Einsatz des Therapeutikums limitiert wird (Barratt 2005). Das erst kürzlich entdeckte Miltefosin kann auch oral verabreicht werden und zeigt gute Heilungschancen bei kutaner, mukokutaner

und viszeraler Leishmaniose (Jha 1999, Sangraula 2003, Soto 2004 und 2009). Das Medikament kann aufgrund seiner nachgewiesenen teratogenen Wirkung bei Frauen im gebärfähigen Alter allerdings nicht angewendet werden (Bryceson 2001).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist weltweit kein Vakzin gegen *Leishmania* vorhanden, dass routinemäßig beim Menschen eingesetzt wird. Da die meisten Impfungen gegen humane Infektionskrankheiten darauf beruhen den Erreger durch Antikörper zu zerstören, war die Entwicklung einer Impfung gegen Leishmanien bislang schwierig. Die Parasiten leben intrazellulär geschützt in den wirtseigenen Makrophagen und bleiben so unerreicht für die Antikörper. Bedingt durch die enorme Ausbreitung der Infektionskrankheit beschäftigen sich seit vielen Jahrzehnten mehrere Forschergruppen mit der Entwicklung eines therapeutischen und prophylaktischen Impfstoffs. Konventionelle Methoden beruhten auf der Injektion lebender, virulenter Leishmanien („Leishmanization"), später ging man zu sichereren Vakzinierungsansätzen mit abgeschwächten oder abgetöteten Erregern über. Heutzutage konzentriert man sich auf Vakzine, die als rekombinante Proteine oder als Antigen-kodierende DNA verabreicht werden. Es wurden eine Reihe von potentiellen *Leishmania*-Antigenen identifiziert und bereits im murinen Modell der Leishmaniose in Vakzinierungsversuchen erfolgreich eingesetzt, darunter LACK (*Leishmania homologue of receptors for activated C kinase)*, LmSTI1 (*L. major homologue of the eukaryotic stress-inducible protein 1*) und TSA (*thiolspecific antioxidant)* (Mougneau 1995, Campos-Neto 2002, Webb 1998). Nur ein *Leishmania*-Vakzin wird derzeit bereits in klinischen Studien auf seine Sicherheit und Immunogenität getestet (Chakravarty 2011).
Unsere Arbeitsgruppe arbeitet in Zusammenarbeit mit internationalen Kooperationspartnern an einem *Leishmania*-Impfstoff, der auf die Aktivierung der für die Eliminierung der infizierten Zellen notwendigen T-Zellen abzielt. Das DNA-Vakzin LEISHDNAVAX besteht aus fünf in verschiedenen *Leishmania*-Spezies hochkonservierten Antigenen: TSA, CPA (*cysteine protease A*), CPB (*cysteine protease B*), P74 und Kmp-11 (*kinetoplastid membrane protein 11*) (Das 2014). Die Immunogenität der Antigene wurde zuvor mit T-Zellen von Patienten aus unterschiedlichen endemischen Regionen, die bereits eine kutane bzw. viszerale Leishmaniose überstanden hatten, überprüft. Für jedes der fünf Antigene konnten aktive T-Zellepitope identifiziert werden, die sowohl $CD4^+$- als auch $CD8^+$- T-Zellreaktionen induzierten. Mit Hilfe eines für die Th1-Zellaktivierung optimierten MIDGE® (Minimalistische immunologisch definierte Genexpression)-Th1 Genexpressionsvektors werden die Antigene in die Immunzellen transportiert

(www.mologen.com, Lopez-Fuertes 2002, Moreno 2004). Die Wirksamkeit und Verträglichkeit des LEISHDNAVAX wurde bereits in BALB/c Mäusen nachgewiesen. Immunisierte Mäuse zeigten nach Infektion mit *L.donovani* bis zu 94 % weniger Parasiten in der Leber und 92 % in der Milz im Vergleich zu nicht-geimpften Mäusen (Das 2014). Im nächsten Schritt sind klinische Studien mit LEISHDNAVAX vorgesehen.

1.3.5 Evasionsstrategien von *Leishmania*

Leishmanien haben viele Schutzmechanismen entwickelt, um der Immunabwehr des Wirts zu entgehen. Durch den Biss der Mücke gelangen die infektiösen metazyklischen Promastigoten in das Blutgefäßsystem des Säugetierwirts. Im Gegensatz zu den nicht infektiösen prozyklischen Promastigoten sind die metazyklischen Formen serumresistent und können der Komplement vermittelten Lyse entgehen (Bogdan 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der C5b-C9-Komplementkomplex zwar gebildet, aber spontan freigesetzt wird und nicht in die Membran der Leishmanien integriert (Puentes 1990). Es wird vermutet, dass die längeren LPG-Moleküle der metazyklischen Formen dabei eine Rolle spielen (Sacks 2002). Proteinkinasen wie LPK-1 (*leishmania protein kinase-1*) phosphorylieren die Komplementkomponenten C3, C5 und C9, wodurch der klassische und alternative Weg inhibiert wird (Hermoso 1991). Studien haben belegt, dass auch dem 63kDa großen Oberflächenprotein gp63 (auch als Leishmanolysin bezeichnet) eine entscheidende Funktion zukommt, indem es die Umwandlung von C3b in die C3bi ähnliche Komponente fördert (Brittingham 1995). C3bi wirkt als Opsonin für Leishmanien und bindet an den Komplementrezeptor CR3 auf Makrophagen, wodurch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme gefördert wird (Rosenthal 1996). Die Phagozytose über die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 erhöht das Überleben der Parasiten in der Wirtszelle durch eine Reduzierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch den Makrophagen (Wright 1983, Da Silva 1989, Mosser 1987). Eine Interaktion zwischen Parasit und Makrophage über gp63 kann aber auch durch andere Rezeptoren erfolgen wie Chemokin- und Fibronektin-Rezeptoren (Brittingham 1999).

Für einen erfolgreichen Infektionsprozess müssen die Leishmanien den mikrobiziden Abwehrmechanismen der Makrophagen erfolgreich entgegen wirken. Untersuchungen mit *L.donovani* und *L.major* zeigten, dass LPG, welches stärker auf promastigoten Leishmanien als auf der Oberfläche der amastigoten Formen exprimiert wird, essentiell für das Überleben der Parasiten im Makrophagen ist (Handman 1986, McNeely 1990). LPG verzögert die Phagolysosom-Biogenese indem es die Fusion von Phagosom und

Endosom blockiert (Desjardins 1997). Vermutlich gewinnt der Parasit dadurch Zeit für die Umwandlung in das amastigote Stadium, das resistenter gegenüber Enzymen und dem sauren pH-Wert des Phagolysosoms ist. Die Metalloproteinase gp63, welche eine starke proteolytische Aktivität im neutralen bis sauren pH-Wert besitzt, wird mit einem Schutz der Leishmanien vor Zytolyse und einem intra-phagolysosomalen Abbau in Verbindung gebracht (Ilg 1993, Seay 1996).

Die wichtigsten mikrobiziden Abwehrmechanismen der Makrophagen sind zum einen der sogenannte „oxidative burst", die Freisetzung von ROS über den Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)- Oxidase Komplex sowie zum anderen die Synthese des toxischen Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) (Bogdan 1998). Die Aktivierung der wirtseigenen Proteinkinase C (PKC) spielt bei der Enstehung der ROS eine entscheidende Rolle, indem sie den NADPH-Oxidase Komplex phosphoryliert. Glykoinositolphospholipide (GIPLs), eine Gruppe von Glykolipiden auf der Zelloberfläche von promastigoten und amastigoten Leishmanien, wirken hemmend auf die PKC (McNeely 1989). Ebenso konnte gezeigt werden, dass LPG eine supprimierende Wirkung auf die PKC hat (Descoteaux 1993, Giorgione 1996). Eine Hemmung der NO-Synthese konnte in mit GIPL und LPG behandelten murinen Makrophagen demonstriert werden, die zusätzlich mit IFN-γ stimuliert wurden (Proudfoot 1995 und 1996).

Die Parasiten können weiterhin eine Aktivierung der Makrophagen negativ beeinflussen, indem sie die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF-ß (*transforming growth factor ß*) und IL-10 fördern und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 hemmen (Melby 1994, Barral-Netto 1992, Carrera 1996). IL-12 spielt eine wichtige Rolle, da es Th1-Zellen zur IFN-γ Produktion anregt, welches wiederum Makrophagen zur intrazellulären Erregerabwehr aktiviert. Infizierte Makrophagen zeigen auf ihrer Oberfläche eine reduzierte Expression von HLA-Klasse II-Molekülen sowie co-stimulatorischer Moleküle, wodurch die Antigenpräsentation beeinträchtigt und somit eine erfolgreiche T-Zellstimulation inhibiert wird (Kaye 1994,Saha 1995).

1.3.6 Transkription und Regulation der Genexpression in Kinetoplastida

Eine Besonderheit zwischen Kinetoplastiden und anderen Organismen liegt in der Art ihrer Genregulation. Bei den meisten Eukaryoten stellt jedes Gen eine einzelne Transkriptionseinheit dar, die Transkription verläuft monocistronisch. Dabei werden die kodierenden Bereiche (Exons) von nicht-kodierenden Bereichen (Introns) getrennt. Jedes Gen unterliegt der Kontrolle eines Promotors, der die Transkription initiiert. Das Primärtranskript wird anschließend durch mehrere Reifungsprozesse modifiziert. Am 5'-Ende wird eine 7-Methylgyanosin-Kappe angeheftet, am 3'-Ende erfolgt die Synthese des poly(A)-Endes (Proudfoot 1989). Durch Entfernen der Introns entsteht durch den Prozess des cis-Spleissens die reife mRNA. Die mRNA verlässt durch die Kernporen den Zellkern und wird in das Zytoplasma transportiert.

Im Gegensatz zu der Mehrheit der eukaryotischen Organismen verläuft bei Kinetoplastiden die Transkription proteinkodierender Gene polycistronisch (Abb.1.4) (Johnson 1987,Calvillo 2003). Die Gene liegen auf den Chromosomen in Gruppen hintereinander, wobei die Gene durch kurze intergenische Regionen (IR) von einigen hundert Basenpaaren voneinander getrennt sind (Tschudi 1988). Sie bilden eine Transkriptionseinheit und werden gemeinsam von einem einzelnen Promotor als polycistronische Vorläufer-mRNA transkribiert. Der Prozess des cis-Spleissens ist hier nicht erforderlich, da die Gene keine Introns enthalten. Die intergenischen Regionen werden während der mRNA-Reifung entfernt und die Prozessierung der 5'- und 3'-Enden erfolgt. An die 5'- Enden der prä-mRNA-Moleküle wird eine RNA-Sequenz von 39 Nukleotiden Länge, die *spliced leader* Sequenz, angefügt. Dieser Vorgang wird als trans-Spleissen bezeichnet (Laird 1987, Parsons 1984, Kooter 1984). Die 3'-Enden der mRNA werden gleichzeitig polyadenyliert (Liang 2003, LeBowitz 1993, Ullu 1993). In den Transkriptionseinheiten der Kinetoplastiden konnten keine bekannten cis-aktiven Promotorelemente identifiziert werden. Die Aktivität der einzelnen Gene kann daher nicht wie bei höheren Eukaryoten und Prokaryoten auf der Ebene der Transkriptionsinitiation gesteuert werden. Die Genexpression muss hauptsächlich post-transkriptionell reguliert werden über die Stabilität bzw. Degradation der mRNA (Haile 2007). Es gibt Hinweise, dass Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen (UTR) der mRNA die Genexpression in Kinetoplastiden beeinflussen (Clayton 2002, Boucher 2002, Furger 1997, Hotz 1997).

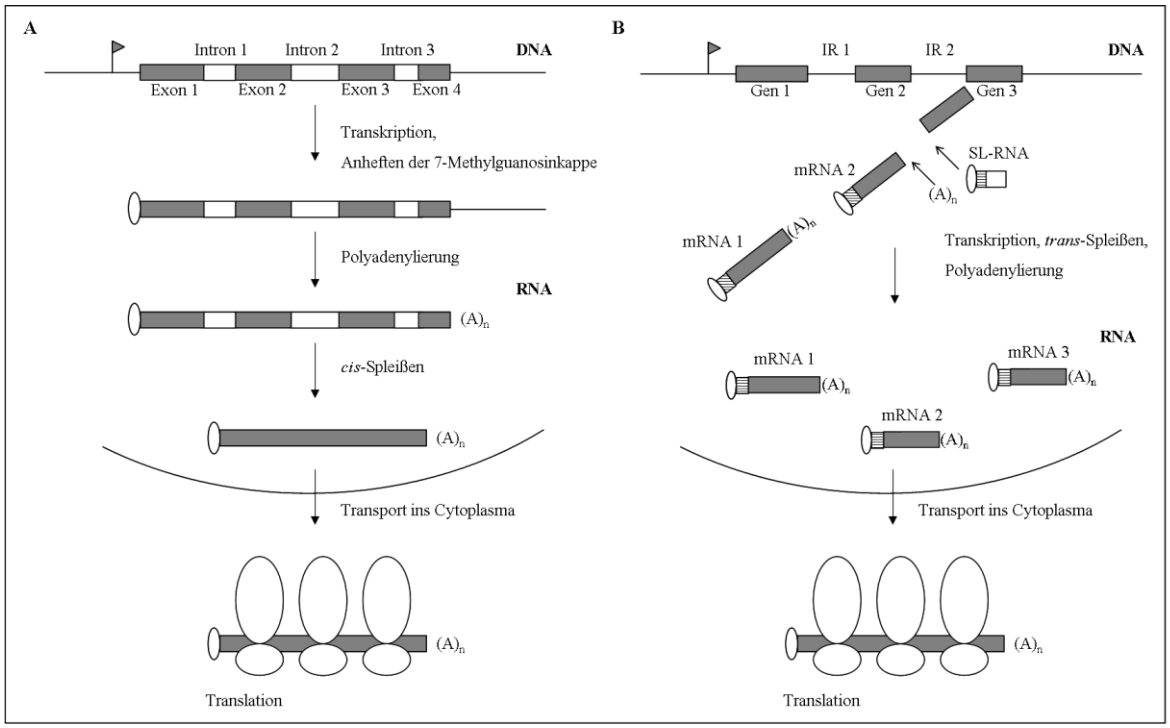

Abb.1.4 Vergleich der Genregulation in höheren Eukaryoten (A) und in Kinetoplastiden (B) Fahnen stellen Promotorregionen dar; graue Kästchen, kodierende Regionen; Ovale, 5' Kappen; $(A)_n$, Poly(A)-Enden; gestreifte Kästen, SL-Regionen; IR, intergenische Regionen (verändert nach Graham 1995)

1.3.7 Das Kinetoplastid Membran Protein 11

Das Kinetoplastid Membran Protein 11 (Kmp-11) wurde zuerst aus *L.donovani* isoliert, assoziiert mit Lipophosphoglykan- (LPG) Protein, dem Hauptoberflächenprotein der Parasiten (Jardim 1991, Tolson 1994). Daher wurde es zunächst als LPG-assoziiertes Protein (*lipophosphoglycan-associated protein*, LPGAP) bezeichnet (Jardim 1995a). Das nur 11kDa große Protein hat eine amphipathische Struktur und kommt nur in der Familie der Kinetoplastiden vor (Tolson 1994). Nachgewiesen wurde es neben Leishmanien in Trypanosomen, Crithidien sowie in Leptomonas (Stebeck 1995, Diez 2008). Aufgrund seiner weiten Verbreitung innerhalb der Kinetoplastiden wurde das Protein später in Kinetoplastid Membran Protein 11 umbenannt (Tolson 1994, Berberich 1997). Das Kmp-11 Protein ist hoch konserviert, z.B. weisen *L.major* und *L.infantum* 97 % Homologie in ihren Nukleotidsequenzen auf (Basu 2005, Bhaumik 2009).

Kmp-11 wird in allen Entwicklungsstadien der Leishmanien exprimiert. Mehrere Studien belegen, dass die Expression während der Differenzierung von der promastigoten zur amastigoten Form herabreguliert wird (Berberich 1998, Moreno 2003). Fluoreszenzmikroskopische Analysen promastigoter *L.infantum* mit einem anti-Kmp-11 Antikörper zeigen eine intensive Fluoreszenz, die verstärkt in der Flagelle und in der

Flagellentasche zu beobachten ist (Berberich 1998). In Trypanosomen scheint das Protein ebenso stadienspezifisch exprimiert zu werden, es findet sich in höheren Mengen in den prozyklischen Formen im Insektenwirt als in den Stadien im Wirbeltierblut (Stebeck 1995).

In den meisten *Leishmania*-Arten kommt das Kmp-11 Protein in drei Kopien im Genom vor, wobei jedes von einem offenen Leserahmen von 276 bp kodiert wird (Fuertes 1999, Berberich 1997, El Fadili 2009). *L.major* stellt mit nur zwei Kopien des Proteins die bis jetzt einzig bekannte Ausnahme dar. Der Kmp-11 Locus befindet sich bei den Leishmanien auf Chromosom 34 (*L.mexicana*, *L.braziliensis*) bzw. auf Chromosom 35 (*L.major*, *L.infantum*, *L.donovani*). Eigene Sequenzanalysen zeigten, dass in *L.donovani* und *L.infantum* zwei unterschiedliche Genkopien für Kmp-11 existieren, die in zwei unterschiedliche Proteine translatiert werden. Diese beiden Formen unterscheiden sich nur im C-terminalen Bereich, eine Form endet mit den AS YPSK, die andere mit NMCK (Abb.1.5).

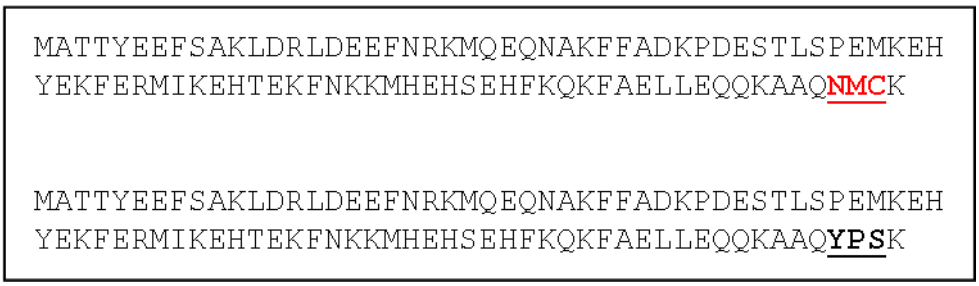

Abb.1.5: Verschiedene Formen des Kmp-11 Proteins in *L.infantum*

Die Funktion des Proteins ist bisher noch ungeklärt. Da das Protein nur innerhalb der Gruppe der Kinetoplastiden vorkommt und hoch konserviert ist, spielt es vermutlich eine wichtige Rolle in der Biologie der Parasiten (Berberich 1997, Thomas 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Kmp-11-Moleküle in der Zellmembran vergleichbar mit denen der LPG-Moleküle ist, was darauf hindeutet, dass das Protein eine wichtige Rolle im Aufbau und der Funktion der Parasitenmembran spielen könnte (Stebeck 1995 und 1996, Jardim 1995b). Western Blot und Elektronenmikroskopische Analysen in *Trypanosoma cruzi* ergaben, dass das Kmp-11 Protein mit dem Zytoskelett assoziiert zu sein scheint, wodurch das Protein eventuell eine wichtige Funktion bei der Fortbewegung und Mobilität der Parasiten erfüllt oder in andere Aspekte der Flagellenstruktur involviert ist (Moreno 2003,Thomas 2000) . Ein Knock-down des Kmp-11 Proteins in *Trypanosoma brucei* führte in den prozyklischen Formen zur Beeinträchtigung der Zytokinese, durch

eine Störung bei der Ausbildung einer neuen *flagellar attachment zone* (FAZ) und der Bildung des neuen Flagellums (Li 2008).

1.3.7.1 Kmp-11 als Antigen

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Kmp-11 Protein hoch immunogen ist, es stimuliert sowohl B- als auch T-Zellproliferation (Cuellar 2009, Diez 2006, Tolson 1994).
Kmp-11 wird von Zellen und Seren von Patienten mit unterschiedlich klinischer Ausprägung der Leishmaniose erkannt. So sind in Seren von Patienten mit viszeraler, mukokutaner als auch kutaner Leishmaniose IgG Antikörper gegen Kmp-11 nachweisbar (Ramirez 1998, Trujillo 1999, de Carvalho 2003). Untersuchungen bezüglich der Identifizierung von T-Zellepitopen haben die Existenz von potentiellen HLA-Klasse I und HLA-Klasse II T-Zellepitopen von Kmp-11 gezeigt, die spezifische zelluläre Immunantworten auslösen können. So konnten z.B. basierend auf der Kmp-11 Sequenz von *L.donovani* 30 HLA-Klasse I Epitope identifiziert werden, die in der Lage sind, humane $CD8^+$ T-Zellantworten zu induzieren (Basu 2007a, b). Daraus gewonnene Kmp-11 peptidspezifische T-Zelllinien erkennen *Leishmania*-infizierte Makrophagen, was bestätigt, dass Kmp-11 in der Zelle prozessiert und über HLA-Klasse I Moleküle präsentiert wird (Basu 2007b). Ebenso konnte die Präsentation von Kmp-11 Peptidsequenzen über HLA-Klasse II Moleküle von dendritischen Zellen gezeigt werden (Delgado 2003). BALB/c Mäuse, die mit Kmp-11-Peptid beladenen dendritischen Zellen vakziniert werden, zeigen eine protektive Immunantwort gegen *L.infantum* (Agallou 2011). Auch Vakzinierungen mit Kmp-11 DNA in Hamstern führen zu einer Zunahme der anti-Kmp-11 Antikörper, einer gesteigerten Kmp-11-spezifischen zytoxischen T-Zellantwort und einer schützenden Immunität (Basu 2005).
Aufgrund der nachgewiesenen Aktivierung des Immunsystems durch Kmp-11, ist das Protein ein vielversprechendes Kandidaten-Antigen für Therapie- und Vakzinationsansätze gegen Leishmaniose beim Menschen (Trujillo 1999, Basu 2007a, Carrillo 2008, Santos 2012).

1.4 Zielstellung

Das Kmp-11 Protein ist hoch immunogen, es stimuliert sowohl B- als auch T-Zellproliferation. Da es hochkonserviert in der Gruppe der Kinetoplastiden vorkommt, scheint es eine unverzichtbare Rolle in der Biologie der Parasiten einzunehmen. Aus diesem Grund stellt das Kmp-11 Protein ein vielversprechendes Antigen für Therapie- und Vakzinierungsansätze gegen Leishmaniose dar. Die Funktion des Proteins ist bisher aber noch ungeklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, durch eine molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des Kmp-11 in verschiedenen *Leishmania*-Spezies weitere Kenntnisse über dieses Antigen zu gewinnen. Hierzu soll eine vergleichende Analyse des Genlocus in verschiedenen *Leishmania*-Spezies durchgeführt werden. Durch Expression eines Kmp-11-Fluoreszenz-Konstrukts soll die subzelluläre Lokalisation von Kmp-11 untersucht werden. Weiterhin sollen Kmp-11 defiziente Leishmanien generiert werden, um eventuell Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu ziehen. Zudem soll durch Infektionsversuche mit humanen Makrophagen die Infektionsrate untersucht werden. Hierbei soll auch analysiert werden, ob sich eine Über- bzw. eine Reduzierung der Kmp-11-Expression unterschiedlich auf die Infektionsraten von Makrophagen auswirkt und ob sich daraus Korrelationen mit der Schwere der Krankheit ableiten lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
Accutase	Thermo Scientific, Bonn
Acetonitril	JT baker, USA
Acrylamid	BioRad, München
Agarose	Biozym, Oldenburg
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Sigma, Steinheim
B-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Gibco, Karlsruhe
Calcein AM	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Brilliant-Blue	Sigma, Steinheim
Cytochalasin D	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	GE Healthcare, München
DTT	Thermo Scientific, Bonn
Ethanol	J.T.Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom AG, Berlin
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, München
Fluoromount (HCOH)	Southern Biotech, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
G418	PAA, Cölbe
Glyzerol	Sigma, Steinheim
Hygromycin B	Roche, Mannheim
IPTG	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Luminol	Sigma, Steinheim
Medium 199	Sigma, Steinheim
Methanol	J.T.Baker, Griesheim
Milchpulver	BioRad, München
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Para- Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Steinheim
PBS (1 x + 10 x)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
PMA	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
Proteaseinhibitor- Cocktail	Sigma, Steinheim
Restore™ WB Stripping Buffer	Pierce, USA
RPMI 1640 + Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Merck, Darmstadt
Sodiumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

Sodiumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$-$5H_2O$)	Merck, Darmstadt
TEMED	BioRad, München
TFA	Sigma, Steinheim
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (10 %)	Thermo Scientific, Bonn
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	**Bezugsquelle**
Cryos 2 ml steril	Cryovial, USA
Einmal- Handschuhe	Terang Nusa, Malaysia
Einmal-Injektionskanülen 1,1 x 50 mm steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal 0,5 ml Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Einmal 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Einmal 2,0 ml Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nymbrecht
iBlot Gel Transfer Stacks	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney, Menasha
Pasteurpipette	Sarstedt, Nymbrecht
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Objektträger	Thermo Scientific, Bonn
Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen 14 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen 50 ml mit Schraubkappe	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundboden-Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
6 Well Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen 25 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen mit Filter 75 cm^2	Sarstedt, Nymbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nymbrecht
Einmal-Impfösen	Mercateo, München
Zahnstocher	Hygostar, Eresing
Elektroporationsküvette 4 mm	Cell Projects, Kent

2.1.3 Instrumente und Zubehör

Produkt	**Bezugsquelle**
Abzug	Thurm Labortechnik, Berlin
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Scotsman, Italien
Elektrophorese Power Supply	Pharmacia Biotech, Nymbrecht
ESI- MicroTOF-Q I	Bruker Daltonics, Bremen
FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen

Gelelektrophoresekammer	OWL Thermo Scientific, USA
iBlot®	Life Technologies, Darmstadt
Image Capture Computer	Cybertech, Frankfurt am Main
Las-1000	Fujifilm, Düsseldorf
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Mini Protean Electrophoresis System	BioRad, München
Nalgene™ Freezing Container	Nalgene, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Königshofen
Pipetten 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Frankreich
Pipettus Classic	Hirschmann, Eberstadt
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, USA
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
Reflex IV Massenspektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
Schüttler Promax 2020	Heidolph, Schwabach
Slide-A-Lyzer Dialyse-Kammer	Thermo Scientific-Pierce, Bonn
Sterilbank Antares	Biohit, Rosenbach v. d. Höhe
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge GS-6	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge (Speed Vac)	Thermo Savant, Sant Jose, USA

2.1.4 Antikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle	Anwendung
GFP	Ziege	-	1:500	Santa Cruz	WB
HIS	Maus	-	1:2000	Qiagen	WB
Kmp-11	Kaninchen	-	1:4000	Jaffe[1]	WB
Tubulin	Maus	-	1:1000	Santa Cruz	WB
IgG	Esel	HRP	1:2000	Santa Cruz	WB
IgG	Ziege	HRP	1:2000	Santa Cruz	WB
IgG	Maus	HRP	1:5000	Santa Cruz	WB
Clathrin	Maus	-	1:2000	Abcam	IF
IgG	Ziege	AF594	1:1000	Invitrogen	IF
HLAI	Maus	PE	1:20	BD	DZ
HLA-II	Maus	PerCP	1:20	BD	DZ

AF, Alexa Fluor; APC, Allophycocyanin; DZ, Durchflusszytometrie; IF, Immunfluoreszenz; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyl-Protein; WB, Western Blot
[1], bereitgestellt durch Pr. Dr. C. Jaffe (*Hebrew University of Jerusalem*, Israel)

2.1.5 Enzyme

Produkt	Bezugsquelle
GoTaq-Polymerase	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Kommerzielle Kits

Produkt	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Nucleospin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab, Erlangen
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Set	Invitrogen, Karlsruhe
Quant-iT DNA	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Vektoren

Bezeichnung	Referenz
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
Bluescript SK + II	Agilent Technologies, Santa Clara
Bluescript KS + II	Agilent Technologies, Santa Clara
pLEXSY-hyg2	Jena Bioscience, Jena
pLEXSY-hyg-YFP	Diese Arbeit
pLEXSY-Kmp11_YPSK-YFP-hyg	Diese Arbeit
pLEXSY-Kmp11_NMCK-YFP-hyg	Diese Arbeit
pBS-L3-YFP-hyg-L4	Diese Arbeit
pBS-L3-Cherry-neo-L4	Diese Arbeit

2.1.8 DNA- und Proteingrößenstandards

Produkt	Bezugsquelle
Spectra™ Multicolor LR	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained SDS-PAGE Standards, BR	BioRad, München
MagicMark™	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 100bp Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb	Fermentas, St. Leon-Rot

LR, Low Range; BR, Broad Range

2.1.9 Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotidprimer wurden von der Firma BioTez, Berlin bzw. von der Firma Sigma, Steinheim synthetisiert.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz (5'=>3')	T [°C]
Kmp-11 5'	TCAAGCTGCGCATAACACCCTC	57
Kmp-11 3'	AAGCACCGGCATGCACAAATATGC	57
Kmp-11 B rev	ACAAGTAAATATGTGTGGCTGATGGG	57
Kmp-11 C for	TCCAACAAATCGCCTTCTACTTTCAC	57
Kmp-11 C rev	TCTGCACTCTTCTCCTCCTTGG	57
pLEXSY for	TTTCCTTGCTGTGCCTTGCCAC	68
pLEXSY rev	ACGTGAAAGGAACAAGAAAGGAGG	68

M13 for	CAGGAAACAGCTATGAC	54
M13 rev	GTAAAACGACGGCCAG	54
Kmp-11 L1 for	TTATGAGGATGGCGCGAACGCC	69
Kmp-11 L1 rev	AAGAGCATTGGGTGAAGGGTAGTGC	69
Kmp-11 L2 for	TGATAGGAGCTTGGATTGCGCCG	69
Kmp-11 L2 rev	GAAAGGATCAGGACCAGAGCGG	69
Kmp-11 L3 for	TTTCGCACTCGAATGGCTTTGTG	70
Kmp-11 L3 rev	AGAGAGAACACGCTGCTGCTCT	70
Kmp-11 L4 for	CAAGATCATGTCTCGCAACCATC	70
Kmp-11 L4 rev	ACAGAGGCGAGATGCAGAGAAA	70
5'Kmp-11YPSK BglII	CCCGTGAGATCTATGGCCACCAC	61
3'Kmp-11 NMCK KpnI	TGTTTCTAGTGCGGTACCTTGCACATGTT	61
3'Kmp-11 YPSK KpnI	GTCCGGTACCATCTTGGACGGGTA	61
Neo 5'	AGGATCCATGATTGAACAAGATGG	57
Neo 3'	ACTAGTTCAGAAGAACTCGTCAAG	57
YFP 5'	ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC	68
YFP 3'	CCGACAAGCAGAAGAACGGCAT	68
Hyg for	TTCAGCGAGAGCCTGACCTATTG	68
Hyg rev	ATACACATGGGGATCAGCAATCGC	68
L1a	TGTATGTTGGGGTTTCCGGAGC	60
L2a	TGTGGTCCAACGCCTTTCAGG	60
5' UTR2 out	GTCGTCTGCCAGCTACAACCG	68
3' UTR2 out	CGGCCACAACCATTTCTTCAAGTATC	68
L3a	CGCCGTTGTATATGTATGCTTGG	67
L4a	TAATGAACACGTCAGGCGCTGACA	67
5'Kmp11 Y/N	ATGGCCACCACGTACGAGGA	62
3'Kmp11 YPSK	TACTTGGACGGGTACTGCGC	62
3'Kmp11 NMCK	TACTTGCACATGTTCTGCGC	62
5'HASPB	ATGGGAACTTCTTGTACAAAGGACTCCGCA	53
3'HASPB	GTTGCCGGCAGCGTGCTCCTTCGGCTGATC	53
5'TSA	AGCTTCAAGAAGATCAGCCTCG	57
3'TSA	AAAAGCCTCCAGCAGGCGC	57

2.1.10 Zelllinien, Bakterien, Parasiten

Zelllinien

Bezeichnung	Referenz
THP-1	ATCC-Nr. TIB-202 (Tsuchiya et al., 1982)

THP-1 Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukamie erkrankten Jungen isoliert.

Bakterien

Bezeichnung	Referenz
Top10F'	Invitrogen, Karlsruhe
XL-1 Blue	Stratagene, La Jolla USA
M15	Qiagen, Hilden

Leishmania

Parasit (Bezeichnung)	Bezugsquelle
L.donovani I (BHU2)	Roy[1]
L.donovani II (BHU5)	Roy[1]
L.donovani III (AG83)	Roy[1]
L.donovani IV (SUKA001)	Universität Khartoum, Sudan (2009)
L.major I	Schönian[2]
L.major II (CHV2)	Boussoffara[3]
L.major III (UTEHXI)	Universität Teheran, Iran (2009)
L.tropica I	Schönian[2]
L.tropica II (UTEH102)	Universität Teheran, Iran (2009)
L.infantum I (DREP08)	Boussoffara[3]
L.infantum II	Schönian[2]
L.aethiopica	Schönian[2]

[1], bereitgestellt durch Dr. S. Roy (*Indian Institute of Chemical Biology* Kolkata, Indien);
[2], bereitgestellt durch PD Dr. G. Schönian (*Institut für Mikrobiologie und Hygiene*, Charité Berlin)
[3], bereitgestellt durch Dr. T. Boussoffara (*Institut Pasteur* Tunis,Tunesien)

2.2 Medien, Puffer und Lösungen

2.2.1 Medien

- RPMI: RPMI 1640 Glutamax; 10 % hitzeinaktiviertes FCS; 1 % P/S (100 U/ml Penicillin,100 µg/ml Streptomycin)
- LB-Medium: 1 % w/v Trypton; 171 mM NaCl; 0,5 % w/v Hefeextrakt
- LB-Agarplatten: 1 % w/v Trypton; 171 mM NaCl; 0,5 % w/v Hefeextrakt; 1,5 % w/v Agar
- *Leishmania*-Medium: 20 % hitzeinaktiviertes FCS; 20 mM Hepes; 4 mM Natriumhydrogencarbonat; 1 % w/v M199 Medium; 0,02 % P/S
- Einfriermedium: 90 % hitzeinaktiviertes FCS; 10 % FCS

2.2.2 Puffer und Lösungen

Allgemein

- PBS: 1 mM KH_2PO_4; 0,1 M NaCl; 3 mM Na_2HPO_4-$7H_2O$, pH 7,4
- 10 x TBE: 0,5 M Tris; 0,01 M EDTA; 0,5 M Borsäure
- 1 x TBS: 150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 7,5
- Lysispuffer: 150 mM NaCl; 50 mM TrisHCl (pH 8,0); 1 % Triton X-100
- FACS-Puffer: PBS ohne Ca- und $MgCl_2$; 0,01 % Natriumazid; 0,1 % BSA
- Fixierlösung: 4 % Formaldehyd in PBS
- Permeabilisierungslösung: 10 % 10 x Permeabilisierungspuffer (eBioscience) in bidest H_2O

SDS-PAGE und Western Blot

- Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid
- SDS-PAGE Trenngelpuffer: 0,8 % SDS; 1,5 M Tris, pH 8,8
- SDS-PAGE Sammelgelpuffer: 0,4 % SDS; 0,25 M Tris, pH 6,8
- SDS-PAGE Laufpuffer: 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS; 0,025 M Tris, pH 8,3
- SDS-PAGE Probenpuffer: 5 % SDS; 10 % Glycerin; 0,06 M Tris, pH 6,8; 1 mg Bromphenolblau; 2 % ß-Mercaptoethanol
- Blot-Block-Puffer: 4 % Milchpulver in TBS; 0,05 % Tween
- Blot-Wasch-Puffer: 1 % TBS; 0,05 % Tween
- Ponceau S Lösung: 0,1 % Ponceau S; 5 % Essigsäure
- Coomassie Brilliant Blue: 0,05 % Coomassie Brilliant Blue; 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 40 % bidest H_2O
- Entfärbelösung: 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 40 % bidest H_2O
- Entwicklungslösung Lösung A: 200 ml 0,1 M Tris-HCL, pH 8,6; 50 mg Luminol
- Entwicklungslösung Lösung B: 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure; 10 ml DMSO

Silberfärbung

- Lösung A: 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 40 % bidest H_2O
- Lösung B: 5 % Methanol; 1 % Essigsäure; 94 % H_2O
- Lösung C: 0,2 g/L $Na_2S_2O_3$-$5H_2O$
- Lösung D: 0,2 g/100 ml $AgNO_3$
- Lösung E: 2 g/100 ml Na_2CO_3; 37 % HCOH; 2 ml/100 ml Lösung C
- Lösung F: 6 % Essigsäure

Proteinaufreinigung Ni-NTA

- Lysepuffer: 8 M Urea; 0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,01 M Tris-Cl, pH 8
- Waschpuffer: wie Lysepuffer, pH 6,3
- Elutionspuffer: wie Lysepuffer, pH 4,5

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Humane Zellen

Die Kultivierung der humanen Leukämie-Monozyten-Zelllinie THP-1 (ATCC-Nr. TIB-202) erfolgte in RPMI-Medium im Brutschrank bei 37°C und 8 % CO^2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

Leishmania

Die Leishmanien wurden in *Leishmania*-Medium bei 26°C im Brutschrank in fest verschlossenen Kulturflaschen kultiviert.

Bakterien

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte unter aeroben Bedingungen in sterilen Erlenmeyerkolben bzw. 14 ml Röhrchen. Als flüssiges Medium diente LB-Medium versetzt mit Selektionsantibiotika (Ampicillin: 50 µg/ml Endkonzentration, Kanamycin: 30 µg/ml Endkonzentration). Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln eines Rotationsschüttlers bei 37°C und 150-200 Upm.

2.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl, wurde von einer Zellsuspension 10 µl abgenommen und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Dabei wurden die lebenden Zellen aller vier großen Eckquadrate, die wiederum aus je 4 x 4 kleinen Quadraten bestehen, gezählt und der Mittelwert gebildet. Der Berechnungsfaktor zur Bestimmung der Zellzahl pro ml in der Zellsuspension ist 10000.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl (4 Eckquadrate)}}{4} \text{ x Verdünnungsfaktor x } 10000$$

Für die Zellzahlbestimmung der beweglichen Leishmanien wurden diese vorher in 4 %-igem Formaldehyd /PBS abgetötet.

2.3.3 Kryokonservierung

Leishmania und humane Zellen

Die Zellen wurden für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Diese wurden in einen Malgene^{TM} Cryo Freezing Container überführt und bei -80°C eingefroren. Diese Einfrierhilfe ist mit 250 ml Isopropanol gefüllt und hat den Vorteil, dass die Zellen in diesem Behältnis langsam auf -80°C abgekühlt werden (1°C pro min). Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Zellen danach bei -140°C gelagert.

Bakterien

Zur Konservierung von transformierten Bakterien wurden sie als Glyzerolstocks gelagert. Dazu wurden 500 µl Bakterienkultur mit 500 µl 40%-igem Glyzerol versetzt und zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.3.4 Auftauen von Zellen

Leishmania und humane Zellen

Die Zellen wurden kurz aufgetaut und dann aus dem Cryoröhrchen in ein 10 ml Medium enthaltenes 14 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 400 g zentrifugiert, um das in dem Einfriermedium enthaltene DMSO heraus zu waschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Medium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen.

Bakterien

Eingefrorene Bakterien wurden wieder in Kultur genommen, indem der Glyzerolstock auf Eis zunächst leicht angetaut wurde. Anschließend wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine geringe Menge entnommen und wieder in frisches LB-Medium aufgenommen.

2.3.5 Infektion von Makrophagen mit *Leishmania*

Für die Infektion mit Leishmania wurden die THP-1 Zellen in 12-Well-Platten in RPMI kultiviert und ü/N mit PMA (1µl/ml) stimuliert, um die Differenzierung der Makrophagen zu induzieren. Durch zweimaliges Waschen mit frischem Medium wurden das PMA und die nicht adhärenten Zellen entfernt. Zu den zu adhärenten Makrophagen differenzierten Zellen wurden metazyklische Leishmanien im Verhältnis 1:10 gegeben. Nach verschiedenen Infektionszeiten wurden die überschüssigen Leishmanien restlos durch

Spülen mit Medium entfernt. Zur Ablösung von der Oberfläche der Well-Platte wurden die infizierten Zellen für 5 min mit Accutase behandelt. Die abgelösten Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und resuspendiert.

2.3.6 Transfektion von *Leishmania*

10 ml einer spätlogarithmischen *Leishmania*-Kultur wurden bei 800 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Optimem Medium resuspendiert und die Zellen erneut bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Optimem resuspendiert und auf Eis für 10 min inkubiert. Eine Elektroporationsküvette und die zu transfizierende DNA (5-10 µg linearisierter Vektor) wurden ebenfalls auf Eis gestellt. Nach der Inkubationszeit wurden 450 µl der Zellsuspension zusammen mit der DNA in die gekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte durch zwei Impulse bei 1500 V und 25 µF. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann in 5 ml *Leishmania*-Medium aufgenommen und bei 26°C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden weitere 5 ml Medium hinzugegeben. Zur Selektion der Transfektanten wurden 50 µg/ml Hygromycin bzw. 20 µg/ml G418 dem Medium zugegeben.

2.3.7 Durchflusszytometrie

Mit einem Durchflusszytometer ist eine simultane Messung verschiedener Eigenschaften von Zellen möglich. Bei diesem Verfahren können Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Granularität oder der spezifischen Anfärbung analysiert werden. Mittels Überdruck werden die Zellen durch eine Messkammer gedrückt und beim Eintreten in diese mit einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich mögliche Zellaggregate auflösen. Die vereinzelten Zellen passieren den Strahl eines Argon-Lasers (Wellenlänge $\lambda = 488$ nm), wobei es an den Zellen zu einer Lichtstreuung kommt. Als Vorwärtsstreulicht oder „Forward Scatter“ (FSC) wird die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Laserstrahls bezeichnet, die im 90°-Bereich als Seitwärtsstreulicht oder „Side Scatter“ (SSC). Ersteres liefert Informationen über die Zellgröße, zweites korreliert mit der Granularität der Zellen. Durch vier Fluoreszenzkanäle (FL1-FL4) kann gleichzeitig zu diesen beiden Parametern Licht verschiedener Wellenlängen detektiert werden, was in der Analyse von fluoreszenzmarkierten Antikörpern Anwendung findet.

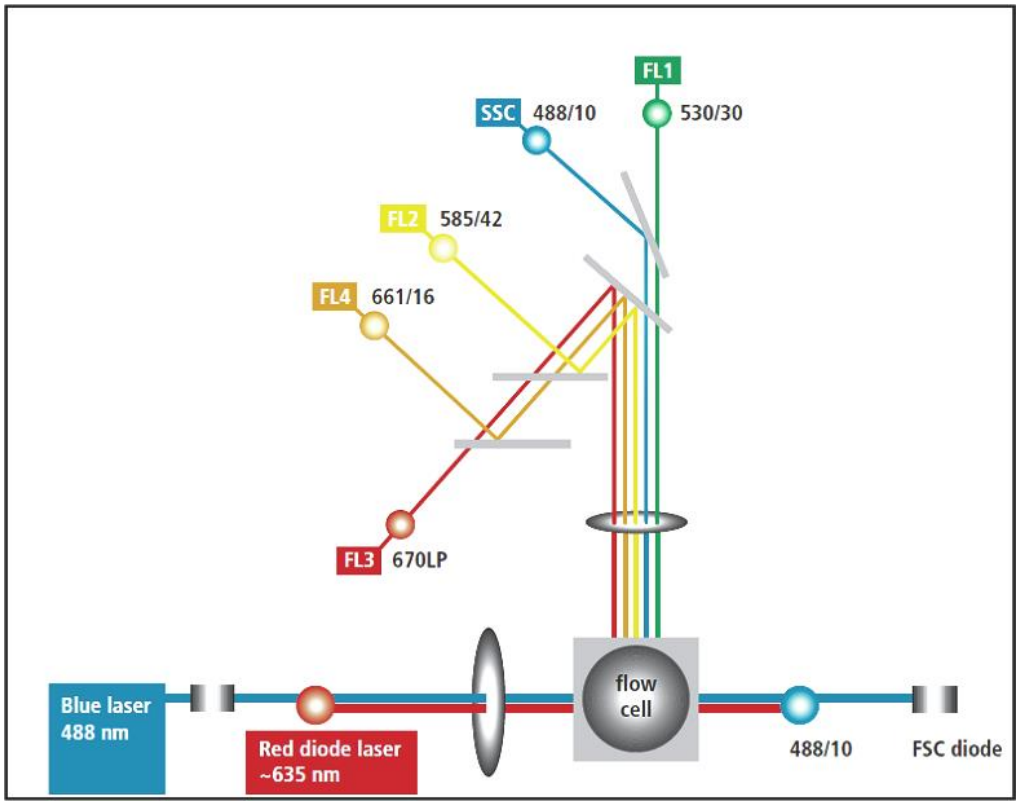

Abb.2.1 Optischer Aufbau eines FACS Calibur Durchflusszytometers (Becton Dickinson FACS Calibur, http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure)

Durchflusszytometrische Analysen von *Leishmania* wurden durchgeführt, um die Generationszeit zu bestimmen und die Expression des fluoreszierenden YFP der transfizierten Parasiten zu detektieren. Dazu wurden die *Leishmania* fixiert, gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert. Infizierte THP-1 Zellen wurden ebenfalls über die YFP-Expression identifiziert. Für die Bestimmung der HLA-Expression wurden die THP-1 Zellen für 30 min auf Eis mit einem anti-HLA I- bzw. anti-HLA II-Antikörper im Dunkeln inkubiert. Alle dargestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson) durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Software CellQuest (Becton Dickinson) verwendet.

2.3.8 Bestimmung der Generationszeit von *Leishmania*

Je 1 x 10^6 Leishmanien wurden mit 7 ml *Leishmania*-Medium in kleine Kulturflaschen überführt und im Brutschrank bei 26°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden je 3 x 100 µl der Kultur entnommen und in drei FACS-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 300 g wurden die Zellen in 4%-igem Formaldehyd für 10 min fixiert. Nach Zugabe von 500 µl PBS wurde erneut abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Mit

einem FACS Calibur wurde die Zellzahl pro 30 sec gemessen. Aus den Triplikaten wurde zu jedem gemessenen Zeitpunkt (t_0, t_1 nach 48 h, t_2 nach 72 h) ein Mittelwert berechnet, mit dem die Generationszeit g bestimmt wurde (Abb.2.2).

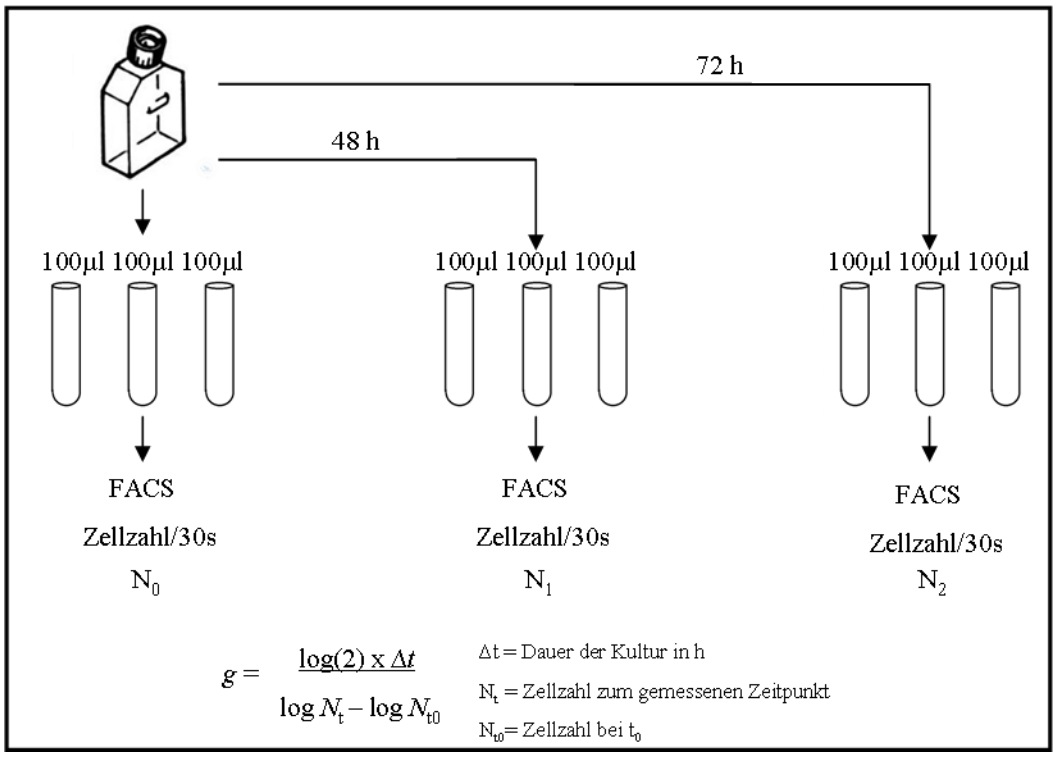

Abb.2.2 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Generationszeit von *Leishmania*

2.3.9 Calcein-Färbung

Zur besseren Identifizierung infizierter THP-1 Zellen wurden nicht fluoreszierende *Leishmania* mit Calcein AM (AM = Acetoxymethylester) gefärbt. Calcein-AM wird durch die Zellmembran in lebende Zellen transportiert, durch intrazelluläre Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppe entsteht das Farbmolekül Calcein. Durch Bindung mit Calcium fluoresziert es intensiv grün. Es wurden je 5×10^6 Leishmanien gewaschen und in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl einer 200 µM Calcein-AM Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben und die Zellen für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte und sofortige Infektion der THP-1 Zellen.

2.3.10 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Betrachtung von Fluoreszenzen wurden das ZEISS Axiovert und das ZEISS Axioplan Mikroskop genutzt.

Herstellung von Objektträgern für die Bestimmung der subzellulären Lokalisation

Die Leishmanien wurden bei 10000 g für 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Sie wurden anschließend mit DAPI für 5 min gefärbt, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Leishmanien wurden in 500 µl Fixierlösung aufgenommen und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Wasch- und Zentrifugationsschritt.

Die Zellen wurden mit einem anti-Tubulin-Antikörper (1:50 in Permlösung) für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde der Sekundärantikörper anti-Maus- IgG-Alexa 594 (1:1000 in Permlösung) hinzugegeben und für weitere 45 min im Dunkeln inkubiert. Das Pellet wurde nach erneutem Waschschritt in 30 µl Fluoromount G aufgenommen und auf einen Objektträger übertragen. Ein Deckgläschen wurde vorsichtig aufgelegt, um das Entstehen von Luftblasen zu vermeiden. Der Objektträger wurde für mindestens 4 h im Dunkeln aufbewahrt, damit das Fluoromount komplett aushärten konnte.

Herstellung von Objektträgern für die Infektion von THP-1 Zellen

In eine 6-Well Platte wurden Deckgläschen gelegt. Anschließend wurden sie zuerst mit 100 % igem Ethanol und danach mit PBS gewaschen. Die THP-1 Zellen in RPMI wurden auf die 6-Well Platte verteilt und ü/N mit PMA im Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium mit dem PMA entnommen und frisches Medium hinzugegeben.

Die Leishmanien wurden anschließend in 10-fachem Überschuss zu den Makrophagen gegeben und für 20 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde daraufhin abgenommen und es wurde in jedes Well 1 ml PBS und 5 µl DAPI pipettiert und im Dunkeln 5 min inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Zellen wurden mit 4 % igem Formaldehyd in PBS (1 ml/Well) für 25 min im Dunkeln fixiert. Es folgte die Hinzugabe des 1. Antikörpers anti-Clathrin 1:2000 in Permlösung verdünnt für 1 h bei RT im Dunkeln. Es folgten zwei Waschschritte mit PBS. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti-Maus-IgG -Alexa 594 1:1000 in Permlösung dazupipettiert und für 45 min bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nach erneuten zwei PBS Waschschritten wurde vorsichtig mit einer Kanüle das Deckgläschen aus der 6-Well-Platte herausgehoben und auf einen Objektträger mit 30 µl Fluoromount G als Einbettmedium gelegt. Der Objektträger wurde für mindestens 4 h im Dunkeln aufbewahrt, damit das Fluoromount komplett aushärten konnte.

Folgende Filter wurden verwendet:

FITC (Filterset 10):	BP 450-490, FT 510, LP 515-565
DAPI (Filterset 49):	BP 445/50, FT 395
Texasred (Filterset 00):	BP 530-585, FT 600. LP 615

BP: Band Pass, FT: Frequenzteiler, LP: Long Pass

Für die Auswertung wurde die AxioVision Software von ZEISS verwendet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit einer PCR ist es möglich mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) und einer thermostabilen DNA-Polymerase eine DNA-Sequenz in festgelegten Temperaturzyklen zu amplifizieren. Die PCR-Bedingungen sind abhängig von der verwendeten Polymerase, dem GC-Gehalt der Primer und der Nukleotidlänge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Beispiel ist das PCR-Programm für die Vervielfältigung der Kmp-11 Sequenz aus genomischer Leishmanien-DNA dargestellt.

PCR-Programm für die Amplifikation der Kmp-11 DNA

Schritt	Zyklusphase	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
1	Initiale Denaturierung	95	120
2	Denaturierung	95	30
3	Annealing	57	30
4	Elongation	72	45
5	Wiederholung der Schritte 2-4 29x		
6	Finale Elongation	72	600

2.4.2 Gradienten-PCR

Um eine optimale Anlagerungstemperatur der Primer zu gewährleisten und unspezifische Nebenbanden zu vermeiden, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dabei wurde im Thermocycler ein Temperaturgradient aus 12 kontinuierlich zunehmenden Annealing-Temperaturen längs des Thermoblocks angelegt. Durch anschließende Gelelektrophorese kann dann festgestellt werden, welche Temperatur das spezifische Signal liefert.

2.4.3 Kolonie-PCR

Um schnell zu überprüfen, ob Bakterien erfolgreich transformiert wurden, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Bakterienkolonie von einer LB-Platte gepickt und in 50 µl bidest H_2O resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min bei 94°C lysiert. Von jedem Bakterienlysat wurden dann 0,6-1 µl als Template für den PCR-Ansatz verwendet.

2.4.4 Agarose- Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-1,5 % verwendet, je nach erwarteter Fragmentlänge. Die entsprechende Menge Agarose wurde in einem kleinen Becherglas abgewogen und auf 50 g für ein kleines Gel bzw. 100 g für ein großes Gel mit 1x TBE aufgefüllt. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle aufgekocht solange bis ein schlierenfreies Gel entstand. Das Becherglas wurde erneut auf die Waage gestellt und mit bidest H_2O wurde auf das Anfangsgewicht von 50 g bzw. 100g aufgefüllt. Ein Rührfisch wurde dazugegeben und das Becherglas bei schwacher Umdrehungszahl für ca. 5 min auf einen Magnetrührer gestellt. Anschließend wurden 3 bzw. 6 µl einer 1 %- igen EtBr-Lösung hinzugegeben, das Gel im Becherglas vorsichtig geschwenkt und das Gel in eine Geltrageschale mit eingesetztem Kamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde die Geltrageschale in eine Elektrophoresekammer gelegt und die Proben wurden aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 80-130 V wurde die Elektrophorese gestartet. Anschließend erfolgte die Dokumentation des Gels bei UV- Licht mit dem Image Capture Computer der Firma Cybertech.

2.4.5 Restriktionsverdau

Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Die Inkubationszeit variierte je nach verwendetem Enzym.

Es wurden immer 20 µl Ansätze hergestellt.

DNA	x µl
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
bidest H_2O	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

2.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte bzw. Restriktionsverdau-Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und nach Herstellerangaben (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Ansätze wurden in 30 µl bidest H_2O eluiert.

2.4.7 Ligation

Es wurde immer ein 10 µl Ansatz aus T4-Ligase, Ligasepuffer, Insert und Vektor angesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Insert im Überschuss, verglichen mit dem geschnittenen Vektor, vorlag. Der Ansatz wurde für max. 1 h bei RT inkubiert.

2.4.8 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien (2.1.10) wurden vorsichtig aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte der Hitzeschock der Bakterien bei 42°C für 45 sec, die Bakterien wurden danach für 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und er wurde für 45 min bei 37°C auf den Schüttler gestellt. Zum Schluss wurden 50-100 µl auf eine LB-Amp- oder LB-Kan-Agarplatte ausplattiert und die Platte ü/N in eine Wärmekammer bei 37°C gestellt.

2.4.9 Plasmidisolierung

Plasmidpräparationen erfolgten mit dem Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) bzw. mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend nach Herstellerangaben. Dazu wurden für eine Minipräparation mit einem Zahnstocher gepickte Klone von einer LB-Platte in 3 ml Selektionsmarker enthaltenes LB-Medium überführt und ü/N bei 37°C und 180 rpm in einem Rotationsschüttler inkubiert. Für eine Midi wurde eine 200 ml LB-Übernachtkultur angesetzt. Minipräparationen wurden in 30 µl, Midipräparationen in 500 µl bidest H_2O eluiert. DNA-Konzentrationen wurden mit dem Qubit Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt.

2.4.10 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA von *Leishmania* wurde nach Herstellerangaben isoliert (peqGOLD Tissue DNA Mini Kit, Peqlab, Erlangen) und in 30-40 µl Elutionspuffer eluiert.

2.4.11 Klonierung des Kmp-11-Inserts in den Expressionsvektor pQE-30 zur Herstellung von His-getaggtem Kmp-11

Kmp-11 wurde aus genomischer DNA von *L.donovani* per PCR isoliert. Durch eine weitere PCR wurde eine BamHI- Schnittstelle am 5' Ende und eine HindIII-Schnittstelle am 3' Ende der Kmp-11-Sequenz angefügt. Mit diesen Schnittstellen wurde das Fragment in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE30 ligiert und kompetente M15 Bakterien damit transformiert. Die DNA wurde so in den Vektor kloniert, dass sie im gleichen offenen Leserahmen ist wie der im Vektor vorhandene His_6-Tag. Ein Bakterienklon wurde von der LB-Platte gepickt und in 50-100 ml LB-Flüssigmedium (100 µg/ml Ampicillin) in einem 500 ml Schickanekolben überführt und ü/N bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml wurden der Bakteriensuspension entnommen für die Herstellung einer Plasmidpräparation und dessen Sequenzierung. Die Proteinexpression wurde in der restlichen Bakterienkultur durch Zugabe von Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Qiagen) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie in zwei 50 ml Röhrchen überführt und 15 min bei 4000 g zentrifugiert.

2.4.12 Isolierung des His-getaggten Kmp-11 aus *E.coli*

Das HIS-Kmp-11 Protein konnte durch Affinitätschromatographie mit Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA Agarose) aufgereinigt werden, da Polyhistidin-Tags mit hoher Affinität an Nickelionen binden.

Das Bakterienpellet aus 2.4.11 wurde in Lysepuffer resuspendiert (4 ml pro g Nassgewicht) und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 10000 g für 20 min zentrifugiert. Zu je 4 ml Lysat wurden 1 ml Ni-NTA Agarose Beads hinzugegeben und das Gemisch wurde für 1 h bei RT rotiert. Das Lysat wurde auf eine Leersäule übertragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und nicht gebundene Proteine wurden mit 2 x 4 ml Waschpuffer von der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer eluiert und in vier Fraktionen je 250 µl aufgefangen. Um die Konzentration an Harnstoff zu reduzieren, wurden die Fraktionen mit dem Kmp-11 Protein in eine Dialysekammer (Slide A Lyser, Pierce) mit einem Cut-off von 7000 Dalton überführt und gegen Dialyse-Puffer (100 mM NaH2PO4, 10 mM Tris-Cl, 2 M Harnstoff, pH 7,2) für 24 h bei 4°C dialysiert. Der Dialyse-Puffer wurde nach 12 h gewechselt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Protein-Assay Kit bestimmt und die Reinheit der Probe wurde mit einer SDS-PAGE überprüft.

2.4.13 Überexpression von Kmp-11 in *Leishmania*

Die Kmp-11-YPSK Sequenz wurde per PCR (Kmp-11C for, Kmp-11C rev) aus genomischer DNA von *L.donovani* isoliert. Durch eine weitere PCR wurde an das Amplikons 5' eine BglII- und 3' eine KpnI-Schnittstelle angefügt. Gleichzeitig wurde mit den verwendeten Primern (5'Kmp-11 YPSK BglII, 3'Kmp-11 YPSK KpnI) das Stop-Codon der kodierenden Kmp-11-Sequenz entfernt. Anschließend wurde die Sequenz in einen pLEXSY-YFP-Vektor 5'-terminal vor die YFP-kodierende Sequenz kloniert, so dass nach der Translation ein Fusionsprotein Kmp-11-YPSK-YFP exprimiert wird. Nach erfolgter Linearisierung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease SwaI wurden *Leishmania* der Gattung *L.donovani* mit dem YFP-Fusionskonstrukt transfiziert, um eine Überexpression des Proteins zu erzeugen und die Lokalisation des Proteins in der Leishmanienzelle zu untersuchen. Gleiche Klonierungsstrategie wurde für das Kmp-11-NMCK angewandt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page). Die Acrylamid-Konzentration des Sammelgels betrug 4 %, die des Trenngels je nach zu untersuchendem Protein 10-15 %.

Zusammensetzung der Gele

- Trenngel (10 %) : 3,3 ml Acrylamidlösung, 2,5 ml SDS-PAGE Trenngelpuffer, 4,2 ml H_2O, 10 µl TEMED, 60 µl Ammoniumpersulfat
- Sammelgel (4 %): 1,3 ml Acrylamidlösung, 5,0 ml SDS-PAGE Sammelgelpuffer, 3,7 ml H_2O, 10 µl TEMED, 60 µl Ammoniumpersulfat

Die Gele wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurden die Proben mit SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Ein Proteingrößenmarker und die Proben und wurden auf das Gel geladen. Bei einer Stromstärke von 10 mA erfolgte die Anreicherung der Proben im Sammelgel, die Proteinauftrennung im Trenngel bei 15 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt, um die Proteinbanden zu detektieren oder es wurde ein Western Blot durchgeführt.

2.5.2 Western Blot

Für den Western Blot wurde das iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen) verwendet. Mit dieser Methode werden in 7 min Proteine von einem SDS-Gel auf eine Nylonmembran transferiert. Der erfolgte Transfer der Proteine wurde mit Ponceau S Lösung überprüft. Anschließend mussten zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Das Blockieren erfolgte in Blot-Blockpuffer für eine Stunde bei RT. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in Blot-Blockpuffer verdünnt auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C ü/N inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Blot-Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper, der mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war, wurde je nach Herstellerangaben in Blot-Blockpuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol bzw. dessen Derivate in seine oxidierte Form bei der eine Lumineszenz entsteht. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min mit Blot-Waschpuffer gewaschen und dann für 3 min in Entwicklungslösung (2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B, 0,6 µl Lösung C) im Dunkeln inkubiert. Die Lumineszenz wurde mithilfe des Lumineszenz-Analysers LAS-100 detektiert.

2.5.3 Coomassiefärbung

Nach erfolgter Proteinauftrennung wurde das Polyacrylamidgel für 45 min in Coomassie Brilliant Blue inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung solange gewaschen bis nur noch einzelne Proteinbanden sichtbar waren.

2.5.4 Silberfärbung

Das SDS-Gel wurde in Lösung A für 30 min inkubiert, gefolgt von 15 min in Lösung B. Anschließend wurde das Gel dreimal 5 min mit bidest H_2O gewaschen. Dann wurde für 90 sec Lösung C hinzugegeben und das Gel wurde dreimal für 30 sec mit bidest H_20 gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Lösung D für 25 min. Nach erneutem dreimaligem Waschschritt mit bidest H_2O wurde mit Lösung E für max. 10 min entwickelt. Die Reaktion wurde mit Lösung F gestoppt und das Gel mit H_2O gewaschen.

2.5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zwei Dimensionen zum Nachweis einer Dimerisierung des Kmp-11 Proteins

Für die erste Dimension wurde ein 13 %-iges Trenngel mit 4 %-igem Sammelgel (0,75 mm Dicke) gegossen. *L.donovani* Lysat wurde mit 3 µg aufgereinigtem HIS-Kmp-11-NMCK Protein gemischt. Die Probe wurde mit SDS-PAGE Probenpuffer ohne ß-Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95°C gekocht und auf das SDS-Gel geladen. Ohne reduzierende Reagenzien bleiben vorhandene Dimere erhalten und wandern im Gel entsprechend ihrer Gesamtgröße. Für die zweite Dimension wurde ein 15 %-iges Gel ohne Sammelgel (1 mm Dicke) hergestellt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die gesamte Spur wurde anschließend mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit Probenpuffer (+5 % ß-Mercaptoethanol) bei 60°C für 20 min inkubiert. Die Gelspur wurde auf das 15 %-ige Polyacrylamidgel gelegt. Zusätzlich wurde ein ungefärbter Protein-Standard hinzugegeben (3 µl in getrocknetem 13 %-igen Polyacrylamidgel). In der zweiten Dimension wandern die Proteine auch entsprechend ihrer Größe, aber durch die Zugabe von ß-Mercaptoethanol werden Dimere in Monomere gespalten. Nach der Elektrophorese das Gel gefärbt bzw. ein Western Blot durchgeführt.

2.5.6 Proteinbestimmung mit BCA Proteinassay

Die Proteinkonzentrationen wurden durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt (BCA Protein Assay, Thermo Scientific). Die Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren. Einfach positives Kupfer reagiert mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex, dessen Absorption im ELISA-Reader gemessen werden kann.

Die Leishmanienkultur wurden bei RT bei 800 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Lysis Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubationszeit wurde das Lysat kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurde zweimal für 5 sec sonifiziert und bei 4°C für 5 min mit 10000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde entnommen und für die Proteinbestimmung eingesetzt. Probe sowie die Eichlösung wurden in Duplikaten in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Für die Bestimmung wurde die Probe (10 µl, 1:10 verdünnt in Lysispuffer) mit 200 µl Reaktionspuffer (4 µl Lösung A + 196 µl Lösung B) inkubiert. Als Eichlösung diente eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 550 nm im ELISA-Platten-Reader vermessen. Mit

Hilfe der bekannten BSA-Konzentrationen konnte die Proteinmenge der Probe berechnet werden.

2.5.7 In-Gel-Verdau und Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie

Die mit Coomassie gefärbten Proteinbanden wurden aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und nach Zugabe von 100 µl Entfärberlösung (40 % Acetonitril, 60 % 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat) für 15-20 min im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen und der Entfärbevorgang so lange wiederholt bis die Coomassie-Färbung aus den Proteinbanden komplett entfernt war. Die entfärbten Gelbanden wurden im Lyophilisator getrocknet und anschließend mit 100 ng Trypsin in 30 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 37ºC für 6-12 h inkubiert. Der Überstand mit den durch den Trypsinverdau entstandenen Proteinfragmenten wurde entnommen und die noch in den Gelstücken vorhandenen Peptide wurden durch intensives Schütteln mit 50 µl 30 % Acetonitril/1 % TFA bei RT für 15-20 min eluiert. Der Elutionschritt wurde wiederholt. Die Eluate wurden im Lyophillisator getrocknet und anschließend in 20 µl 5 % Acetonitril/0,1 % TFA aufgenommen und für weitere massenspetrometrische Analysen verwendet.

Für die Messung mittels eines MALDI-TOF Massenspektrometers wurde 0,5 µl der Probe direkt auf einem MALDI-Target aufgetragen, mit 1 µl DHB Matrix (5 mg/ml in 0,1 % TFA) vermischt, eingetrocknet und anschließend mit dem Massenspektrometer MALDI-TOF Reflex IV analysiert. Die Proteinidentifizierung erfolgte mittels einer Peptid-Massfingerprint-Analyse (PMF). Dabei wurden die detektierten Peptidmassen mit den Massen, die durch den theoretischen Verdau der Proteine in der Datenbank generiert wurden, abgeglichen. Das Programm MASCOT wurde für die Datenbanksuche verwendet. Für die Proteinsequenzanalysen der Fusionsproteine mit YFP-Tag wurden die theoretischen Fragmente des Proteins mit Hilfe des Programms Sequence Editor 2.2 (Bruker Daltonics) generiert und mit den experimentellen Daten verglichen.

2.5.8 Aufnahme der MS-Spektren und Fragmentierung von Peptiden mit ESI-qTOF Massenspektrometrie

Ein Teil der Trypsin-verdauten Proteinproben wurden mit einem direkt an eine Nano-HPLC-Anlage gekoppelten Electrospray-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometers (ESI-qTOF-MS) analysiert. Die Probeninjektion wurde mittels Autosamplers ausgeführt. 5-10 µl der Probe wurde zuerst auf eine C_{18}-Vorsäule bei einer Flussrate von 20 µl/min

aufgetragen. Die anschließende Auftrennung der Peptide erfolgte über eine C_{18}-Nanosäule bei einer Flussrate von 220nl/min. Für die Elution der Peptide wurde folgender Gradient verwendet: 5-60 % B (min 0-60), 60-90 % B (min 60-65), 90 % B (min 68), 90 % B (min 70), 2 % B (min 80), (Eluent A: 1 % Acetonitril, 0,1 % FA in ultrareinem Wasser, Eluent B: 100 % Acetonitril, 0,1 % FA). Die Vermessung der MS- und MS/MS-Spektren wurde im vollautomatischen Modus und in einem Massenbereich von m/z 50 bis 2500 ausgeführt. Nach der Aufnahme des MS-Spektrums für 1 sec folgte die Fragmentierung der fünf intensivsten Ionen für 5 sec. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet. Um die erneute Fragmentierung der hoch abundanten Ionen zu verhindern und damit auch die Fragmentierung der weniger dominanten Peptide zu ermöglichen, wurden Ausschlusskriterien eingesetzt, sodass die Peptide, die bereits zweimal für die MS/MS-Analyse ausgewählt wurden, für 1 min nicht mehr fragmentiert wurden.
Für die Auswertung der Spektren wurde die Data Analysis 3.1 Software (Bruker Daltonics) verwendet. Die datenbankabhängige Identifizierung der Peptide erfolgte über BioTools 3.0 Software (Bruker Daltonics) und der Mascot Server 2.0 (Matrix, Science, UK). Die Suche in der Swissprot-Datenbank wurde mit einer Massentoleranz von 200 ppm für das Vorläuferion und 0,2 Da für die Fragmentmassen durchgeführt: Dabei wurde die Oxidation am Methionin als mögliche Modifikation der Peptide eingegeben.

2.6 DNA-Sequenzierungen und Sequenzanalysen

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma Meixner DLMBC (Berlin) durchgeführt. Vergleich und Analyse der Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit der Lasergene Software (DNASTAR) durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Aus mindestens drei unabhängigen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Populationsvergleich wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel berechnet. Die Signifikanz wurde mit der Student-t-Verteilung bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert $< 0,05$ [*], als hoch signifikant Werte mit einem p-Wert $< 0,01$ [**] angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich des Kmp-11 von *L.infantum* und *L.major*

Das 11 kDa große Kmp-11 Protein besteht aus 92 AS. Für einige *Leishmania*-Spezies konnte nachgewiesen werden, dass es durch drei hintereinanderliegende Kopien (hier als *Kmp-11A, B, C* bezeichnet) codiert wird (Berberich 1997, El Fadili 2009).

In *L.infantum*, dessen Genom bereits vollständig sequenziert wurde, beträgt die Größe des *Kmp-11* Locus (Kmp-11A-C) ca. 5,2 kb (Abb.3.1A). Der kb-Abstand zwischen *Kmp-11A* und *Kmp-11B* ist mit 2,7 kb deutlich größer als zwischen *Kmp-11B* und *Kmp-11C* (1,6 kb). *Kmp-11B* und *Kmp-11C* sind in der Nukleotidsequenz und damit auch in der AS-Sequenz identisch. Kmp-11A unterscheidet sich im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen nur im C-Terminus. Es endet mit der AS-Folge NMCK (Kmp-11-NMCK), Kmp-11B und -C mit den AS YPSK (Kmp-11-YPSK) (Abb.3.1B).

Der Parasit *L.major* stellt die bis jetzt einzig bekannte Ausnahme mit nur zwei *Kmp-11* Kopien dar, der *Kmp-11* Locus erstreckt sich in dieser Spezies über eine Länge von 2,2 kb (Abb.3.1A). Ein *Kmp-11A* ist nicht vorhanden, die zwei Kmp-11 Proteine sind identisch in ihrer AS-Sequenz mit Kmp-11B und -C von *L.infantum* und enden mit den AS YPSK (Abb.3.1B). Somit ist ein Kmp-11-NMCK in *L.major* nicht vorhanden. Der kb-Abstand zwischen Kmp-11B und -C entspricht mit 1,6 kb dem von *L.infantum*.

Sowohl in *L.infantum* als auch in *L.major* liegen zwischen den kodierenden *Kmp-11*-Sequenzen weitere offene Leserahmen, die aber nicht für die AS-Sequenz eines Proteins kodieren.

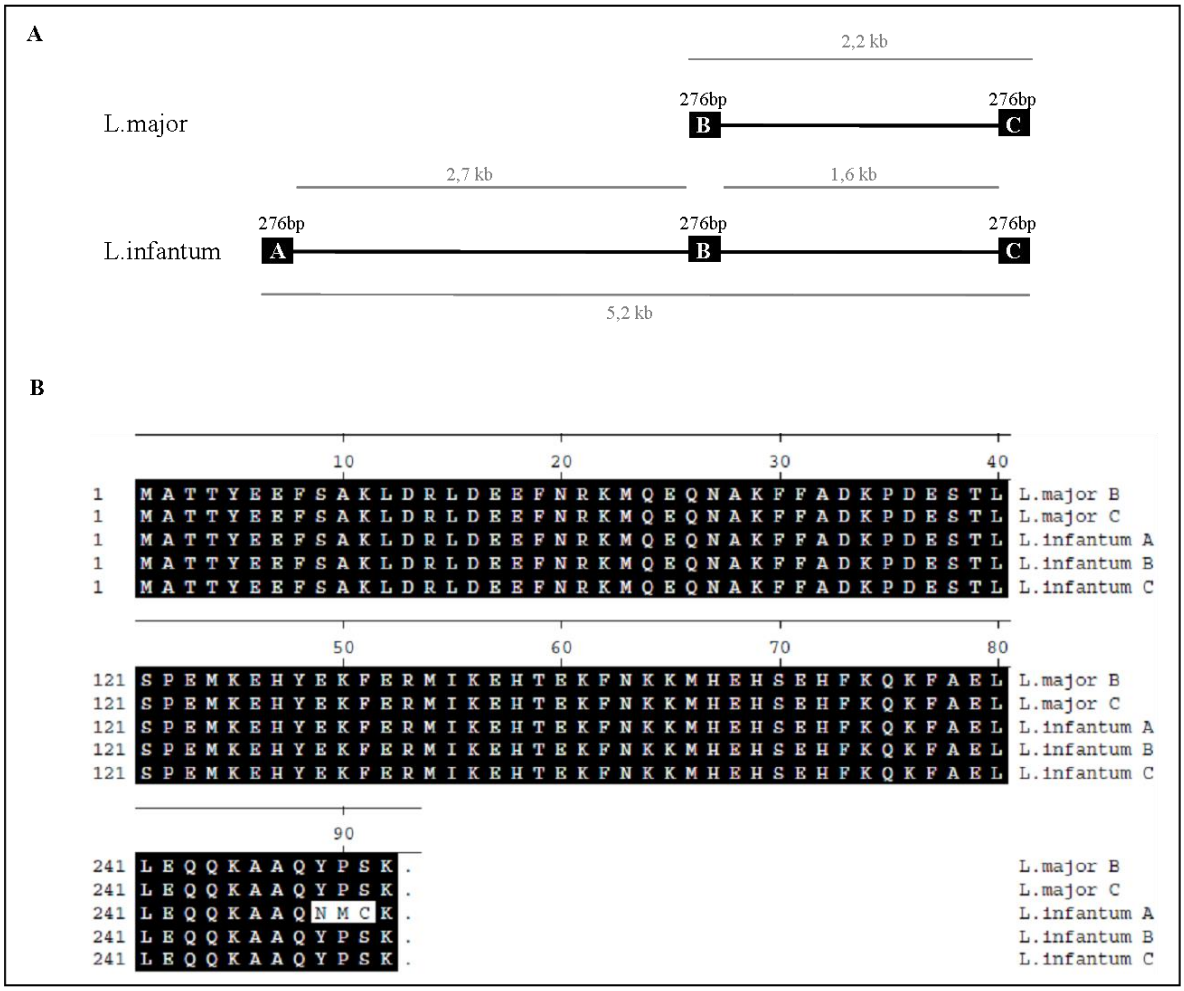

Abb.3.1 *Kmp-11* Locus von *L.major* und *L.infantum* A: Der *Kmp-11* Locus von *L.infantum* ist 5,2 kb lang und enthält 3 Kopien des *Kmp-11*. In *L.major* fehlt der vordere Teil mit dem *Kmp-11A*. B: Alignment der in *L.major* (L.major B, L.major C) und *L.infantum* (L.infantum A, L.infantum B, L.infantum C) vorkommenden Kmp-11 Proteine. Schwarz markiert sind die identischen AS. Weiß hervorgehoben sind abweichende AS. Grundlage der Analyse waren Genomdaten (GeneDB, NCBI) von *L.major* und *L.infantum* .

Die Analyse der Genomdaten von *L.major* und *L.infantum* zeigt, dass in verschiedenen Spezies von Leishmanien, der *Kmp-11* Locus unterschiedlich aufgebaut ist. Das Kmp-11 wird durch mehrere Sequenzen codiert, die im Fall von *L.infantum* zudem einen Polymorphismus aufweisen und zur Expression von zwei unterschiedlichen Varianten des Kmp-11 führen, einmal mit den C-terminalen AS YPSK und einmal NMCK.

Beim Vergleich der Genomdaten der mittlerweile sequenzierten Spezies *L.donovani* und *L.mexicana* zeigte sich auch hier ein Kmp-11-NMCK Protein (Tab.1) (Gene DB).

Tabelle 1: Kmp-11-NMCK in *Leishmania* (nach GeneDB)

Organismus/Bezeichnung	Proteinsequenz
L.donovani/ LdBPK_352250.1	MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQNMCK
L.infantum/ LinJ.35.2250	MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQNMCK
L.mexicana LmxM.34.2210	MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTDKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQNMCK

Der *Kmp-11* Locus von *L.mexicana* ist in Aufbau und Größe vergleichbar mit dem von *L.infantum*. Er besteht aus einem *Kmp-11-NMCK* gefolgt von zwei *Kmp-11-YPSK*. In *L.donovani* konnte ebenfalls das Vorkommen von *Kmp-11-NMCK* und *Kmp-11-YPSK* beobachtet werden. Das *Kmp-11-NMCK* liegt auch hier 5’ vor *Kmp-11-YPSK*, jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass es zwei *Kmp-11-YPSK* sind. Die Kmp-11-NMCK Proteine von *L.infantum*, *L.donovani* und *L.mexicana* sind in ihrer AS-Sequenz identisch.

3.2 Untersuchung des *Leishmania* - *Kmp-11* Locus in verschiedenen Spezies

Basierend auf den in Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnissen, wurde eine PCR-Strategie entwickelt, die eine Analyse des *Kmp-11* Locus weiterer, bisher nicht publizierter anderer Spezies von Leishmanien und eine Überprüfung der bereits publizierten Genomdaten ermöglicht.

Es wurde untersucht, inwieweit die *Kmp-11* Loci verschiedener *Leishmania*-Spezies Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Dazu wurden anhand des *L.infantum Kmp-11* Locus Oligonukleotide für jede der drei *Kmp-11* DNA-Sequenzen generiert (Abb. 3.2), die je ca. 60 bp vom 5’ bzw. 3’-Ende der kodierenden Sequenz liegen.

Abb.3.2 Oligonukleotidbindestellen für die Amplifizierung der *Kmp-11 A-C* Sequenz Dargestellt ist der *L.infantum Kmp-11* Locus nach GeneDB. Die drei Kmp-11 Nukleotid- und korrespondierenden AS-Sequenzen sind in blau dargestellt. Die Bindestellen für die Oligonukleotide (s. 2.1.9) sind schwarz unterstrichen.

Für die PCR- und Sequenzanalysen wurden Isolate folgender *Leishmania*-Spezies (s.2.1.10) verwendet:

- *L.donovani*
- *L.aethiopica*
- *L.tropica*
- *L.major*
- *L.infantum*

Diese Isolate wurden kultiviert und ihre genomische DNA isoliert. Die genomische DNA wurde für PCR-Analysen zur Amplifizierung der *Kmp-11A-C* Sequenzen mit den Oligonukleotiden aus Abb.3.2 eingesetzt. Dazu wurde für jedes der drei *Kmp-11* Gene eine separate PCR-Reaktion angesetzt. Genomische DNA von *L.infantum* diente als Positiv-Kontrolle. Die 5' und 3' *Kmp-11* Regionen von *L.major* weisen deutliche Abweichungen in der Nukleotidsequenz zum *L.infantum Kmp-11* Locus auf, sodass die Oligonukleotide nicht binden sollten und *L.major* daher als Negativ-Kontrolle galt.

PCR-Reaktionen mit genomischer DNA aus *L.infantum* Isolaten zeigten ein Amplikon für jede der drei *Kmp-11* DNA-Sequenzen (Positivkontrolle) (Abb.3.3). Bei drei unabhängigen *L.donovani* Isolaten konnten Amplikons in der erwarteten Länge von *Kmp-11A, -B* und *-C* nachgewiesen werden. Die Analyse der genomischen DNA von *L.aethiopica* und *L.tropica* zeigte ein vergleichbares, aber von *L.infantum* und *L.donovani* verschiedenes Bandenmuster, für die *Kmp-11A* und *-B* DNA konnten starke Signale detektiert werden, allerdings für die *Kmp-11C* Sequenz nur eine schwache Bande. Wie erwartet, kam es zu keiner Amplifikation der genomischen DNA von *L.major*, bis auf ein sehr schwaches Signal bei der PCR-Reaktion zur Vervielfältigung der *Kmp-11B* Sequenz.

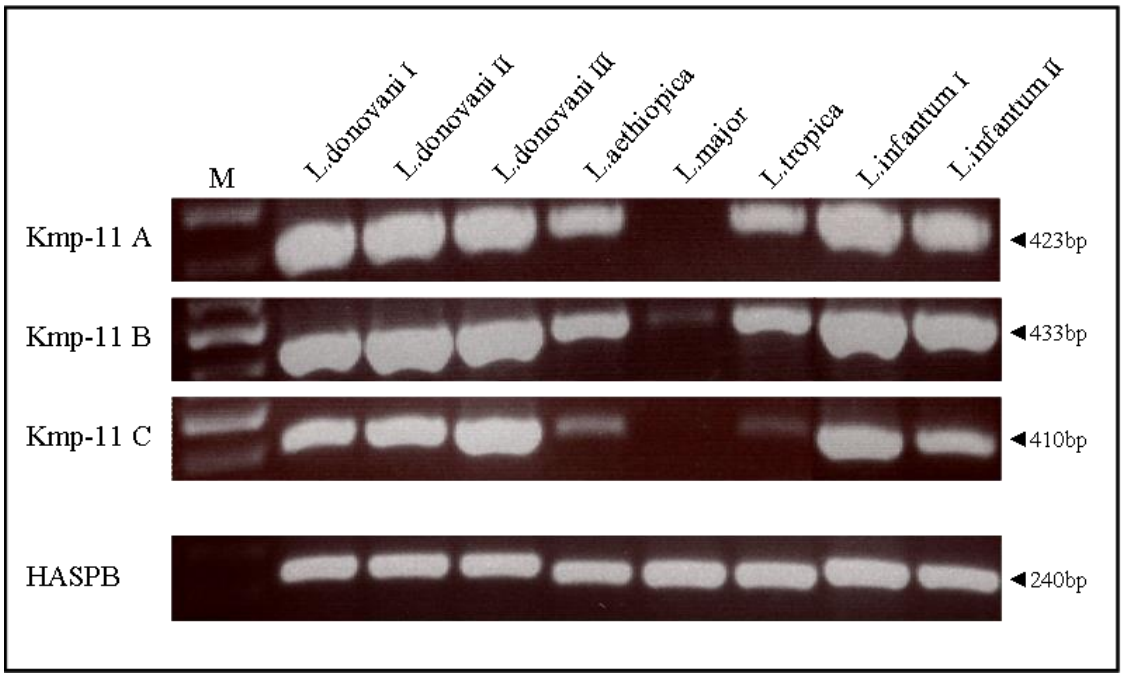

Abb.3.3 Kmp-11A-C Amplikons aus genomischer DNA von Leishmanien Genomische DNA wurde aus *Leishmania*-Isolaten isoliert und für eine PCR-Analyse mit Primern für die drei *Kmp-11* Sequenzen eingesetzt. Als Ladekontrolle diente eine PCR mit HASPB (*hydrophilic acylated surface protein B*)-Primern. Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. M:100 bp Marker

Die PCR-Analyse zeigte, dass die Untersuchung der genomischen DNA von *L.donovani*, *L.aethiopica* und *L.tropica* vergleichbare Signale wie für *L.infantum* hervorbringt, was darauf hindeutet, dass der *Kmp-11* Locus gleich aufgebaut sein könnte und ebenfalls drei Kopien des *Kmp-11* vorliegen.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde die PCR für *L.infantum*, *L.donovani*, *L.tropica* und *L.aethiopica* wiederholt. Die PCR-Amplikons wurden aus dem Agarosegel isoliert und mit den gleichen Primern, die auch für die PCR eingesetzt wurden, sequenziert. Die Analyse für die *Kmp-11A* Sequenz zeigte bei jeder amplifizierten DNA einen offenen Leserahmen von 276 bp. Die Nukleotidsequenzen von *L.infantum* und *L.donovani* waren identisch (Abb.3.4A). Auch die Sequenzen von *L.tropica* und *L.aethiopica* waren auf Nukleotidebene untereinander gleich. Im Vergleich zu *L.infantum* wurden bei *L.tropica* und *L.aethiopica* jedoch drei Nukleotidabweichungen detektiert (Position 171, 238 und 243).

Die DNA-Sequenzen wurden in AS-Sequenzen übersetzt und ebenfalls analysiert (Abb.3.4B). Die AS-Sequenzen aller vier *Leishmania*-Spezies waren 92 AS lang und entsprachen einer Kmp-11-NMCK Sequenz. Die AS-Sequenzen von *L.tropica* und *L.aethiopica* waren zu 98,9 % homolog zu der von *L.infantum* (bzw. *L.donovani*). Lediglich ein AS-Austausch an Position 80 (L (Leucin) zu V (Valin)) war zu beobachten. Für die AS 57 und 81 wirkte sich der Nukleotidaustausch (Position 171 und 243) nicht auf die abgeleitete AS-Sequenz von *L.tropica* und *L.aethiopica* aus, da der Austausch jeweils an der letzten Nukleotidbase des Tripletts war.

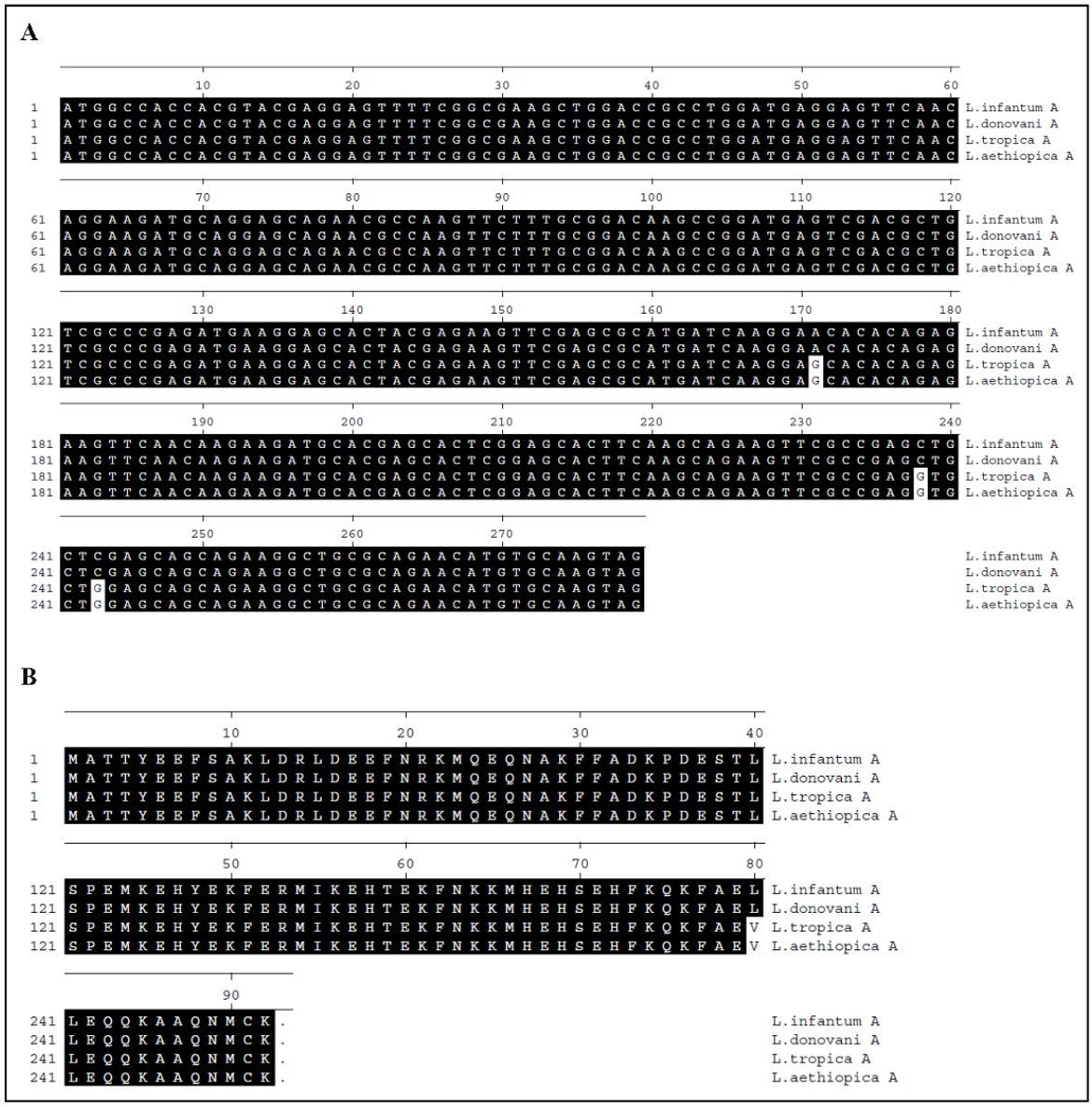

Abb. 3.4 Sequenzvergleich Kmp-11A Gezeigt ist der Vergleich der Nukleotid- (A) und AS-Sequenz (B) der amplifizierten DNA von *L. infantum*, *L.donovani*, *L.tropica* und *L.aethiopica* für Kmp-11A. Schwarz markiert sind die identischen Nukleotide und AS. Weiß hervorgehoben sind Sequenzabweichungen in Bezug zu den *L.infantum* Sequenzen.

Der Vergleich der *Kmp-11B* Sequenzen zeigte, dass es sich bei allen vier Sequenzen um eine *Kmp-11-YPSK* Sequenz handelte. Die Nukleotidsequenzen von *L.infantum* und *L.donovani* sind wie im Fall der *Kmp-11A* Sequenz identisch (Abb.3.5A). Die *L.tropica* Nukleotidsequenz weist im Vergleich zu *L.infantum* und *L.donovani* an den Basen 171, 243 und 270 jeweils ein Nukleotidaustausch auf, die auf die daraus abgeleitete AS-Sequenz aber keinen Einfluss hat. Bei der *L.aethiopica* Sequenz wurde neben den drei Nukleotidaustauschen noch ein vierter Basenwechsel an Position 29 detektiert, der sich auf die AS-Sequenz auswirkt und zu einem Austausch der AS an Position 10 von A (Alanin) zu G (Glycin) führt (Abb.3.5B).

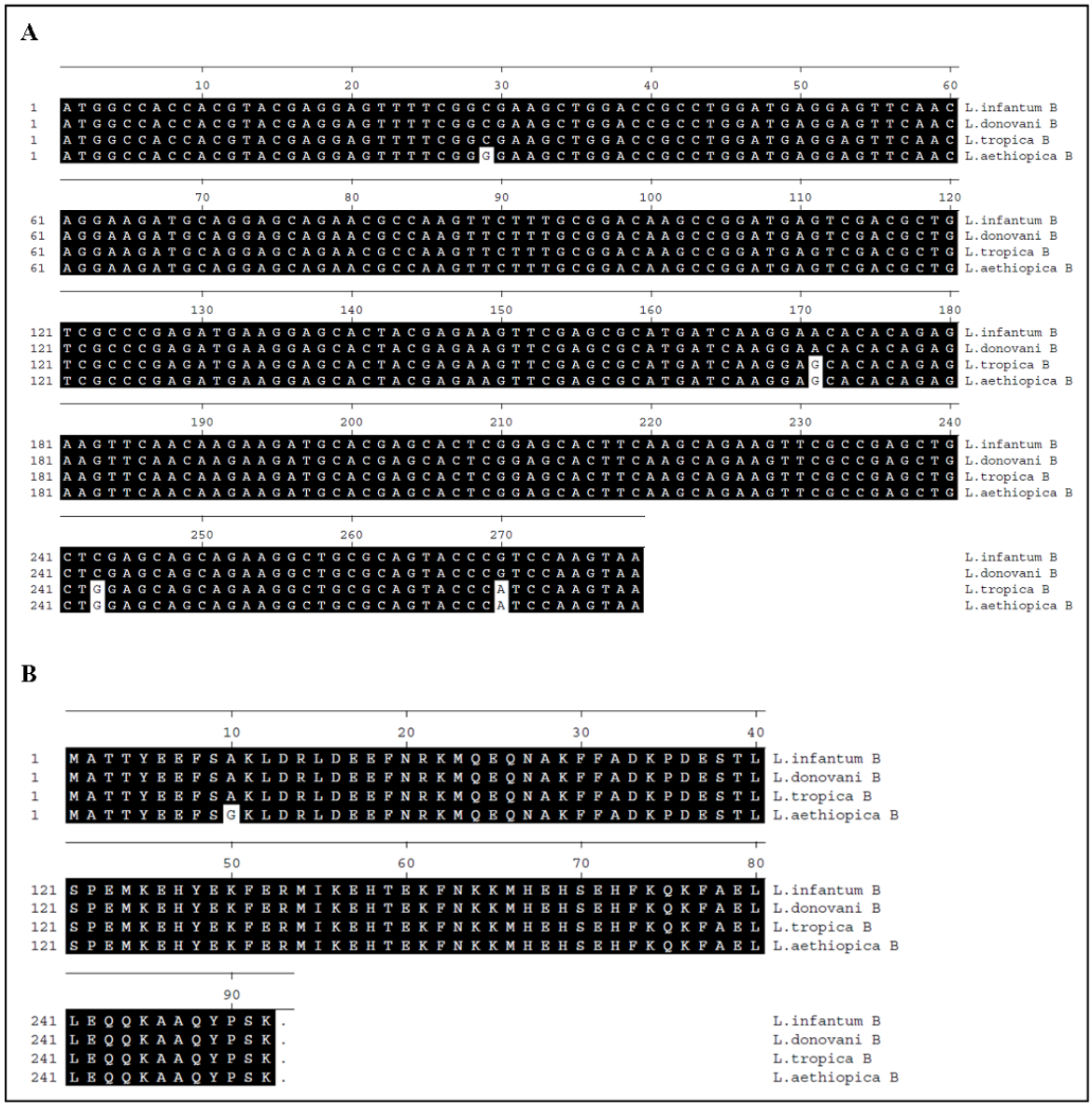

Abb. 3.5 Sequenzvergleich Kmp-11B Dargestellt sind die Alignments der Nukleotid- (A) und der AS-Sequenzen (B) der amplifizierten DNA von *L.infantum*, *L.donovani*, *L.tropica* und *L.aethiopica* für die Kmp-11B Sequenz. Schwarz markiert sind die identischen Nukleotide und AS. Weiß hervorgehoben sind Sequenzabweichungen in Bezug zu den *L.infantum* Sequenzen.

Die Kmp-11C Sequenzen für *L.infantum*, *L.donovani* und *L.tropica* waren identisch mit denen, die für die Kmp-11B Sequenzen beobachtet wurden (Abb.3.6A). Für die AS-Sequenz von *L.aethiopica* wurde ein Austausch an Position 33 (D (Asparaginsäure) zu G (Glycin) gezeigt als Folge des Nukleotidaustausch an Position 98 (Abb.3.6A, B).

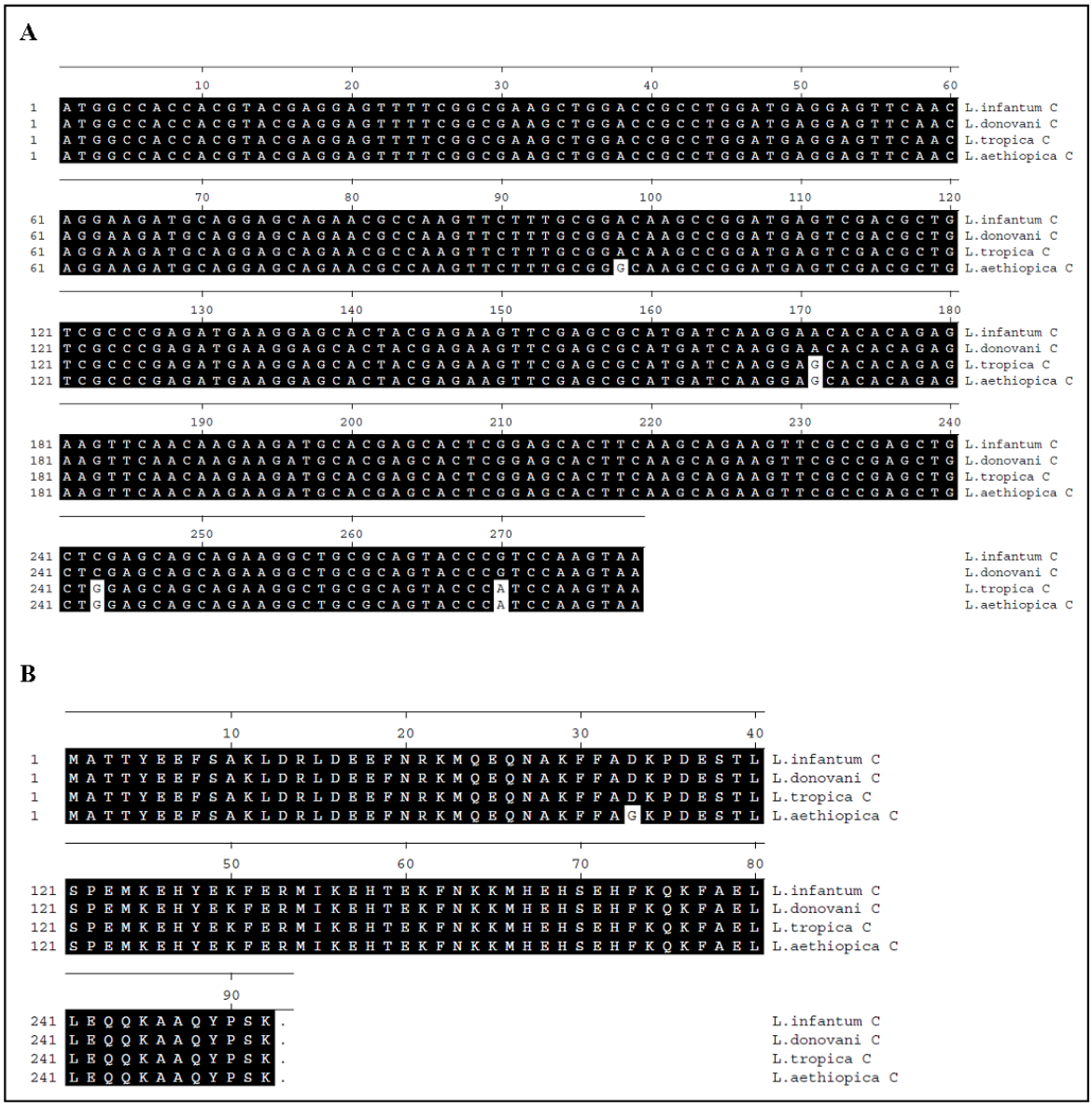

Abb. 3.6 Sequenzvergleich Kmp-11C Die Darstellung zeigt den Vergleich von Nukleotid- (A) und AS-Sequenz (B) der amplifizierten DNA von *L.infantum*, *L.donovani*, *L.tropica* und *L.aethiopica* für die Kmp-11C Sequenz.

Diese Sequenzanalyse bestätigte die Annahme, dass der *Kmp-11* Locus von *L.donovani*, *L.tropica* und *L.aethiopica* ähnlich dem des schon bekannten *L.infantum* aufgebaut ist. Es konnten alle drei Sequenzen, *Kmp11-A, B* und *C*, nachgewiesen werden.

Durch die Sequenzanalysen konnte auch eine hohe Konserviertheit der *Kmp-11* Sequenzen bei mehreren *Leishmania*-Spezies gezeigt werden. Die Nukleotidsequenzen von *L.infantum* und *L.donovani* waren für alle drei *Kmp-11* Sequenzen identisch. Die Sequenzen von *L.tropica* und *L.aethiopica* weisen bei allen Sequenzen gemeinsame Nukleotidabweichungen auf, was für eine nähere phylogenetische Verwandtschaft der beiden Spezies zueinander spricht, als zu *L.infantum* und *L.donovani*. Die Untersuchungen zeigen erstmals auch das Vorhandensein von *Kmp-11-NMCK* Sequenzen im Genom von

L.tropica und *L.aethiopica*, was für diese beiden Spezies zuvor noch nicht beschrieben wurde. Zudem konnten sowohl bei *L.donovani*, *L.tropica* als auch bei *L.aethiopica* zu der *Kmp-11-NMCK* Sequenz erstmals auch zwei *Kmp-11-YPSK* Sequenzen gefunden werden, was die Annahme bekräftigt, dass der *Kmp-11* Locus ähnlich dem von *L.infantum* aufgebaut ist.

Um eine einfache und schnelle Analyse der beiden unterschiedlichen *Kmp-11* Sequenzen (*Kmp-11-NMCK* und -*YPSK*) zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine PCR-Strategie entwickelt, die eine Unterscheidung zwischen *Kmp-11-NMCK* und -*YPSK* erlaubt. Dazu wurden Oligonukleotide designt, die nur die 5'- und 3'- Bereiche der *Kmp-11*-Sequenzen umfassen (Abb.3.7A).
Bei der PCR konnten für Isolate von *L.donovani*, *L.infantum*, *L.aethiopica* und *L.tropica* starke Signale für die *Kmp-11-YPSK* Sequenz sowie für die *Kmp-11-NMCK* Sequenz detektiert werden (Abb.3.7B). Die PCR mit genomischer DNA von zwei *L.major* Isolaten lieferte nur für die Sequenz von *Kmp-11-YPSK* ein Signal.

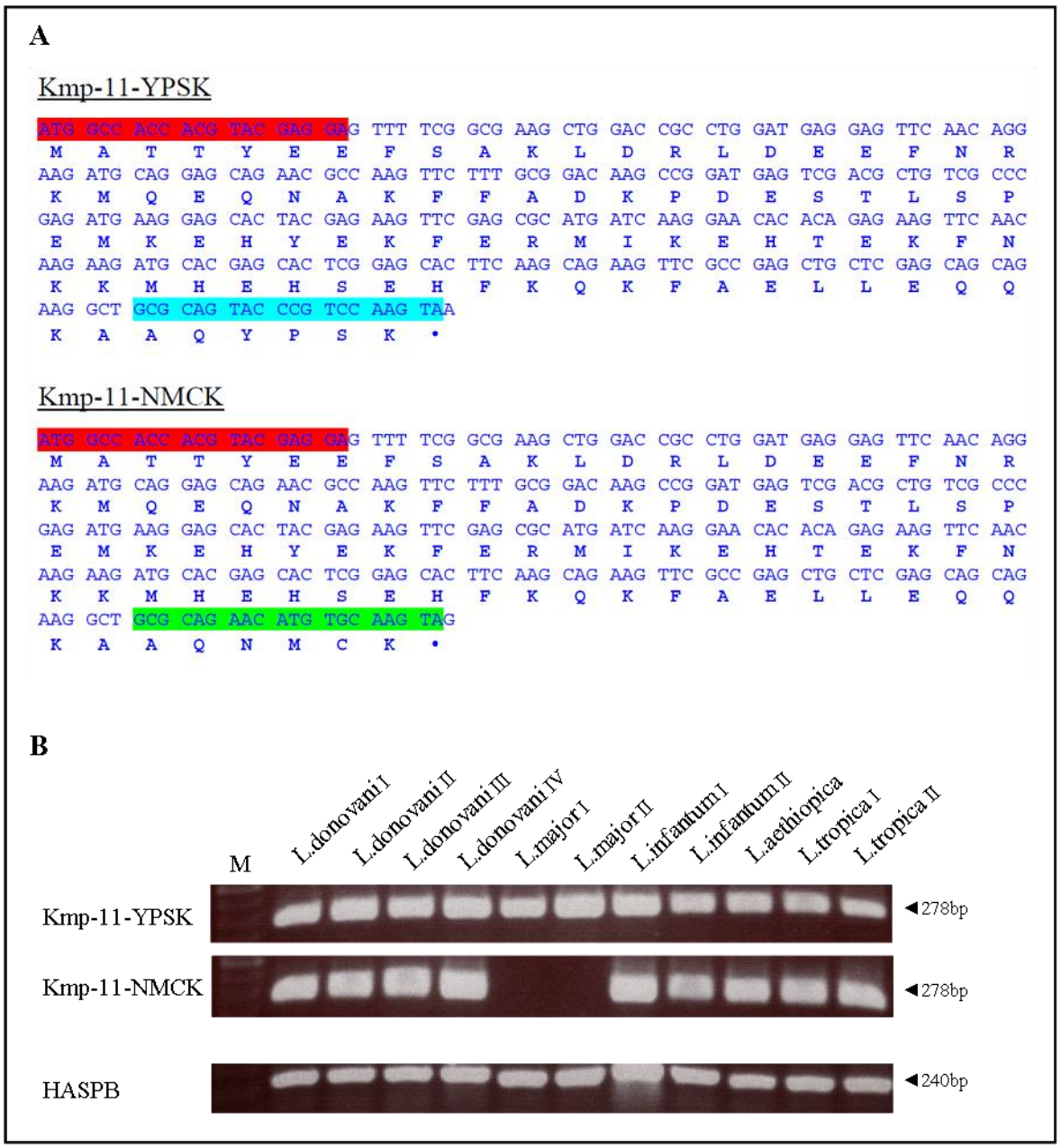

Abb.3.7 Identifizierung *Kmp-11-YPSK/Kmp-11-NMCK* in verschiedenen *Leishmania*-Arten
A: Dargestellt ist die Nukleotid- und AS-Sequenz (fett) von *Kmp-11-YPSK* und *Kmp-11-NMCK* von *L.infantum* mit dazugehörigen Oligonukleotidbindestellen für die PCR-Amplifikation. Rot markiert ist die Bindestelle des 5' Primers, die mit dem Startcodon des *Kmp-11* beginnt und bei beiden Sequenzen identisch ist. Blau und Grün sind die für *Kmp-11-YPSK* bzw. *–NMCK* spezifischen Bindestellen der 3' Primer. B: PCR-Analyse genomischer Leishmanien-DNA mit Primern für *Kmp-11-YPSK* bzw. *Kmp-11-NMCK* und als Kontrolle für das *HASPB* Gen. Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. M: 100 bp Marker

Die Analyse zeigte, dass, obwohl die 3'-Primer sich in nur vier Nukleotiden unterscheiden, es mit der PCR möglich ist, zwischen der *Kmp-11-YPSK* und der *-NMCK* Sequenz zu unterscheiden, da *L.major* nachweislich keine *Kmp-11-NMCK* Sequenz besitzt.

3.3 Subzelluläre Lokalisation von Kmp-11-YPSK und -NMCK

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch nicht untersucht, ob Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK unterschiedlich exprimiert werden, was auf verschiedene Funktionen beider Proteine hindeuten könnte. Daher war es Ziel der folgenden Analysen, die subzelluläre Lokalisation der Proteine zu überprüfen.

Kmp-11-YPSK bzw. *Kmp-11-NMCK* wurden per PCR aus genomischer DNA von *L.donovani* so amplifiziert, dass dabei das Stop-Codon der *Kmp-11*-Sequenz deletiert wurde. Anschließend wurde die Sequenz in einen pLEXSY-YFP-Vektor 5' vor die YFP-kodierende Sequenz kloniert, sodass nach der Translation ein Fusionsprotein Kmp-11-YPSK-YFP exprimiert wird (Abb.3.8). *Leishmania* der Gattung *L.donovani* wurden mit dem YFP-Fusionskonstrukt transfiziert, um eine Überexpression des Fusions-Proteins zu erzeugen und die Lokalisation des Proteins in der Leishmanienzelle untersuchen zu können. Die Transfektanten werden im Folgenden als L.d.$_{\text{YPSK-YFP}}$ (Kmp-11-YPSK-YFP überexprimierende *L.donovani*) und L.d.$_{\text{NMCK-YFP}}$ (Kmp-11-NMCK-YFP überexprimierende *L.donovani*) bezeichnet.

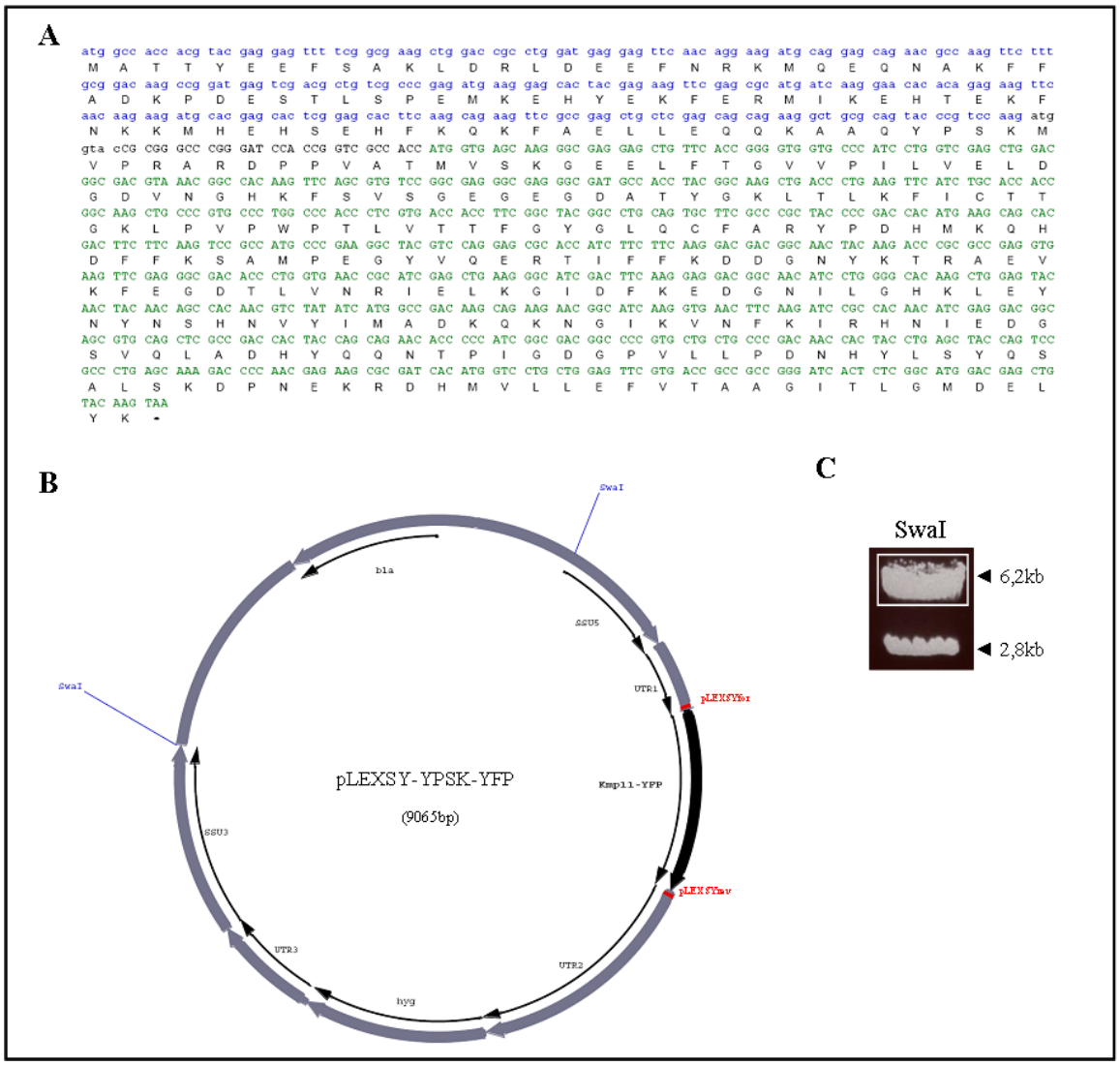

Abb.3.8 Kmp-11-YFP Fusionskonstrukt A: Dargestellt ist die Nukleotid- und AS-Sequenz des Kmp-11-YPSK-YFP-Proteins blau: Nukleotidsequenz des *Kmp-11-YPSK*-Gens, grün: Nukleotidsequenz des *YFP*-Gens B: Gezeigt ist der Vektor pLEXSY-YPSK-YFP mit dem *Kmp-11-YFP* Fusionskonstrukt. Die richtige Integration wurde mit pLEXSY-Primern (rot markiert) überprüft. C: Für die Transfektion wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym SwaI linearisiert. Die gleiche Klonierungsstrategie wurde für Kmp-11-NMCK angewandt.

Die Expression des Kmp-11-YFP Fusionsproteins wurde mittels Western Blot Analyse mit einem anti-Kmp-11 Antikörper überprüft. Das YFP-Protein hat ein Molekulargewicht von ~28 kDa, daher wurde für das Fusionsprotein ein Signal von 39 kDa im Western Blot erwartet. Sowohl bei Lysat von L.d.$_{YPSK-YFP}$ als auch bei Lysat von L.d.$_{NMCK-YFP}$ konnte eine starke Bande bei 39 kDa detektiert werden, wodurch die erfolgreiche Transfektion verbunden mit einer Kmp-11 Überexpression bestätigt wurde (Abb.3.9A). Für das endogene Kmp-11 war nur ein sehr schwaches Signal zu beobachten. Zudem wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse bei beiden Transfektanten eine starke YFP- Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 3.9B).

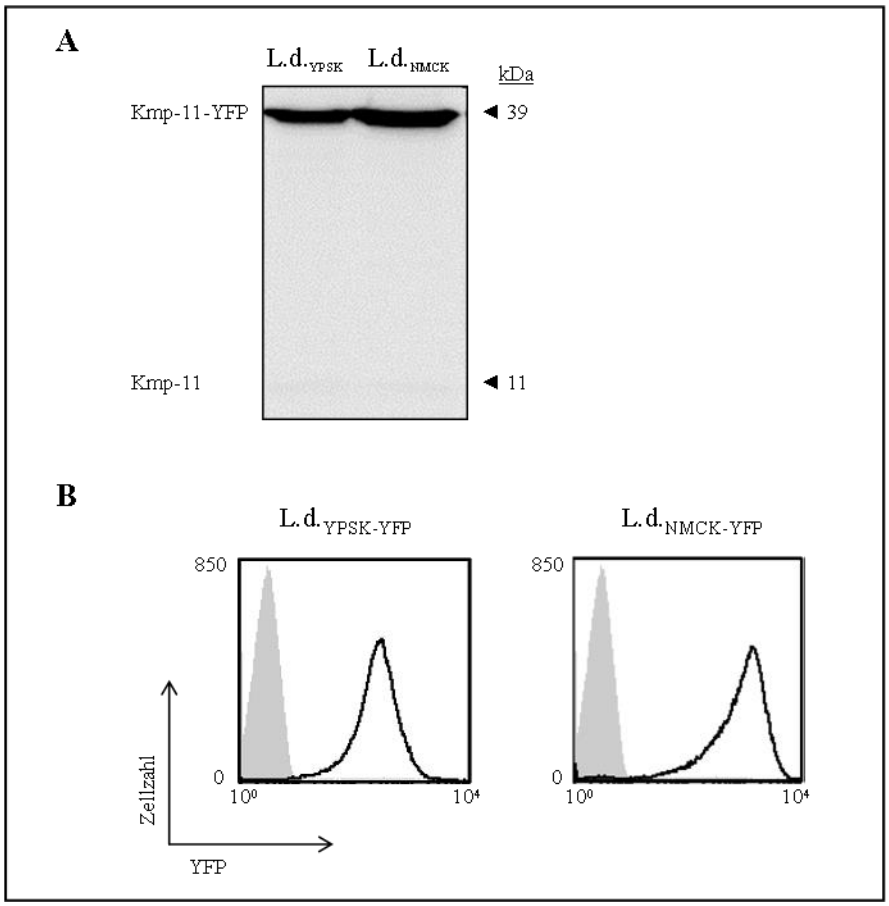

Abb. 3.9 Kmp-11-YPSK/-NMCK Überexpression in *L.donovani* A: Western-Blot Analyse mit einem anti-Kmp-11 Antikörper von L.d.$_{YPSK-YFP}$- und L.d.$_{NMCK-YFP}$ Lysat zum Nachweis des integrierten *Kmp-11-YFP* Fusionskonstrukts. B: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektanten. Je 1×10^5 Zellen wurden aufgenommen und im Histogramm ist die Zellzahl gegen die YFP-Intensität aufgetragen. Als Kontrolle (grau) wurden untransfizierte *L.donovani* verwendet.

Um die Lokalisation des Kmp-11 Proteins in der Leishmanienzelle zu untersuchen, wurden die Transfektanten fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Das Kmp-11-YPSK Protein wird im gesamten Zellkörper und der Flagelle exprimiert (Abb.3.10). Eine verstärkte Expression war an der Flagellentasche sowie im Bereich des Kinetoplasten zu sehen. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte sich in *L.donovanis*, die das Kmp-11-NMCK überexprimierten.

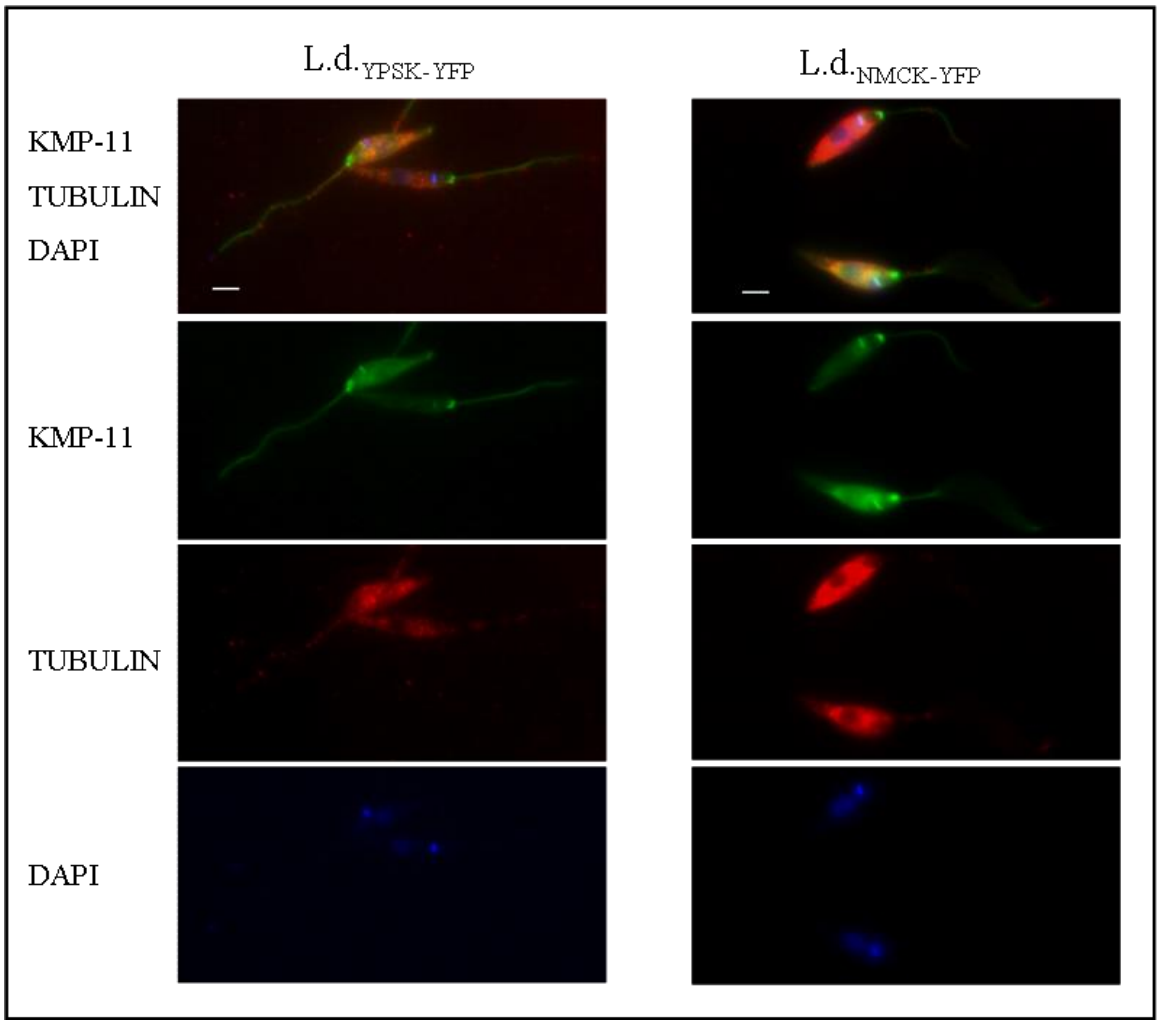

Abb.3.10 Subzelluläre Lokalisation von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK in *L.donovani*. Die Leishmanien wurden für die Färbung von Nukleus und Kinetoplast mit DAPI gefärbt und in 4 %igem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-Tubulin Antikörper und einem AF594-konjugierten Sekundär-Antikörper inkubiert (Färbung des Zytoskeletts), Maßstabsbalken = 2,5 µm

Die subzelluläre Lokalisation von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK wurde zusätzlich auch in Leishmanien der Gattung *L.major* untersucht, die im Vergleich zu *L.donovani* nur die *Kmp-11-YPSK* Sequenz im Genom besitzen. Die Fragestellung hierbei war, ob in *L.major* ein vergleichbares Expressionsmuster speziell für Kmp-11-NMCK erzielt werden kann, da in dieser Spezies die kodierende Sequenz für dieses Protein nicht vorhanden ist. Im Vergleich zu *L.donovani* zeigten sich bei L.m.$_{YPSK-YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$ in den Fluoreszenzmikroskopischen Analysen keine auffälligen Unterschiede. Zur Veranschaulichung ist die Lokalisation des Kmp-11-NMCK in *L.major* dargestellt (Abb.3.11). Die Transfektion wurde sowohl mit Hilfe der Western Blot-Analsye als auch durchflusszytometrisch bestätigt (Abb.3.11A, B). Wie auch bei den L.d.$_{NMCK-YFP}$ konnte YFP-Fluoreszenz im gesamten Zellkörper und in der Flagelle detektiert werden, allerdings

konnten in einigen L.m.$_{NMCK}$ im Zellkörper zusätzliche Foci mit starken YFP-Signalen festgestellt werden (Abb.3.11C).

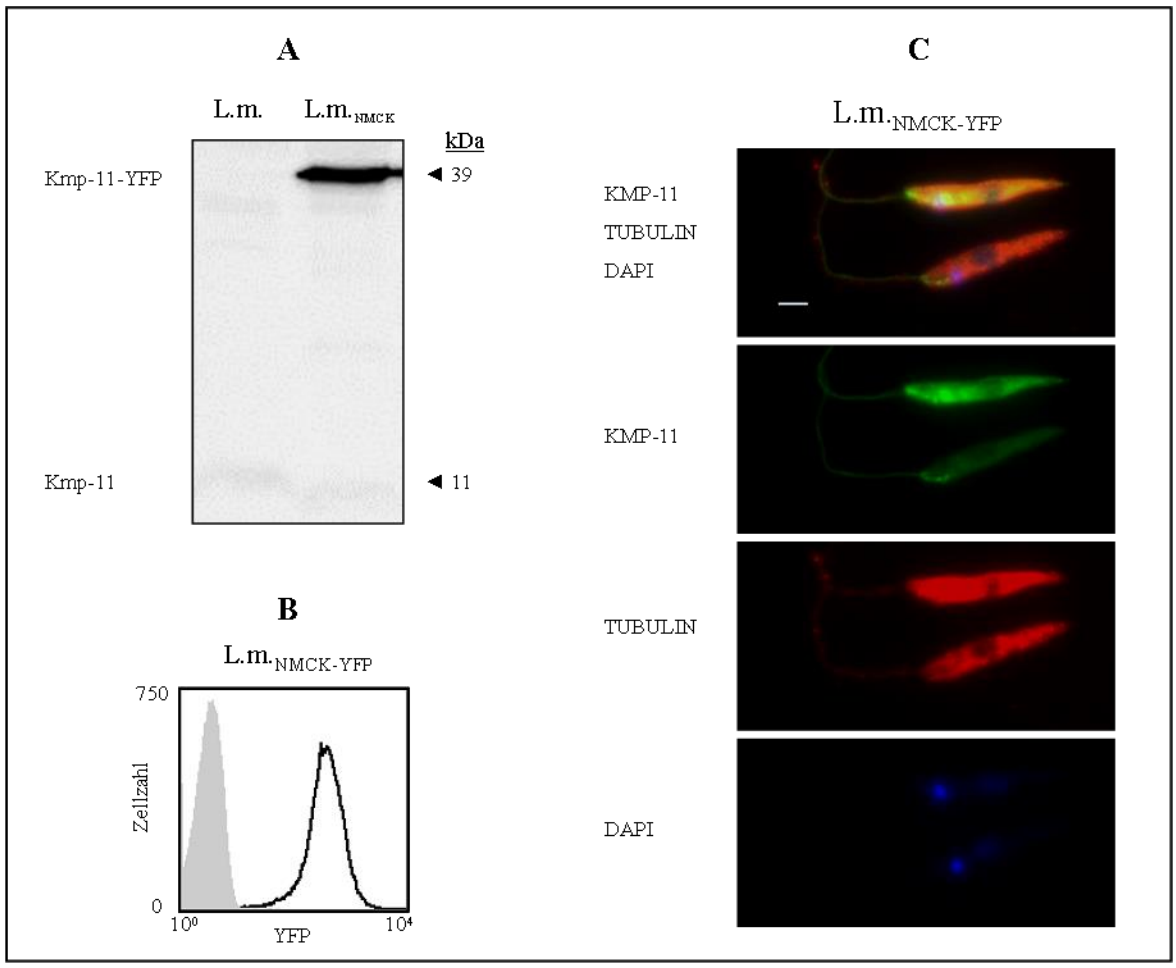

Abb.3.11 Überexpression von Kmp-11-NMCK in *L.major* A: Western-Blot Analyse mit einem anti Kmp11 Antikörper eines *L. major* Lysats und Kmp-11-NMCK überexprimierenden *L. major* (L.m.NMCK-YFP) zum Nachweis des integrierten *Kmp-11-YFP* Fusionskonstrukts. B: Durchflusszytometrische Analyse von L.m.$_{NMCK-YFP}$ im Vergleich zu untransfizierten L.m. (grau). Je 1 x 10^5 Zellen wurden aufgenommen und im Histogramm ist die Zellzahl gegen die YFP-Intensität aufgetragen. C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von L.m.$_{NMCK.}$ Die Leishmanien wurden für die Färbung von Nukleus und Kinetoplast mit DAPI und für die Färbung des Zytoskeletts mit einem anti-Tubulin- Antikörper inkubiert. Maßstabsbalken =2,5 µm

Die Analyse zeigte, dass Kmp-11-YPSK-YFP und -NMCK-YFP in den Parasiten keine unterschiedliche Lokalisation aufweisen. Auch in *L.major*, die kein endogenes Kmp-11-NMCK besitzen, zeigte sich ein Verteilungsmuster wie bei *L.donovani*.

3.4 Infektiosität von Kmp-11 überexprimierenden *Leishmania*

Um zu prüfen, ob die Überexpression von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK sich unterschiedlich auf die Infektiosität der Leishmanien auswirkt, wurden Infektionsversuche mit humanen Makrophagen durchgeführt. Für die Analysen wurde die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 verwendet. THP-1 Zellen wachsen in Suspension und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Werden sie mit PMA behandelt, differenzieren sie zu Makrophagen und werden adhärent.

Für die Infektion wurden die Leishmanien in zehnfachem Zellzahlüberschuss zu den adhärenten THP-1 Zellen gegeben und für unterschiedlich lange Zeitspannen mit ihnen inkubiert. Anschließend wurden die freien Leishmanien durch Waschen entfernt und die THP-1 Zellen mittels FACS und Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Infektion der THP-1 Zellen mit Leishmanien wurden sie zunächst mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops betrachtet. In Abb.3.12 sind THP-1 zu sehen, die mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ bzw. L.d.$_{NMCK-YFP}$ infiziert wurden. Die Inkubationszeit betrug 20 h. Hierbei zeigten sich keine auffälligen Unterschiede zwischen L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$. Bei beiden Transfektanten konnten nach 20 h fast ausschließlich infizierte THP-1 Zellen beobachtet werden. Infizierte THP-1 Zellen enthielten viele Parasiten, die diffus in der Zelle verteilt waren.

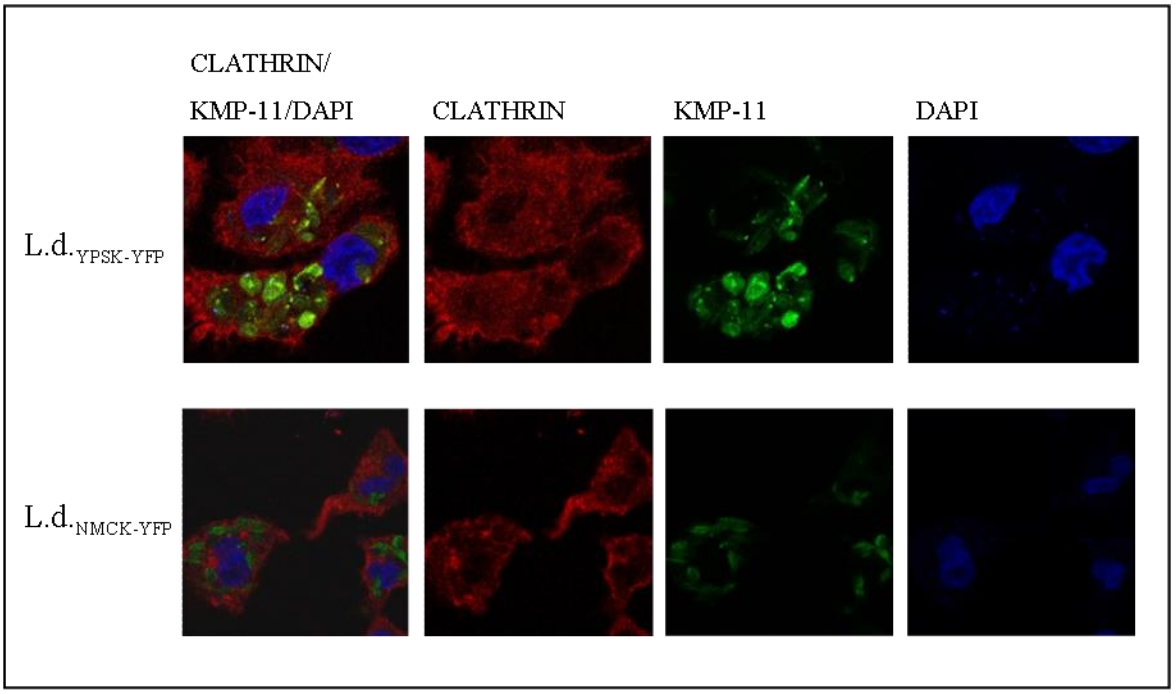

Abb.3.12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von THP-1 Zellen infiziert mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$ THP-1 Zellen wurden mit Leishmanien (1:10) für 20 h inkubiert. THP-1 Zellen wurden mit DAPI und mit einem anti-Clathrin- Antikörper gefolgt von einem AF594- konjugierten Sekundär-Antikörper inkubiert.

Zum Vergleich der Infektiösität von Kmp-11-YPSK-YFP und Kmp-11-NMCK-YFP überexprimierenden Transfektanten wurden zudem FACS-Analysen durchgeführt. Dafür wurden THP-1 Zellen für 3 h mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ bzw. L.d.$_{NMCK-YFP}$ inkubiert. Nach Entfernung der freien Leishmanien, wurden die THP-1 Zellen durch Trypsinierung wieder in Suspension gebracht und durchflusszytometrisch analysiert. Infizierte THP-1 Zellen wurden durch die YFP-Fluoreszenz identifiziert. Nach 3 h mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ konnten signifikant mehr infizierte THP-1 Zellen detektiert werden als nach Zugabe von L.d.$_{NMCK\ -YFP}$ (Abb.3.13A). Durchschnittlich konnten durch L.d.$_{YPSK-YFP}$ mit 33,7 % ein Drittel der THP-1 Zellen infiziert werden (Abb.3.13B). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Versuchen mit L.d.$_{NMCK-YFP}$ nur eine Infektionsrate von 23,2 %.

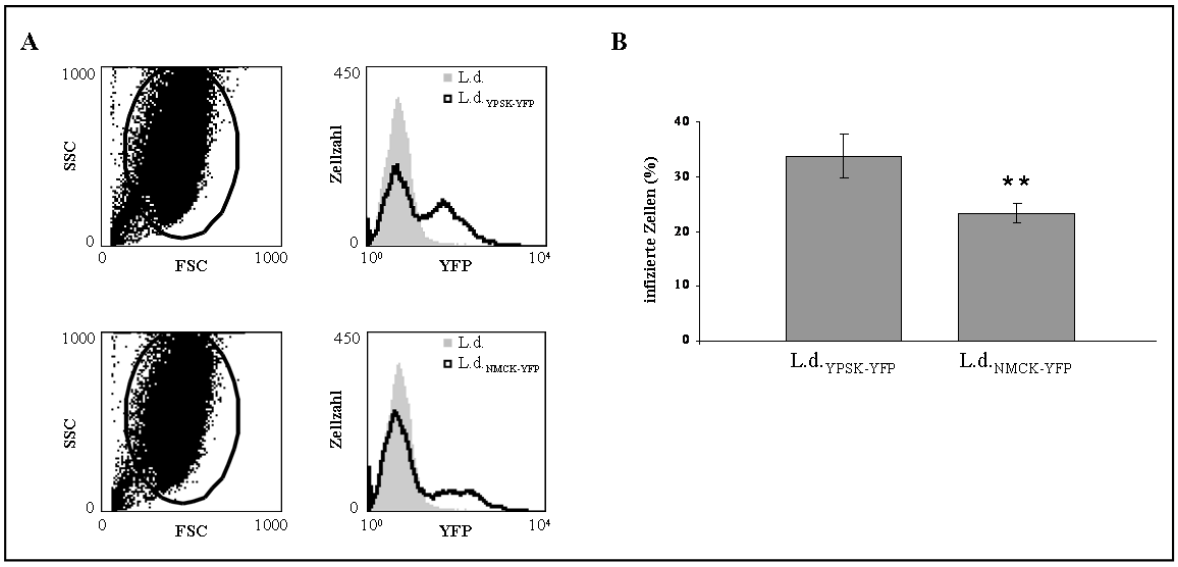

Abb. 3.13 Infektion von THP-1 Zellen mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$ A: THP-1 Zellen wurden 1:10 mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ bzw. L.d.$_{NMCK-YFP}$ für 3 h infiziert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die YFP- Fluoreszenz der THP-1 Zellen (infizierte Zellen in %) im FL1-Kanal gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse von mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ (oben) und L.d.$_{NMCK-YFP}$ (unten) infizierten THP-1 Zellen. Als Kontrolle in grau dargestellt sind THP-1 Zellen inkubiert mit untransfizierten *L.donovani*. B: Zeigt die Anzahl der infizierten THP-1 Zellen in % nach Infektion mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=6) von zwei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind mit ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet und beziehen sich auf THP-1 /L.d.$_{YPSK-YFP}$ im Vergleich zu THP-1/L.d.$_{NMCK-YFP}$.

Zusätzlich wurden Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Infektiösität und den Vergleich von Kmp-11 überexprimierenden *L.donovani* und *L.major* durchgeführt. Dazu wurden THP-1 Zellen für variable Zeiten mit Leishmanien kultiviert. Infizierte THP-1 Zellen wurden durch ein positives Signal für das Kmp-11-YFP bei 39 kDa im Western Blot nach Behandlung mit einem anti-Kmp-11-Antikörper identifiziert.

Die Kmp-11-YPSK-YFP und Kmp-11-NMCK-YFP überexprimierenden *L.donovani* wie auch *L.major* zeigten mit steigender Inkubationszeit eine zunehmende Infektion der

THP-1 Zellen (Abb.3.14). Im Gegensatz zu den vorherigen FACS-Analysen konnte im Western Blot eine höhere Infektiosität der L.d.$_{YPSK-YFP}$ gegenüber den L.d.$_{NMCK-YFP}$ nicht bestätigt werden, da nach 2 h bei den L.d.$_{NMCK-YFP}$ ein stärkeres Signal detektiert werden konnte, als bei den L.d.$_{YPSK-YFP}$. Bei den darauffolgenden Infektionszeiten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Jedoch konnte bei den *L.major* Transfektanten L.m.$_{YPSK-YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$ verglichen mit den *L.donovani* Transfektanten, nach einer Stunde ein stärkeres Signal detektiert werden, was für eine schnellere Infektion der THP-1 Zellen mit *L.major* sprechen würde.

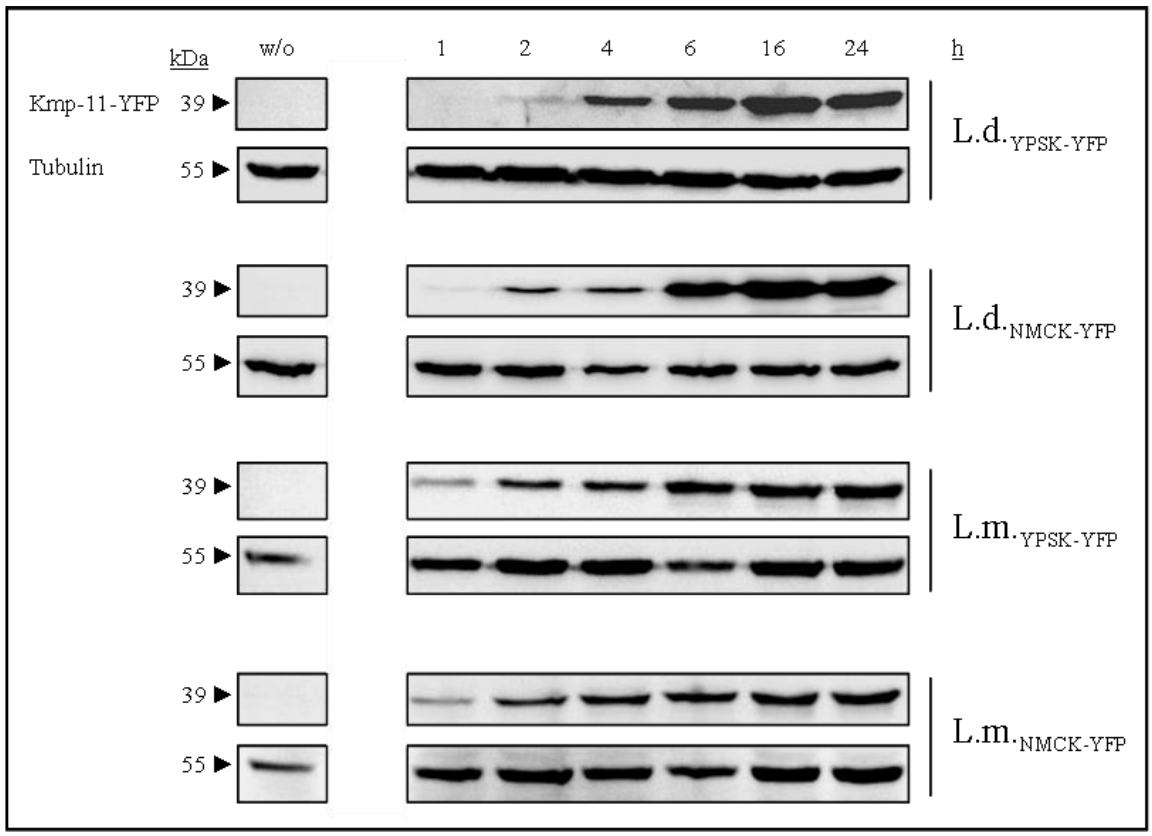

Abb.3.14 Western Blot-Analyse zur Detektion infizierter THP-1 Zellen nach verschiedenen Infektionszeiten Dargestellt ist die Western-Blot Analyse von je 5×10^5 THP-1 Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Kmp-11-YPSK bzw Kmp-11-NMCK überexprimierenden *L.donovani* und *L.major* Die infizierten Zellen wurden detektiert mit einem anti-Kmp-11- Antikörper. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die beobachteten Unterschiede in der Infektiosität in der FACS-Analyse durch die Western-Blot-Analyse nicht bestätigt werden konnten, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die unterschiedlichen Kmp-11 (YPSK und NMCK) keinen differenziellen Einfluss auf die Infektiosität der Parasiten haben.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von Kmp-11 einen generellen Einfluss auf die Infektiosität der Parasiten hat, wurden zusätzlich Leishmanien hergestellt, die nur ein YFP-Protein (L.m.$_{YFP}$) überexprimieren.

Zu beobachten war nach 3 h, dass deutlich mehr THP-1 Zellen durch L.m.$_{YFP}$ (Abb.3.15 A, B, m = 28,3%) infiziert wurden als im direkten Vergleich durch L.m.$_{NMCK-YFP}$ (Abb.3.15A, B, m = 13,8%). Eine Western-Blot Analyse von THP-1 Zelllysaten zeigte im Fall von THP-1 Zellen, die mit L.m.$_{YFP}$ inkubiert wurden, ein starkes Signal bei ca. 28 kDa für das YFP- Protein (Abb.3.15C). Im Gegensatz dazu konnte bei THP-1 Zellen, die mit L.m.$_{NMCK-YFP}$ inkubiert wurden mit einem anti-YFP- sowie mit einem anti-Kmp-11-Antikörper nur eine schwache Bande bei 39 kDa für das Kmp-11-YFP Fusionsprotein detektiert werden. Die Western-Blot Untersuchung bestätigten somit das Ergebnis der FACS-Analyse.

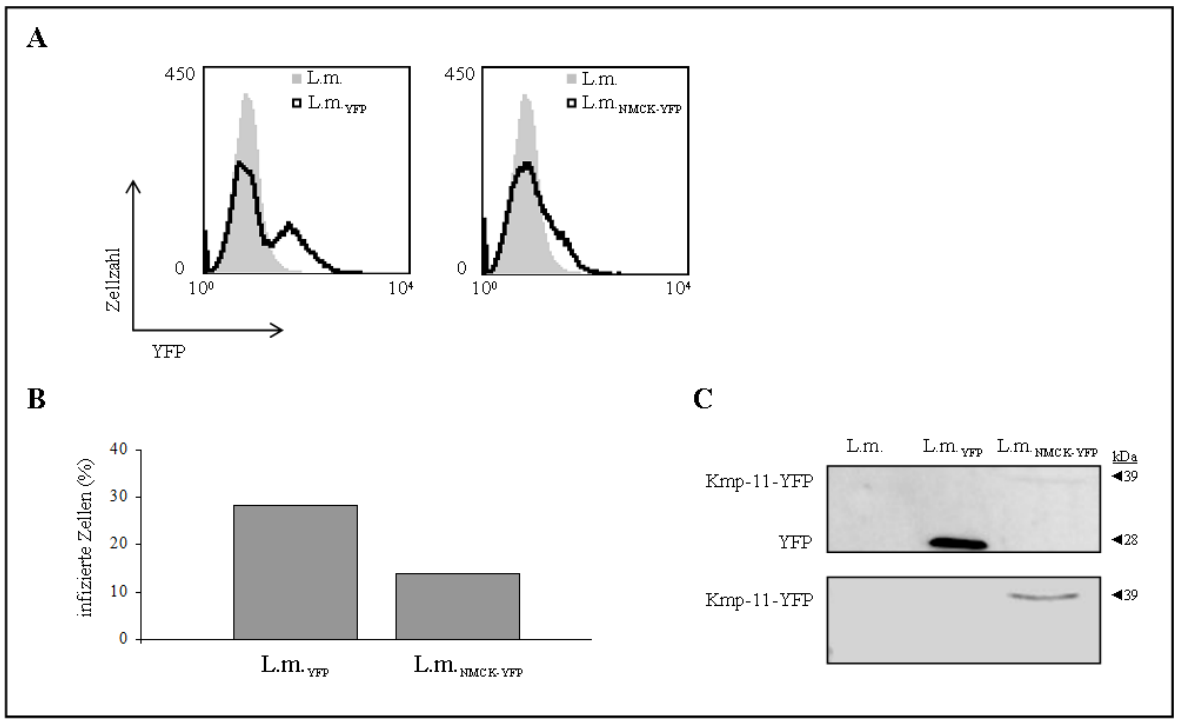

Abb.3.15 Infektion von THP-1 Zellen mit L.m$_{YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$ THP-1 Zellen wurden 1:10 mit L.m.$_{YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$ für 3 h infiziert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die YFP–Fluoreszenz von THP-1 Zellen (infizierte Zellen in %) gemessen. A: Zu sehen ist ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse von mit L.m.$_{YFP}$ (links) bzw. L.m.$_{NMCK-YFP}$ (rechts) infizierten THP-1 Zellen. Als Kontrolle in grau dargestellt sind THP-1 Zellen inkubiert mit untransfizierten *L.major*. B: Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments, das mit Triplikaten durchgeführt wurde. Die Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. C: Die Abbildung zeigt die Western-Blot Analyse von 1 x 10^6 THP-1 Zellen nach Inkubation mit L.m., L.m.$_{YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$. Die infizierten Zellen wurden identifiziert mit einem anti-YFP- Antikörper (oben) bzw. einem anti-Kmp-11-Antikörper (unten).

Infektionsversuche mit L.m.$_{YPSK-YFP}$ und L.m$_{YFP}$ lieferten ein ähnliches Ergebnis. Die Überexpression des Kmp-11-YPSK-YFP führte zu einer verminderten Infektionsrate im Vergleich zu Leishmanien, die nur ein YFP-Protein überexprimierten. Beide Transfektanten L.m.$_{YFP}$ und L.m.$_{YPSK-YFP}$ zeigten eine gleich starke YFP-Expression (Abb. 3.16A). Jedoch wurden mehr THP-1 Zellen nach Zugabe von L.m.$_{YFP}$ infiziert (Abb.3.16B). Nach 1 h konnten durchschnittlich 29,3 % infizierte THP-1 Zellen nachgewiesen werden, nach 3 h bereits 45,3 % (Abb.3.16C). Nach der Inkubation mit L.m.$_{YPSK-YFP}$ waren es signifikant weniger. Die Infektionsrate lag hier nach 1 h bei 22,3 %, die sich nach 3 h auf durchschnittlich 37 % steigerte.

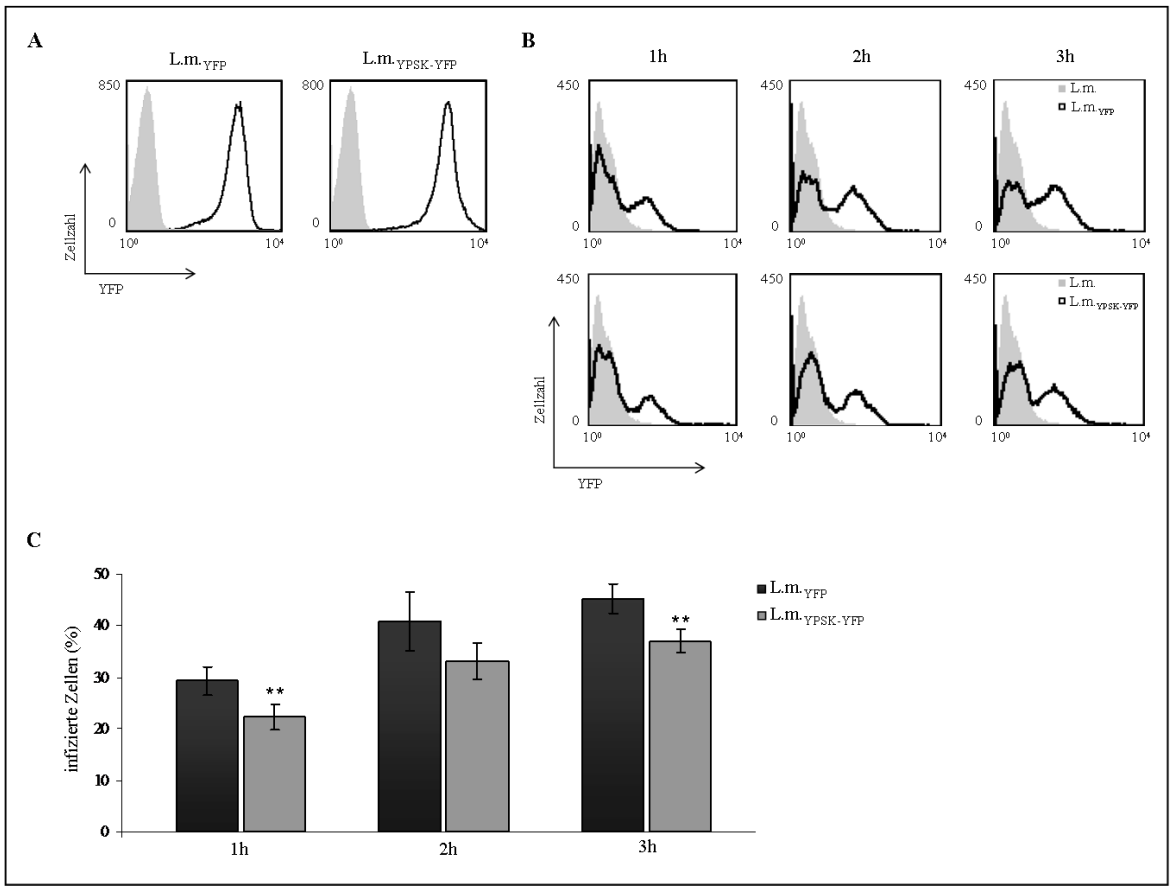

Abb.3.16 Infektion von THP-1 Zellen mit L.m$_{YFP}$ und L.m.$_{YPSK-YFP}$ A: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektanten L.m.$_{YFP}$ (links) und L.m.$_{YPSK-YFP}$. Im Histogramm ist die Zellzahl gegen die YFP-Intensität im FL1- Kanal aufgetragen. Als Kontrolle (grau) wurden untransfizierte *L.major* verwendet. Aufgenommen wurden je 1 x 10^5 Zellen. B: THP-1 Zellen wurden 1:10 mit L.m.$_{YFP}$ und L.m.$_{YPSK-YFP}$ für 1, 2 und 3 h inkubiert. Anschließend wurden durchflusszytometrisch die YFP-Intensität der THP-1 Zellen gemessen. Zu sehen ist je ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse der THP-1 Zellen für jede Inkubationszeit mit L.m.$_{YFP}$ (oben) bzw. L.m.$_{YPSK-YFP}$. Als Kontrolle in grau dargestellt sind THP-1 Zellen inkubiert mit untransfizierten *L.major*. C: Zeigt die Anzahl der infizierten THP-1 Zellen in % nach Infektion mit L.m.$_{YFP}$ und L.m.$_{YPSK-YFP}$. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=6) von zwei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden, sind dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind mit ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet und beziehen sich auf THP-1/L.m.$_{YFP}$ im Vergleich zu THP1/ L.m.$_{YPSK-YFP}$.

Die Untersuchungen ergaben, dass eine Überexpression von Kmp11-YFP im Vergleich zu einer Überexpression von YFP allein, einen inhibierenden Effekt auf die Infektiosität der Parasiten hat. Ein Unterschied zwischen den beiden Kmp-11 (YPSK und NMCK) war hierbei aber nicht zu beobachten.

3.5 Einfluss der *Leishmania*-Infektion auf die HLA-Expression von THP-1 Zellen

Makrophagen tragen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen einen wichtigen Teil zur Immunabwehr bei. Sie präsentieren den T-Lymphozyten Antigenfragmente über HLA-Moleküle der Klasse I und II. Es wurde untersucht, ob sich eine Überexpression von Kmp-11 in *Leishmania* auf die Expression der HLA-Klasse I und HLA-Klasse II auf der Zelloberfläche von THP-1 Makrophagen auswirkt. Verglichen wurden hierzu Kmp-11-YPSK-YFP und YFP- überexprimierende Parasiten. Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden für je 24 h mit Leishmanien inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte eine deutliche HLA-Klasse I Färbung auf der Zelloberfläche sowohl infizierter als auch nicht-infizierter THP-1 Zellen, gleichwohl, ob mit Kmp-11-YFP oder nur YFP exprimierenden Leishmanien infiziert. (Abb.3.17).

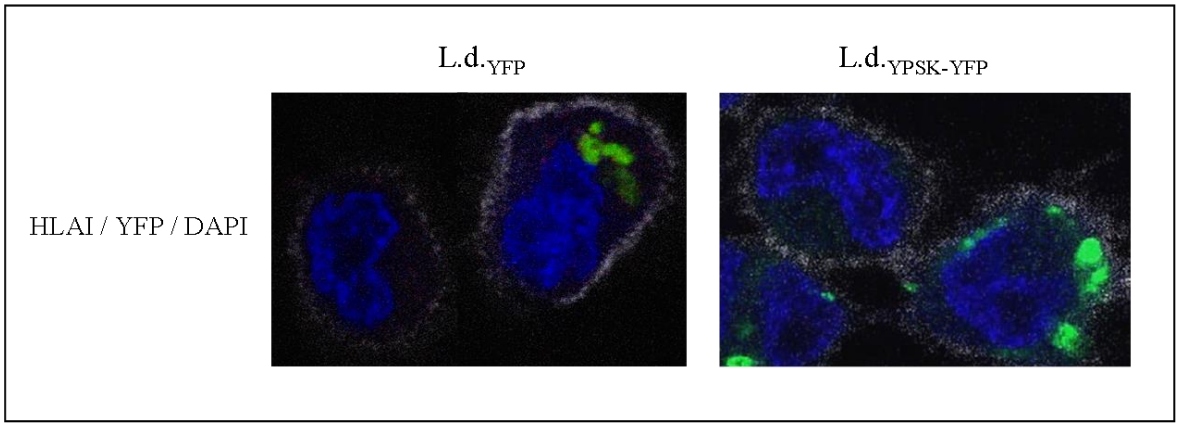

Abb.3.17 HLA-Klasse I Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter THP-1 Zellen
Mikroskopische Aufnahmen von THP-1 Zellen infiziert mit L.d.$_{YFP}$ (links) und L.d.$_{YPSK-.YFP}$ (rechts) THP-1 Zellen wurden mit Leishmanien im Verhältbis 1:10 für 24 h inkubiert. THP-1 Zellen wurden mit DAPI und mit einem anti-HLA I- Antikörper gefärbt. Blau = Dapi grün = Leishmanien, Weiß = HLA-I.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die THP-1 Zellen nach 24 h Inkubation mit den Leishmanien mit anti-HLA-Klasse I– und HLA-Klasse II Antikörpern inkubiert. Anhand der YFP-Intensität wurden die Zellen als infizierte und uninfizierte THP-1 Zellen identifiziert (Abb.3.18A, R2 und R3). Durch Inkubation mit L.d.$_{YFP}$ wurden

durchschnittlich 84,5 % der THP-1 Zellen infiziert. L.d.$_{YPSK-YFP}$ führte mit 78,7 % zu einer etwas geringeren Infektionsrate. Uninfizierte und infizierte THP-1 Zellen wurden zunächst auf ihre HLA-Klasse I Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen analysiert (Abb.3.18 B und C). Bei infizierten THP-1 Zellen konnte eine Zunahme der HLA-Klasse I Expression im Vergleich zu THP-1 Zellen, die nicht mit Leishmanien inkubiert wurden, festgestellt werden. Das konnte sowohl nach Infektion mit L.d.$_{YFP}$ als auch nach Infektion mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ gezeigt werden. THP-1-Zellen, die mit Leishmanien inkubiert wurden, aber nicht infiziert waren, zeigten keine Unterschiede in der HLA-Klasse I Expression zu unbehandelten THP-1 Zellen.

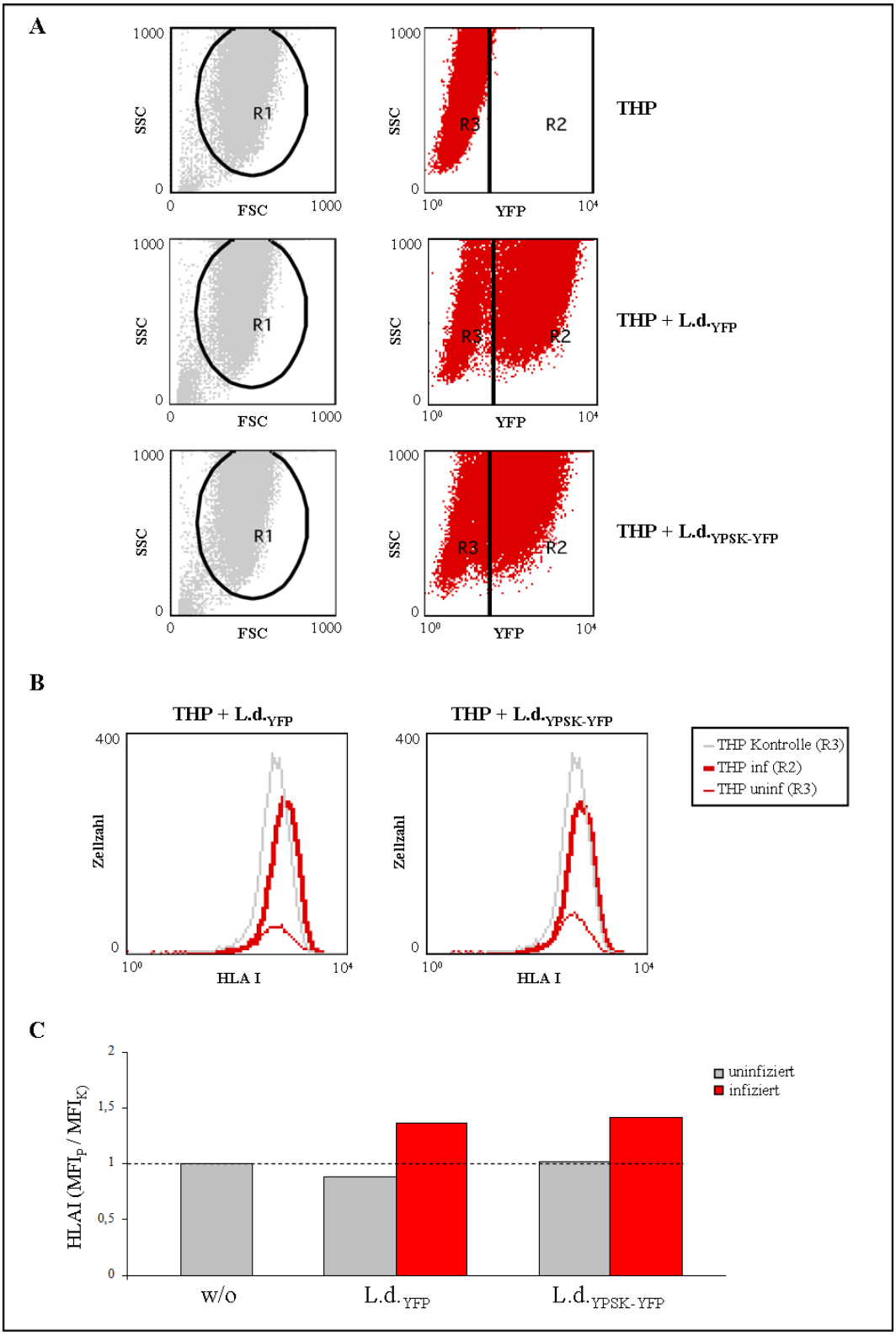

Abb.3.18 HLA-Klasse I Expression von THP-1 Zellen nach *Leishmania* Infektion A: THP-1 Zellen (R1) wurden anhand der YFP-Intensität separiert in infizierte (R2) und uninfizierte (R3) Zellen. Die Abbildung zeigt je ein repräsentatives Beispiel für unbehandelte THP-1 Zellen, infiziert mit L.d.$_{YFP}$ und L.d.$_{YPSK-YFP}$.
B: Im Histogramm ist die Zellzahl gegen die HLA-Klasse I Intensität von THP-1 Zellen behandelt mit L.d.$_{YFP}$ (links) und L.d.$_{YPSK-YFP}$ dargestellt. Überlagert sind unbehandelte THP-1 Zellen (grau), infizierte (rot; dicke Linie) und uninfizierte THP-1 Zellen (rot; dünne Linie). C: Gezeigt ist die n-fache Veränderung des HLA-Klasse I MFI (MFI Probe/MFI Kontrolle, Kontrolle = unbehandelte THP-1) mit Mittelwerten eines repräsentativen Versuchs, der jeweils mit Duplikaten durchgeführt wurde.

Beim Vergleich der HLA-Klasse II Expression konnte eine Zunahme wie bei der HLA-Klasse I nur bei THP-1 Zellen gezeigt werden, die mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ infiziert wurden (Abb.3.19). Bei mit L.d.$_{YFP}$ infizierten Zellen, konnte keine Zunahme der HLA-Klasse II Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

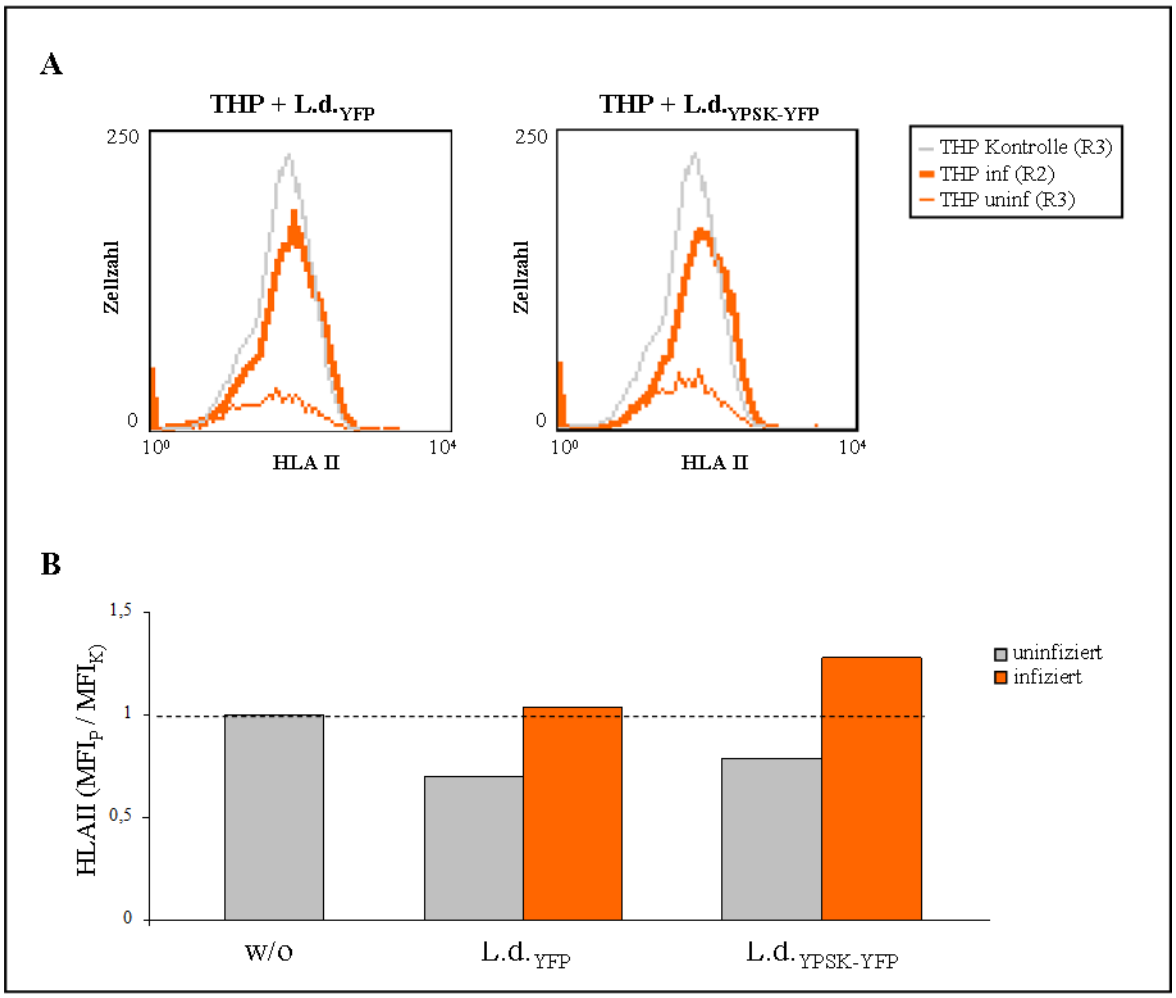

Abb.3.19 HLA-Klasse II Expression von THP-1 Zellen nach *Leishmania* Infektion A: Dargestellt ist im Histogramm die Zellzahl gegen die HLA-Klasse II Intensität von THP-1 Zellen behandelt mit L.d.$_{YFP}$ (links) und L.d.$_{YPSK}$ (rechts). Überlagert sind als Kontrolle unbehandelte THP-1 Zellen (grau), infizierte (orange; dicke Linie) und uninfizierte THP-1 Zellen (orange; dünne Linie). B: Gezeigt ist die n-fache Veränderung des HLA Klasse II- MFI (MFI Probe/MFI Kontrolle unbehandelte THP-1) mit Mittelwerten eines repräsentativen Versuchs, der jeweils mit Duplikaten durchgeführt wurde.

Diese Experimente zeigten, dass eine Überexpression von Kmp-11-YFP in Leishmanien im Vergleich zu YFP allein keinen Einfluss auf die Expression von HLA-I auf der Oberfläche infizierter Zellen hat. Im Gegensatz dazu, ist eine leichte Erhöhung der Expression von HLA-II im Falle einer Infektion mit Kmp11-YFP, im Vergleich zu YFP allein, transfizierter Parasiten auf den infizierten THP-1 Zellen zu beobachten.

3.6 Strategie zur Herstellung von Kmp-11 Knock-out Mutanten

Für weitere Untersuchungen sollten Kmp-11- defiziente Parasiten hergestellt werden, um eventuelle Rückschlüsse auf die bis jetzt noch unbekannte Funktion des Proteins zu ziehen. Die Möglichkeit Gene mit Doppelstrang-RNA mittels RNA-Interferenz herabzuregulieren, konnte bisher in *Leishmania* (mit Ausnahme von *L.braziliensis*) nicht nachgewiesen werden. Ziel war es daher, über homologe Rekombination einen homozygoten Knock-out (K.o.) herbeizuführen. Es wurden Parasiten der Spezies *L.infantum* verwendet, da deren *Kmp-11* Locus drei Kopien der Sequenz enthält und bereits vollständig sequenziert war. Für einen homozygoten K.o. mussten zwei Vektoren generiert werden. Beide Konstrukte enthalten als Rekombinationskassette die kodierende Sequenz für je ein Fluoreszenzprotein (YFP bzw. mCherry) und ein Resistenzgen (HYG bzw. NEO) (Abb.3.20). Flankiert werden sie von der 5'- bzw. 3'-UTR Sequenz des *Kmp-11* Locus, über die die homologe Rekombination erfolgen sollte. Die UTR- Sequenzen sind in beiden Vektoren identisch.

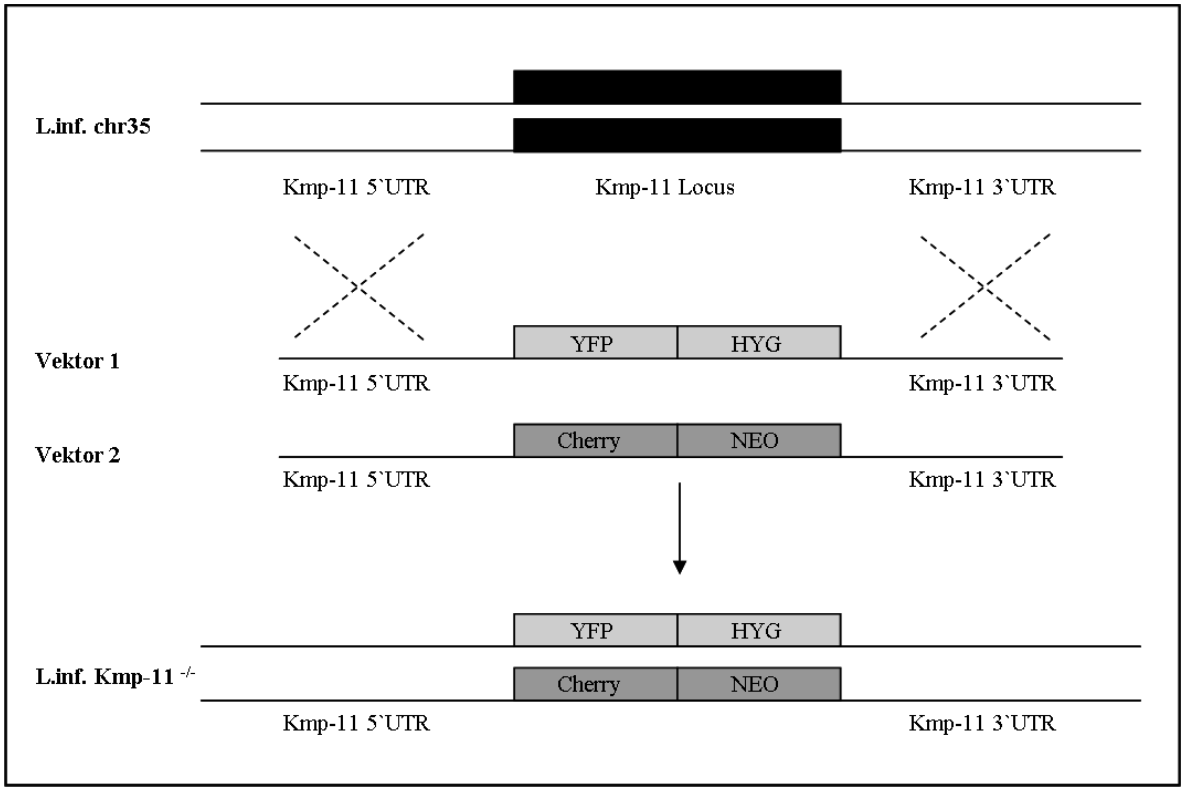

Abb. 3.20 Schematische Übersicht der Konstrukte zur Herstellung von *L.infantum* Kmp-11$^{-/-}$ Beide Konstrukte beinhalten die *Kmp-11* 5'- und 3' UTR Region, durch die durch homologe Rekombination der *Kmp-11* Locus ausgetauscht werden kann. Kmp-11$^{-/-}$ Leishmanien sollten grüne und rote Fluoreszenz aufweisen und unter Selektionsdruck von HYG/NEO wachsen.

L.infantums wurden mit dem ersten Konstrukt (Kmp-11 5'UTR-YFP-HYG-Kmp-11 3'UTR) transfiziert und unter Hygromycin Selektionsdruck kultiviert. Anschließend erfolgte eine weitere Transfektion mit dem zweiten Konstrukt (Kmp-11 5'UTR-Cherry-NEO-Kmp-11 3'UTR). Zur Überprüfung der Integration beider Konstrukte in den *Kmp-11* Locus wurde eine PCR-Analyse durchgeführt mit Oligonukleotiden, die genomisch 5' und 3' der *Kmp-11* UTR Sequenzen lagen. Zusammen mit Primern, die spezifisch für jedes Konstrukt waren, wurde durch vier PCR die richtige Lokalisation getestet (Abb. 3.21A). Verglichen wurden untransfizierte und transfizierte *L.infantums*. Bei untransfizierten *L.infantums* war bei keiner der vier PCR-Reaktionen eine Bande zu sehen (Abb.3.21B). Im Gegensatz dazu konnte bei den *L.infantum* Transfektanten für jede Primerkombination ein starkes PCR-Signal detektiert werden, was auf eine richtige Integration der zwei K.o.-Vektoren schließen ließ.

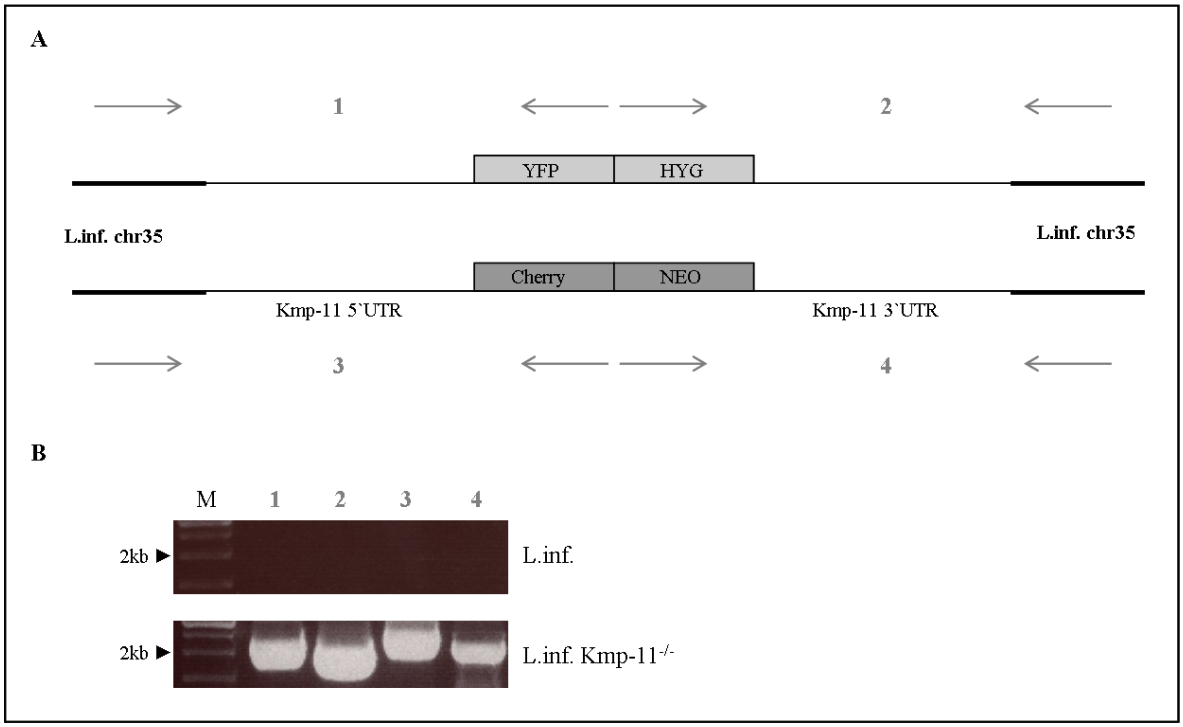

Abb.3.21 Integration der K.o.-Vektoren A: Vier Oligonukleotidpaare dienten der Bestimmung des korrekten Einbaus beider Konstrukte im *Leishmania*-Genom. B: Ergebnis der PCR-Analyse genomischer DNA von L.inf. und L.inf Kmp-11$^{-/-}$. Die PCR- Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. M: 1 kb Marker

Bei den *Leishmania*-Transfektanten konnte mikroskopisch und durchflusszytometrisch keine YFP- bzw. Cherry-Fluoreszenz nachgewiesen werden, obwohl sie eine Resistenz gegenüber Hygromycin als auch gegen Neomycin zeigten. Zur weiteren Überprüfung wurde daher mit genomischer DNA eine PCR für die kodierenden Sequenzen von Kmp-11 durchgeführt. Obwohl die richtige Integration beider Konstrukte auf dem Chromosom

gezeigt werden konnte, waren dennoch Signale für jede der drei Kmp-11-Sequenzen in der PCR nachweisbar (Abb. 3.22A). Im Western Blot hingegen, konnte eine deutlich schwächere Bande für Kmp-11 im Vergleich zur Ladekontrolle TSA-Protein (*thiol-specific antioxidant protein)* detektiert werden (Abb. 3.22B).

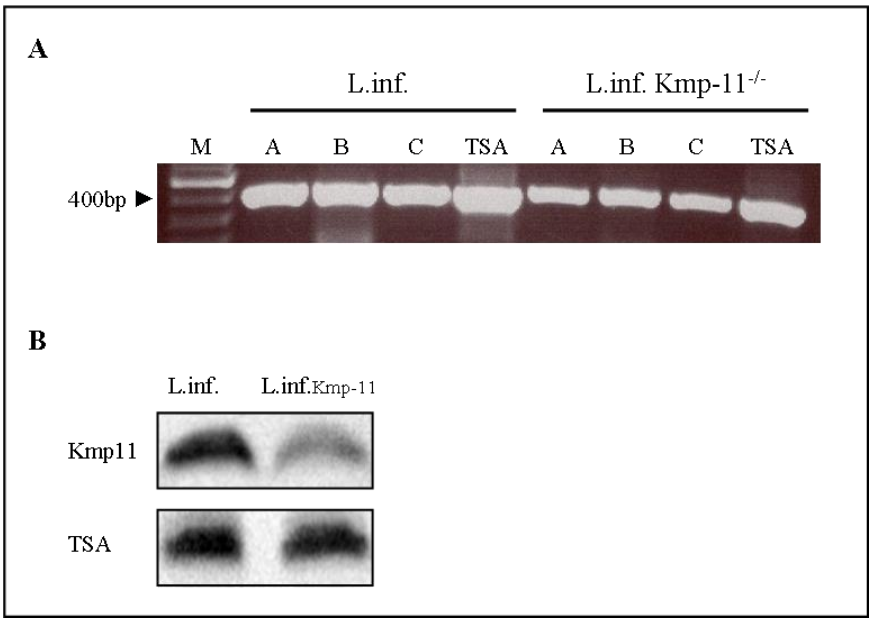

Abb.3.22 Kmp-11 PCR- und Western Blot-Analyse von L.inf Kmp-11$^{-/-}$ A: Kmp-11A-C PCR-Analyse genomischer DNA von L.inf. und L.inf.Kmp-11$^{-/-}$. Die PCR- Amplikons wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle diente ein PCR- Ansatz mit Primern für das die kodierende Sequenz von TSA, M: 100 bp Marker B: Western-Blot mit einem anti-Kmp-11 Antikörper von L.inf. und L.inf. Kmp-11$^{-/-}$ Lysat zum Nachweis der Kmp-11 Expression. Als Kontrolle wurde ein anti-TSA Antikörper verwendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass mit der Transfektion der beiden Konstrukte kein Kmp-11-Knock-out, aber dennoch ein starker Knock-down des Proteins erzielt werden konnte. Die Transfektanten werden im Folgenden mit L.inf.Kmp-11^{low} bezeichnet.

Mikroskopische Analysen von L.inf. Kmp^{low} zeigten keine auffälligen phänotypischen Unterschiede (Zellgröße, Flagelle) im direkten Vergleich zu untransfizierten L.inf. (Abb.3.23A). Auch in der Anzahl und Lokalisation von Nukleus und Kinetoplast zeigten sie keine Veränderungen (Abb. 3.23B).

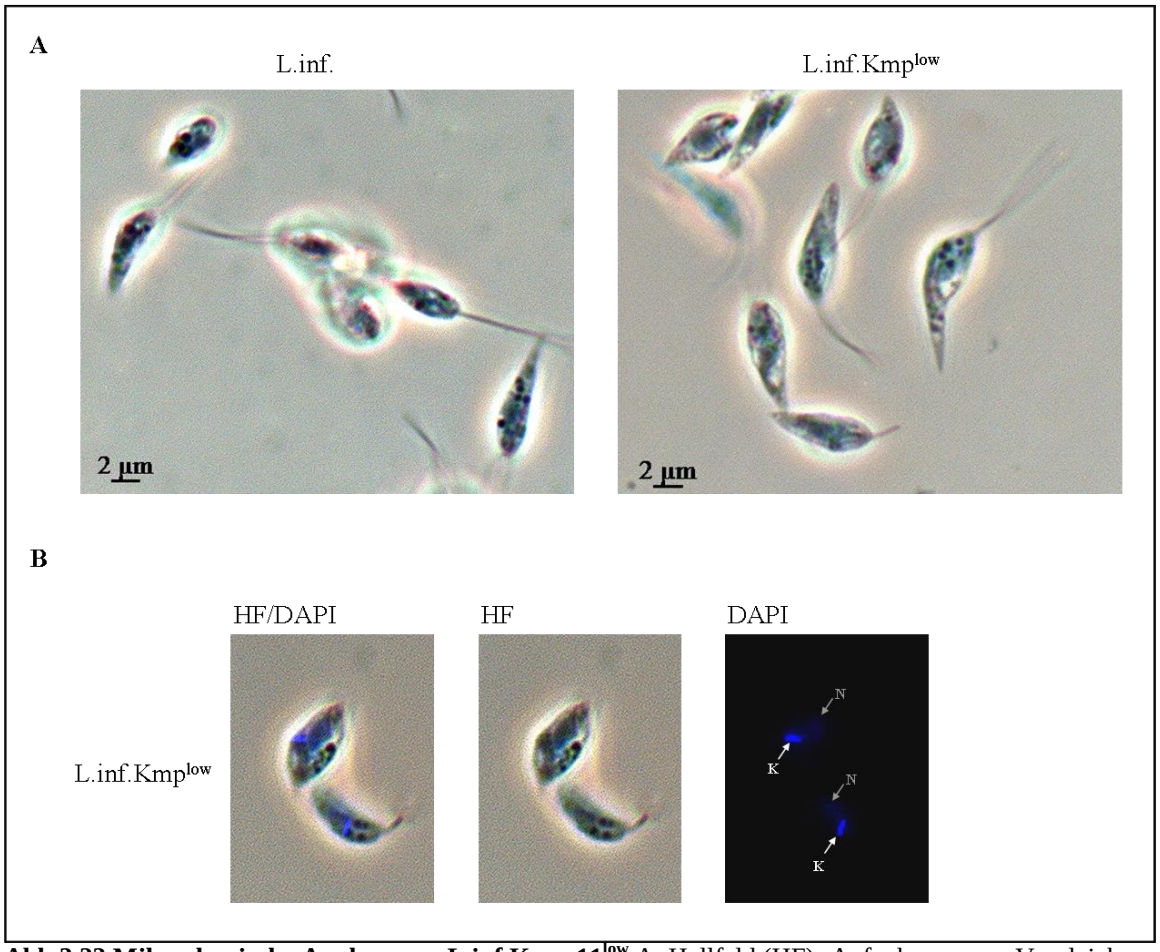

Abb.3.23 Mikroskopische Analyse von L.inf.Kmp-11^{low} A: Hellfeld (HF)- Aufnahmen zum Vergleich von L.inf. und L.inf. Kmp-11^{-low}. B: L.inf. Kmp-11^{low} wurden für die Färbung von Nukleus (N) und Kinetoplast (K) mit Dapi gefärbt.

3.7 Untersuchung der Infektiosität von L.inf.Kmp-11^{low}

Im nächsten Schritt wurden die Kmp-11^{low} Leishmanien auf ihre Fähigkeit hin Makrophagen zu infizieren untersucht. Da sie keine Fluoreszenz besitzen, wurden dazu L.inf. und L.inf Kmp-11^{low} mit Calcein-AM (AM= Acetoxymethylester) gefärbt. Calcein-AM wird durch die Zellmembran in lebende Zellen transportiert, durch intrazelluläre Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppe entsteht das Farbmolekül Calcein. Es verbreitet sich in der Zelle, bindet Calcium und fluoresziert intensiv grün. Nach der Färbung der Leishmanien wurden sie für zwei Stunden mit THP-1 Zellen inkubiert. Infizierte Zellen konnten anschließend durchflusszytometrisch durch ihre Fluoreszenz detektiert werden.

Die Analyse ergab durchschnittlich eine leicht erhöhte Infektionsrate der L.inf. Kmp-11^{low} gegenüber untransfizierten L.inf., jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.24 A+B).

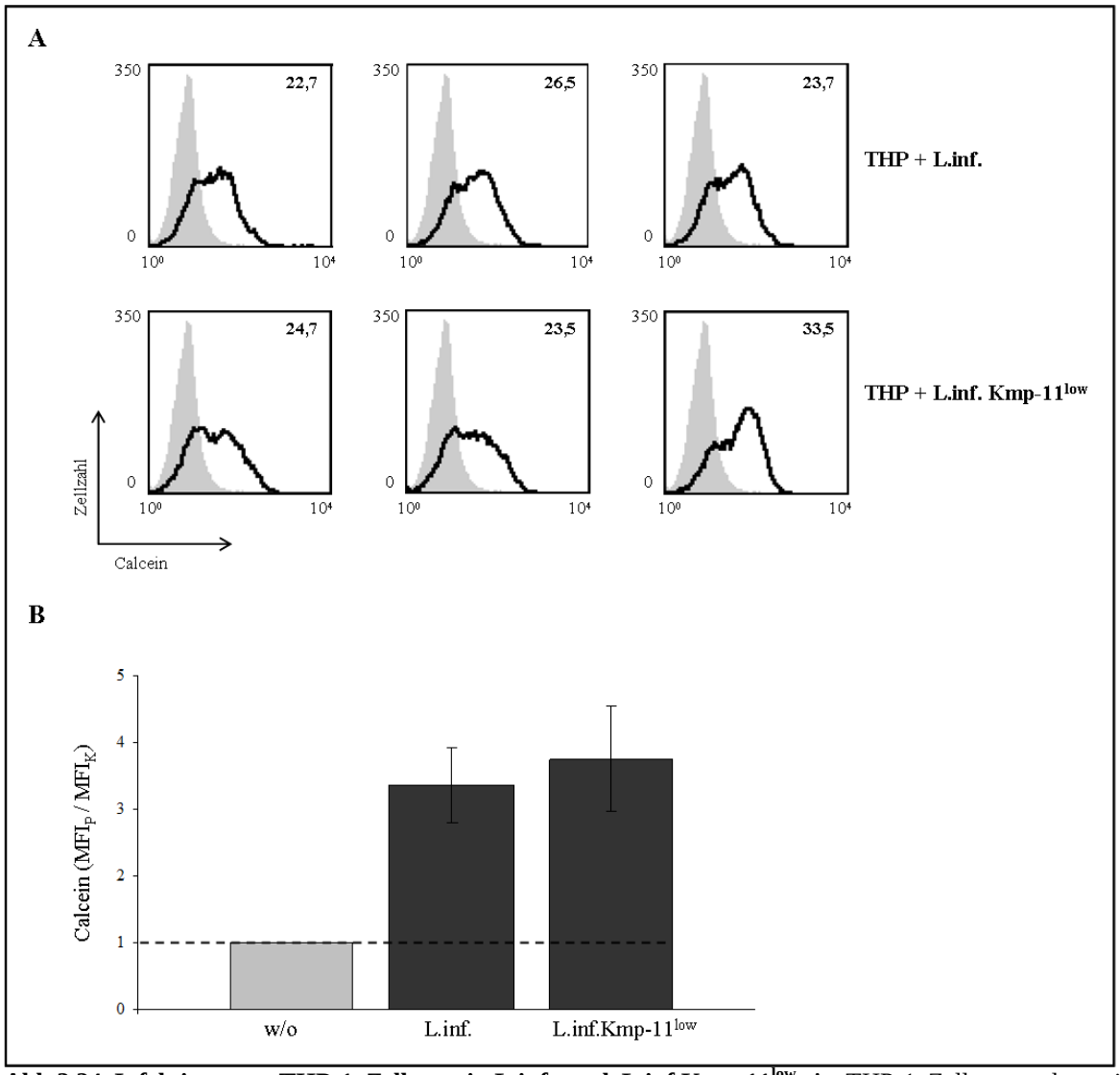

Abb.3.24 Infektion von THP-1 Zellen mit L.inf. und L.inf.Kmp-11^{low} A: THP-1 Zellen wurden mit Calcein-gefärbten L.inf. und L.inf.Kmp-11^{low} für 2 h infiziert. Die Abbildung zeigt die FACS-Analyse mit MFI der behandelten THP-1 Zellen. Gezeigt ist ein Experiment, das mit Triplikaten durchgeführt wurde. Als Kontrolle in grau dargestellt sind unbehandelte THP-1 Zellen. B: Zeigt die Veränderung des Calcein-MFI (MFI Probe/MFI Kontrolle) nach Infektion mit L.inf und L.inf.Kmp-11^{low}.Mittelwerte ± Standardabweichung von zwei Experimenten, in denen jeweils Triplikate gemessen wurden (n=6), sind dargestellt.

Diese Daten zeigten, dass das Fehlen oder zumindest die verminderte Expression von Kmp-11 keine Änderung der Infektiosität der Leishmanien zur Folge hatte. Daraus lässt sich schließen, dass Kmp-11 nicht an den unmittelbaren Mechanismen der Infektion von Zellen durch den Parasiten beteiligt ist.

3.8 Einfluss von Kmp-11 auf das Wachstumverhalten der Leishmanien

Es wurde analysiert, ob sich eine Reduzierung bzw. eine Steigerung der Kmp-11 Expression auf die Verdopplungszeit der Parasiten auswirkt. Dazu wurden bei *Leishmania*-Kulturen über einen Zeitraum von 72 h zu mehreren Zeitpunkten (0 h, 48 h und 72 h) die Zellzahlen durchflusszytometrisch bestimmt, durch die aufgenommenen Zellen pro festgelegter Zeiteinheit. Ausgehend von der Startzellzahl zum Zeitpunkt 0 (t_0) wurde aus den ermittelten Zellzahlen zum Zeitpunkt t_1 (48 h) und t_2 (72 h) die Generationszeit der Parasiten berechnet. Beim Vergleich von L.inf. und L.inf. Kmp-11low, zeigte sich, dass sich die untransfizierten L.inf. deutlich schneller vermehren als die L.inf.Kmp-11low (Abb.3.25A, B). L.inf. benötigten mit ca. 13 h im Durchschnitt über 3 h weniger für eine Verdopplung der Gesamtzellzahl als L.inf.Kmp-11low (Abb.3.25C).
Allerdings konnten im Gegensatz dazu bei Leishmanien, die das Kmp-11-YPSK bzw. Kmp-11-NMCK überexprimierten, keine Unterschiede im Vergleich zu untransfizierten Parasiten in der Generationszeit nachgewiesen werden (Abb.3.25D).

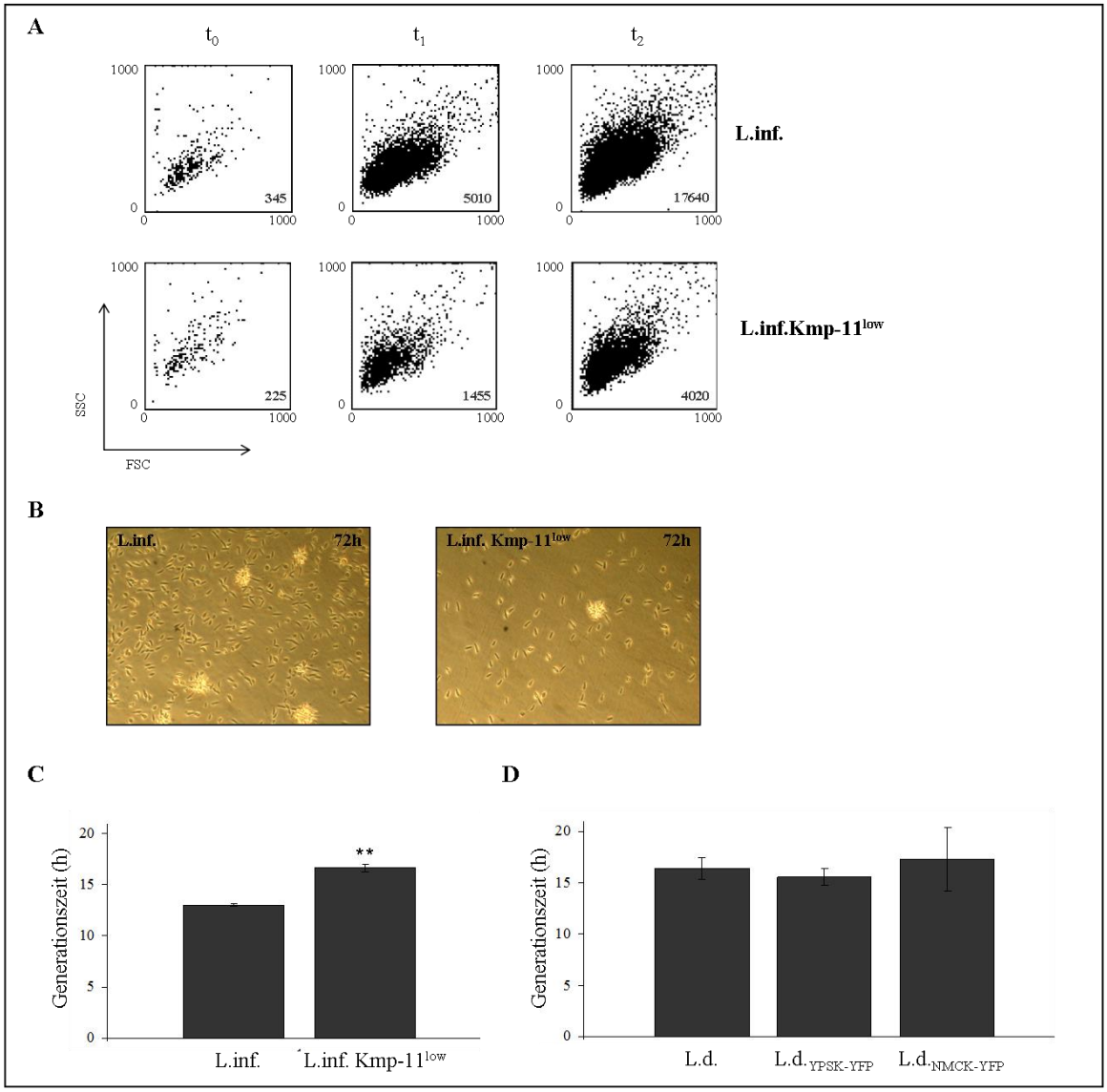

Abb.3.25 Analyse der Generationszeiten A:Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der Zellzahl-Analyse von L.inf. und L.inf.Kmp-11low nach 48 h (t_1) und 72 h (t_2) im Vergleich zur Ausgangszellzahl (t_o) B:Mikroskopische Aufnahmen der Zellen von L.inf. und L.inf.Kmp-11^{low} nach 72 h C: Zeigt Mittelwert ± Standardabweichung der Generationszeiten von L.inf und L.inf.Kmp-11^{low}, wobei jede Generationszeit aus je drei Einzelmessungen bestimmt wurde. Statistisch signifikante Werte sind mit ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet. D: Gezeigt sind die Generationszeiten aus t_0/t_1, t_1/t_2 und t_o/t_2 von Kmp-11-YPSK-YFP und Kmp-11-NMCK-YFP überexprimierenden Parasiten im Vergleich zu untransfizierten Leishmanien.

Diese Analysen zeigten, dass ein Knock-down von Kmp-11 die Generationszeit von *L.infantum* deutlich verlängert. Hingegen, die Überexpression von Kmp-11 in *L.donovani* keinen Einfluss auf die Generationszeit hat.

3.9 Herstellung von rekombinantem Kmp-11-NMCK und –Kmp-11-YPSK

Für die Untersuchung des Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK Proteins *in vitro*, wurden sie in *E.coli* exprimiert und anschließend aus den Bakterien aufgereinigt. Dazu wurden die *Kmp-11* Sequenzen in einen pQE-30 Vektor kloniert, 3' in den Leserahmen, der für ein Histidin Hexamer Epitop codiert.

Die Klonierungsstrategie ist exemplarisch für *Kmp-11-YPSK* gezeigt (Abb.3.26). Die *Kmp-11-YPSK* Sequenz wurde aus genomischer DNA von *L.donovani* amplifiziert und in den pQE-30 Vektor kloniert (Abb.3.26A+B). Die korrekte Integration in das Plasmid wurde mit pQE-30 Primern überprüft. Leervektoren lieferten ein Signal in der Größe von 268 bp, Vektoren mit *Kmp-11* Sequenz ein Signal von 508 bp (Abb.3.26C). Die gleiche Restriktions- und Klonierungsstrategie wurde ebenfalls für die *Kmp-11-NMCK* Sequenz angewendet.

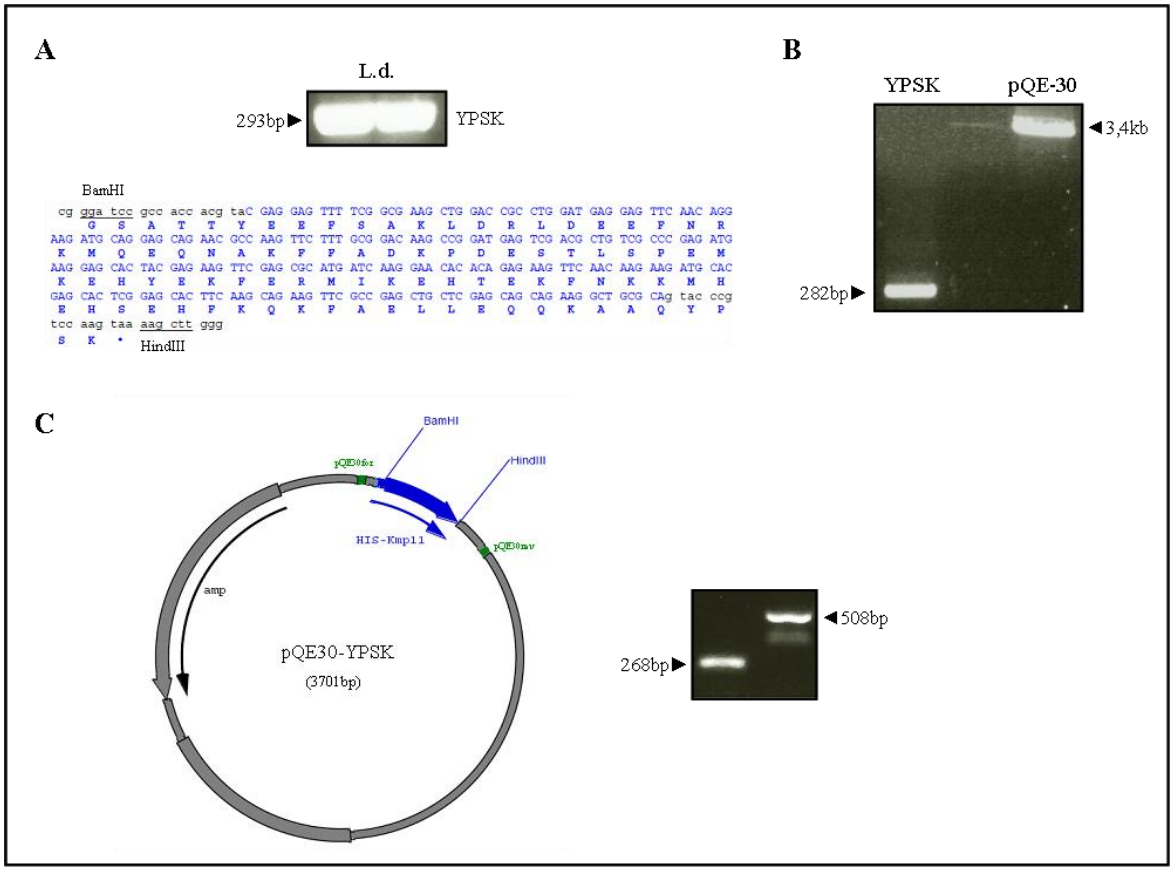

Abb.3.26 Klonierungsstrategie Expression von Kmp-11-YPSK in *E.coli* A: PCR Amplifikation der *Kmp-11-YPSK* Sequenz aus *L.donovani* mit Anfügen einer BamHI- und HindIII-Schnittstelle. B:Verdau von *YPSK*-Amplikon und pQE-30-Vektor mit BamHI und HindIII C:Überprüfung der korrekten Integration in den Vektor mit pQE-30 Primern (grün markiert).

Nach Anzucht der Bakterien konnten beide Proteine aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) durch Affinitätschromatographie mit Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA Agarose) aufgereinigt werden, da der Hexahistidin-Tag mit hoher Affinität an die Nickelionen bindet. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden beide Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Banden eluiert und mittels Massenspektrometrie analysiert (Abb.3.27 A). Durch die Fragmentuntersuchung konnten die aufgereinigten Proteine als HIS-NMCK und HIS-YPSK identifiziert werden. Die Analyse ergab für das HIS-NMCK eine Sequenzabdeckung von 73,8 % und für das HIS-YPSK eine von 80,6 % (Abb.3.27 B).

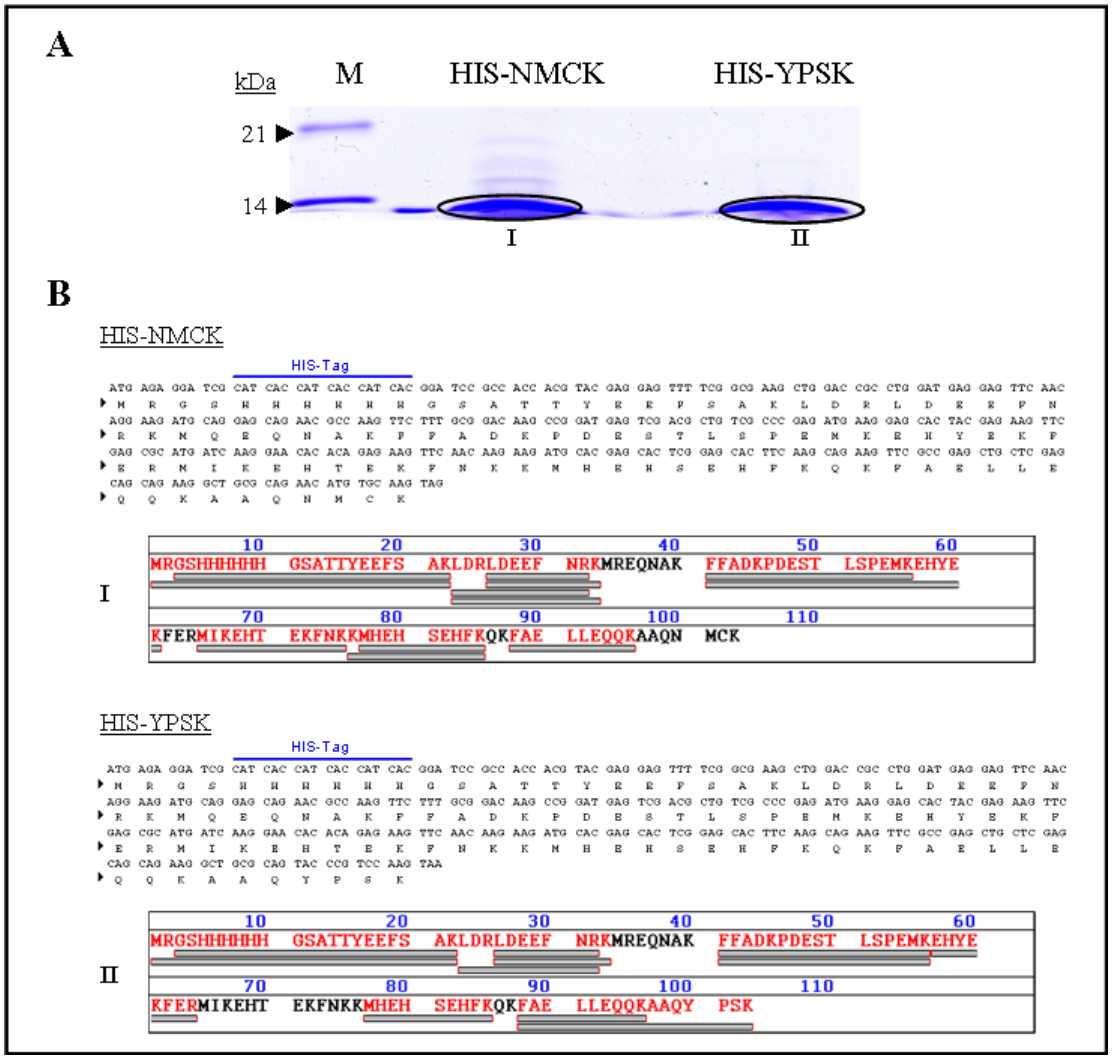

Abb.3.27 Rekombinante HIS-NMCK und HIS-YPSK nach Expression in *E.coli* A: Die aufgereinigten Proteine HIS-NMCK und HIS-YPSK wurden auf ein 13 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Markiert sind die Banden, die aus dem Gel für die Massenspektrometeranalyse ausgeschnitten wurden. B: Die Abbildung zeigt für jedes Protein die Nukleotid- und AS-Sequenz im pQE-30 Vektor mit 5'-terminalem HIS-Tag und das Ergebnis der Massenspektrometerranalyse. Übereinstimmende Sequenzabschnitte sind rot markiert. Die grauen Balken stellen die detektierten Peptidsequenzen im MS-Spektrum dar.

3.10 Dimerisierung des Kmp-11-NMCK Proteins

Das da Kmp-11-NMCK im Gegensatz zum Kmp-11-YPSK ein Cystein am C-Terminus des Proteins besitzt, wurde untersucht, ob das Protein *in vitro* bzw. *in vivo* Dimere bildet. Die AS Cystein zeichnet sich durch eine Thiolgruppe –SH aus, die mit einer Thiolgruppe eines weiteren Cysteins reagieren kann, was zur Ausbildung eines Disulfids führt. Für die Analyse wurde ein *Leishmania* Lysat mit aufgereinigtem HIS-NMCK Protein gemischt und eine SDS-Gelelektrophorese in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine diskontinuierliche, milde Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die gesamte Proteinspur wurde ausgeschnitten und anschließend unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, die Laufrichtung erfolgte 90° zur ersten. Alle in der Probe befindlichen Monomere, die bereits bei der ersten Gelelektrophorese als Monomere vorlagen, befanden sich nach der zweiten gelelektrophoretischen Auftrennung in einer Diagonalen. Liegt ein Protein ursprünglich als Dimer vor, so wandert es im ersten Schritt aufgrund seiner Größe langsamer. Durch die Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung DTT werden kovalente Disulfidbrücken zwischen Cysteinen gelöst und Dimere in Monomere gespalten. Daher erhöht sich die Laufgeschwindigkeit im Gel, da kleine Proteine schneller wandern als große Proteine. Getrennte Monomere eines ursprünglichen Dimers liegen somit nach der Auftrennung unterhalb der Diagonalen.

Die Silberfärbung des SDS-Gels zeigte ein deutliches Signal unterhalb der Diagonalen, das mit dem Molekulargewicht des Kmp-11-Monomers korreliert (Abb.3.28). Durch die massenspektrometrische Analyse konnte es als HIS-Kmp-11 identifiziert werden (Abb.3.28 II). Es befanden sich keine weiteren Banden in der Kmp-11 Spur in der zweiten Dimension. Daher liegt Kmp-11-NMCK vermutlich als Homodimer vor, nicht als Heterodimer mit einem anderen Protein. In Höhe der molekularen Masse von Kmp-11 wurde ein Fragment aus der Diagonalen ausgeschnitten, dass auch HIS-Kmp-11 zugeordnet werden konnte (Abb. 3.28 I). In der Abbildung ist ein weiteres Signal bei ca. 30 kDa unter der Diagonalen zu sehen, das ebenfalls analysiert, aber nicht identifiziert werden konnte.

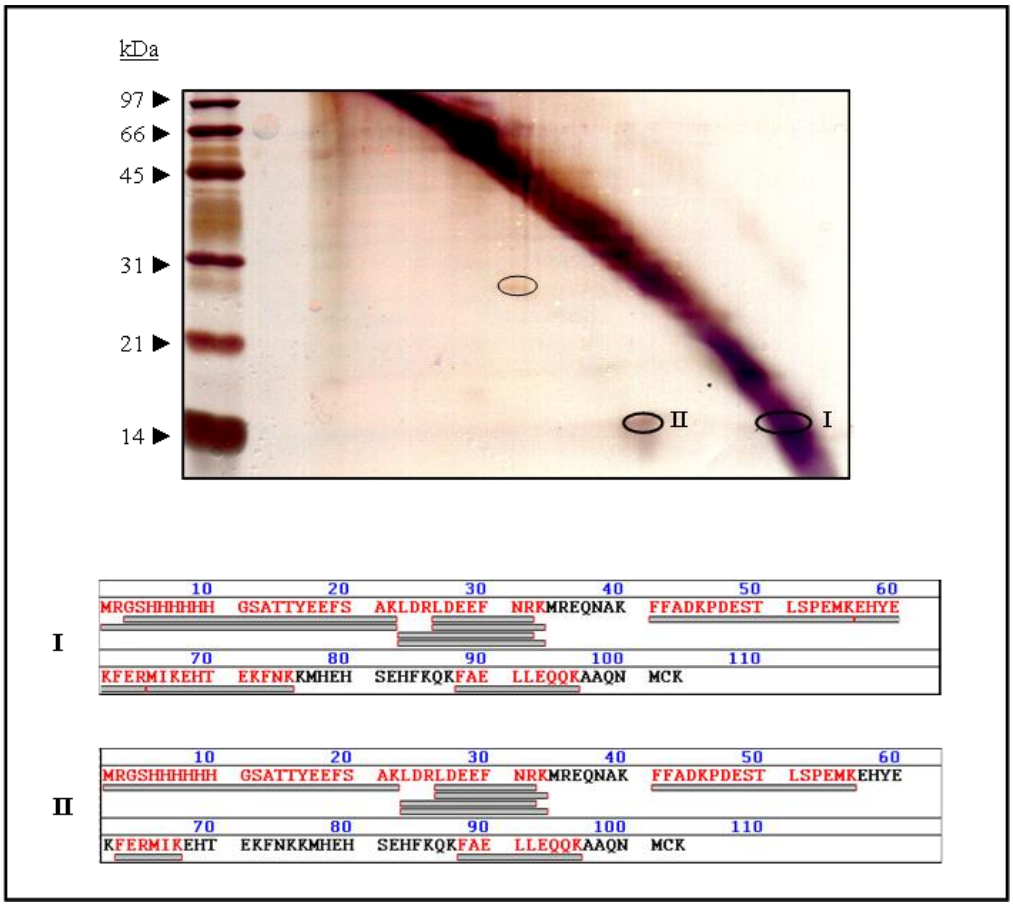

Abb.3.28 Untersuchung einer möglichen Dimerisierung des Kmp-11-NMCK Proteins Aufgereinigtes HIS-NMCK Protein (3 µg) wurde mit *Leishmania* Lysat gemischt und durch eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese mit einem 13 % igen Trenngel aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine kontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Silberfärbung, markiert mit (I) und (II) sind die ausgeschnittenen Kmp-11 Bereiche für die Massenspektrometeranalyse, die unten dargestellt ist. Die Analyse ergab eine Sequenzübereinstimmung mit Kmp-11-NMCK von 74,8 % für (I) und von 62,1% für (II).

Zur Bestätigung der Dimerisierung und den direkten Vergleich zwischen Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK, wurden beide Proteine unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend wurde ein Western Blot mit einem anti-Kmp-11 Antikörper durchgeführt. Die Zugabe von DTT bewirkte beim YPSK-Protein keine Veränderung, es lag wie erwartet als Monomer vor. Das NMCK-Protein lag unter nicht-reduzierenden Bedingungen zum Großteil als Dimer (22 kDa) vor und es war nur ein schwaches Signal in Höhe des 11 kDa Monomers detektierbar (Abb.3.29 A). Wurde nun die Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, so wurden die Disulfidbrücken gelöst und das NMCK-Protein lag zum Großteil als Monomer vor. In Leishmanien konnte dies allerdings nicht nachgewiesen werden. Lysat von *L.donovani*, die beide Formen des Kmp-11 Proteins exprimieren, zeigten in der Western Blot Analyse nur ein starkes Signal in Höhe des Monomers (Abb.3.29 B). In der Größe des Dimers war nur ein schwaches Signal detektierbar, das

aber auch durch die Behandlung mit dem Reduktionsmittel DTT keine Veränderung zeigte. Wenn Kmp-11 *in vivo* dimerisiert, müsste nach Reduktion mit DTT das Signal bei 11 kDa deutlich zunehmen im Vergleich zur Dimerbande bei 22 kDa.

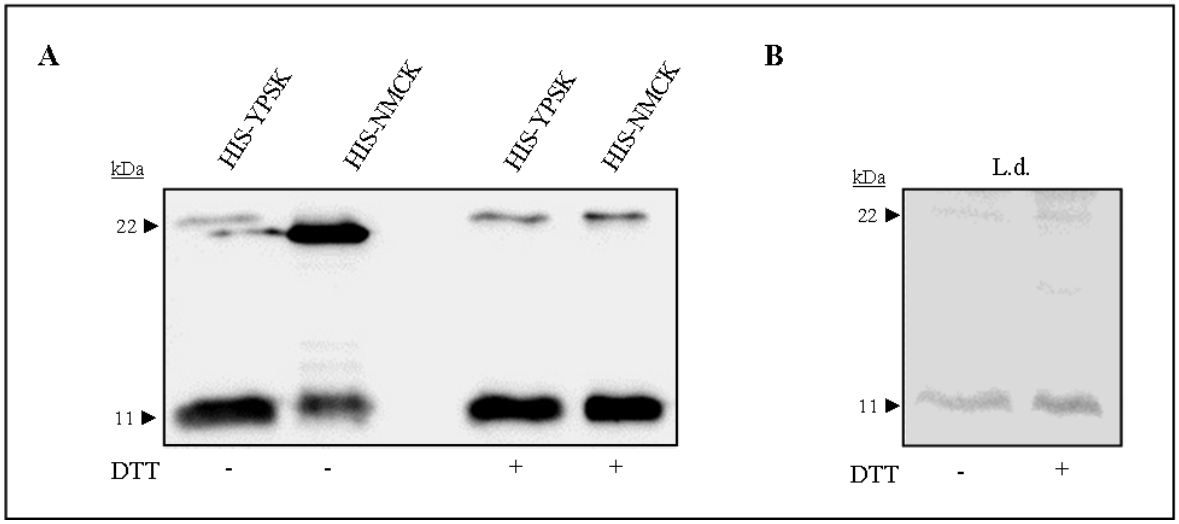

Abb. 3.29 Vergleich von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK *in vitro* und *in vivo* A: Western Blot-Analyse mit anti-Kmp-11 des aufgereinigten HIS-YPSK und HIS-NMCK Proteins. Je 2,5 µg jedes Proteins wurden unter nicht-reduzierenden (DTT -) und reduzierenden (DTT +) Bedingungen durch ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetrennt und mit einem anti-Kmp-11 Antikörper, gefolgt von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. B: Anti-Kmp-11 Western-Blot-Analyse von je 50 µg *L.donovani* Lysat unter nicht-reduzierenden Bedingungen und nach Behandlung mit DTT

Diese Analysen zeigten deutlich, dass das Kmp11-NMCK im Gegensatz zum Kmp11-YPSK, zumindest *in vitro*, in der Lage ist Dimere zu bilden. Eine Dimerisierung von Kmp-11-NMCK *in vivo* kann mit den hier gezeigten Daten nicht ausgeschlossen werden, da die intrinsischen Kmp-11 Signale, die durch den Kmp-11 Antikörper detektiert wurden, sehr schwach waren. Eine Dimerisierung *in vivo* könnte für eine andere Funktion von Kmp-11-NMCK gegenüber Kmp-11-YPSK sprechen.

4 Diskussion

Das *Leishmania* Kmp-11 ist ein hoch immunogenes Protein. Durch mehrere unabhängige Analysen konnte gezeigt werden, dass Kmp-11 die Proliferation von B- und T-Zellen stimuliert sowie zytotoxische T-Zellantworten induziert, wodurch Kmp-11 zu einem Target für Immuntherapien gegen Leishmaniose geworden ist (Cuellar 2009, Diez 2006, Tolson 1994, Basu 2007a, Das 2014). Da das Protein nur innerhalb der phylogenetischen Gruppe der Kinetoplastiden vorkommt und hoch konserviert ist, spielt es vermutlich eine wichtige Rolle in der Biologie der Parasiten (Berberich 1997, Thomas 2001). In der hier vorliegenden Arbeit sollten durch Kmp-11-Überexpression/-K.o. und die Charakterisierung des Kmp-11 Locus in verschiedenen *Leishmania*-Spezies weitere molekularbiologische und biochemische Kenntnisse über dieses Antigen gewonnen werden.

Die Methode des gerichteten Genaustauschs (*targeted gene replacement*), um Knock-outs oder Gendeletionen über homologe Rekombination in parasitischen Protozoen herbeizuführen, wurde in den frühen 1990s etabliert und wird heute routinemäßig eingesetzt, um die Wichtigkeit oder Funktion eines Gens zu untersuchen (Roberts 2011).
Da Leishmanien zu den diploiden Organismen gehören und bisher keine sexuelle Fortpflanzung nachgewiesen wurde, sind für einen homozygoten K.o. zwei Rekombinationen notwendig, um beide Allele auszuschalten. Dies kann mit Hilfe von Antibiotikaresistenz-Genen wie *HYG*, *NEO*, *PAC* (*puromycin acetyltransferase*) oder *PHLEO* (*phleomycin binding protein*) erfolgen, durch deren Übertragung ein Selektionsmechanismus ermöglicht wird (Roberts 2011, Freedman 1993, Cruz 1991).
Erfolgreiche homozygote Knock-outs durch homologe Rekombination konnten bereits für mehrere *Leishmania*-Gene gezeigt werden wie für *ODC* (*ornithine decarboxylase*), *A600*, *SPDSYN* (*spermidine synthase*) und *LmGT* (*L.mexicana glucose transporter*) (Jiang 1999, Murray 2010, Roberts 2001, Burchmore 2003).
In dieser Arbeit wurde versucht Kmp-11$^{-/-}$ Mutanten von *L.infantum* über homologe Rekombination zu erzeugen. PCR-Analysen zeigten auf eine richtige Integration des HYG- als auch des NEO- Konstrukts im *Leishmania*-Genom (Abb.3.21). Dennoch konnten PCR-Amplikons für Kmp-11A-C detektiert werden (Abb.3.22 A). Da die 5' und 3' *Kmp-11* UTR-Sequenzen in beiden Konstrukten gleich sind, wäre eine Erklärung hierfür, dass bei der zweiten Transfektion, das bereits deletierte Allel mit dem neu eingebrachten

Konstrukt rekombiniert hat. Somit könnte eine gemischte Population entstanden sein, aus Parasiten, die jeweils nur ein deletiertes Allel tragen. Dagegen spricht, dass die K.o.-Parasiten sowohl resistent gegen HYG als auch NEO sind, was für den Einbau beider Konstrukte sprechen würde. Deshalb wurde während dieser Arbeit zusätzlich eine Strategie verfolgt mit Rekombinationskonstrukten, die unterschiedliche *Kmp-11* UTR-Sequenzen enthielten. Die transfizierten Leishmanien zeigten aber ebenfalls nach zwei Transfektionen das Vorhandensein von Kmp-11 sowohl in der PCR als auch im Western Blot (Daten nicht gezeigt). Das ein K.o. in Leishmanien durchaus mit Komplikationen verbunden sein kann, zeigen folgende Arbeiten. El Fadili et al. versuchten ebenfalls durch gerichtete Gendeletion in *L.infantum* einen Kmp-11-K.o. zu erzielen. Southern Blot Analysen zeigten aber auch hier, dass mindestens ein Allel intakt blieb und im Western Blot bestätigte sich, dass die Parasiten immer noch Kmp-11 exprimierten (El Fadili 2009).
Cruz et al. versuchten in virulenten *L.major* mit einem NEO- und einem HYG-Rekombinationskonstrukt eine Inaktivierung des *dhfr-ts* (*dihydrofolate reductase-thymidylate synthase*) Locus zu erzielen. Karyotyp-Analysen zeigten aber, dass die zweifach transfizierten Leishmanien eine Änderung ihrer Chromosomenanzahl vorgenommen haben. Sie waren aneuploid. Die Parasiten enthielten sowohl die durch das NEO- und HYG-Konstrukt eingebrachten Rekombinationen aber zusätzlich auch ein oder mehrere Wildtyp-Chromosomen mit einem intakten *dhfr-ts* Locus (Cruz 1993).
Ähnliche Beobachtungen machten Wissenschaftler aus Kanada beim Versuch die Trypanothion-Reduktase (TR, *trypanothione reductase*) auszuschalten, ein für die Trypanosomatiden essentielles Enzym, welches für die Detoxifizierung von ROS verantwortlich ist. Sowohl in *L.donovani* als auch in *L.major* konnten sie keinen homozygoten TR-K.o. herstellen. Anders als bei Cruz kam es hier nicht zu einer Verdopplung der Chromosomenanzahl, sondern zu einer Verlängerung des Chromosoms durch eine zusätzliche TR-Kopie (Dumas 1997). Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass die Parasiten einen Schutzmechanismus entwickelt haben, um der Deletion eines für sie essentiellen Gens zu umgehen, da ein homozygoter K.o. für sie in diesem Fall eventuell letal wäre. Handelt es sich im Gegenzug um ein nicht notwendiges Gen, scheint eine zweite Transfektionsrunde erfolgreich zu einem K.o. mit vitalen Leishmanien führen zu können (El Fadili 2009, Cruz 1993, Dumas 1997).
Die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zusammen mit Versuchen dieser Arbeit zur Herstellung von L.inf. Kmp-$11^{-/-}$ lassen vermuten, dass es sich ebenso bei Kmp-11 um ein

für das Überleben des Parasiten essentielles Protein handelt und nur Parasiten, denen es gelingt den Verlust des Gens zu kompensieren, eine Überlebenschance haben.
Li et al. konnten zeigen, dass ein Knock-down des Kmp-11 Proteins durch RNAi in *T.brucei* zu einem Defekt der Basalkörpertrennung und zur Beeinträchtigung der Zytokinese führte (Li 2008). Die Trypanosomen enthielten eine Vielzahl unterschiedlich großer Nuclei in der Zelle, was auf eine kontinuierliche wenn auch fehlerhafte Kernteilung bei gleichzeitiger Blockierung der Zellteilung hindeutete. In den prozyklischen Stadien führte der Knock-down zusätzlich zu einer Störung bei der Ausbildung einer neuen FAZ und der Bildung des neuen Flagellums. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Kmp-11 zumindest in Trypanosomen eine Rolle bei der Regulierung der Mitose spielt. Für einen vollständigen Ablauf der Zytokinese sind die Bildung des neuen Flagellums sowie die Verbindung an der FAZ essentiell. Eine Störung beider Prozesse resultiert in einer fehlerhaften Teilung (Kohl 2003). Es wird angenommen, dass die FAZ nicht nur für die Verbindung der Flagelle mit der Zellmembran verantwortlich ist, sondern zudem auch für die Regulierung der Zellteilung notwendig ist (Vaughan 2008).
Die hier durchgeführten Experimente in Leishmanien zeigten zum einen, dass eine starke Expressionsminderung des Kmp-11 Proteins die Verdopplungszeit von *L.infantum* signifikant verlängert (Abb.3.25). Zum anderen konnte durch mikroskopische Analysen beobachtet werden, dass die Leishmanien je einen Kinetoplasten und einen Nukleus hatten (Abb.3.23), sodass man nicht von einer gestörten Zellteilung, verursacht durch die Reduzierung des Kmp-11 wie bei Li et al. ausgehen kann. Eine Auswirkung auf die Generationszeit konnte durch eine Überexpression von Kmp-11-NMCK bzw. -YPSK auch nicht gezeigt werden (Abb.3.25).

Lacerda et al. zeigten, dass die Zugabe von exogenem Kmp-11 Protein die Infektion von murinen Makrophagen mit *L.amazonensis* erhöht (Lacerda 2012). Die Makrophagen sekretierten vermehrt anti-inflammatorisches IL-10, wohingegen die NO-Produktion reduziert war. Durch Zugabe von anti-Kmp-11- oder anti-IL-10- neutralisierender Antikörper wurde die durch exogenes Kmp-11 erhöhte Parasitenlast in den Makrophagen vermindert. Zudem konnte die Zugabe der neutralisierenden Antikörper die Parasitenanzahl in Makrophagen reduzieren, die nicht mit zusätzlichem, exogenem Kmp-11 behandelt wurden. Somit könnte Kmp-11 ein entscheidender Virulenzfaktor der Leishmanien sein.

Die hier durchgeführten Experimente zeigten, dass ein Knock-down des Kmp-11 Proteins keinen Einfluss auf die Infektiosität der Leishmanien ausübt (Abb.3.24). Deshalb lässt sich vermuten, dass Kmp-11 nicht an den unmittelbaren Mechanismen der Infektion von Zellen durch den Parasiten beteiligt ist. Eine Überexpression von Kmp-11 scheint sogar die Infektiosität zu inhibieren (Abb.3.15 und Abb.3.16). Die Resultate dieser Arbeit stehen aber nicht im Widerspruch zu denen von Lacerda et al., da in deren Arbeit zunächst die Makrophagen für vier Stunden mit *L.amazonensis* inkubiert wurden und erst nach Entfernung der extrazellulären Leishmanien das Kmp-11-Protein hinzugegeben wurde. Die Anzahl der amastigoten Parasiten in den Makrophagen wurde nach 48 h bestimmt. Die Analysen führen zu der Annahme, dass Kmp-11 nicht die Phagozytose und somit die Infektiosität steigert, sondern eher das Überleben und die Replikation der Parasiten in den Makrophagen fördert.
Zudem fanden Lacerda et al. Kmp-11 im Überstand von infizierten Makrophagen, wodurch sie vermuten, dass endogenes Kmp-11 während der Infektion freigesetzt wird oder bei der Lyse der infizierten Zellen. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Infektion mit den Kmp-11-YPSK-YFP bzw. -NMCK-YFP überexprimierenden Leishmanien wurde in der hier vorliegenden Arbeit keine „freie“ Fluoreszenz in den Makrophagen detektiert.

Seit der Co-Aufreinigung des Kmp-11 mit LPG von der Zelloberfläche promastigoter *L.donovani* wird eine Beziehung beider Moleküle zueinander angenommen. Untersuchungen haben gezeigt, dass LPG unterschiedliche Modifikationen während des Lebenszyklus der Parasiten aufweist. *L.major* exprimiert, je nach Stadium (amastigot oder promastigot), ein antigenvariables und biochemisch unterschiedliches LPG (Glaser 1991, Moody 1993). Für *L.donovani* konnte gezeigt werden, dass die LPG Expression in promastigoten Parasiten deutlich höher ist als in den amastigoten Formen (Mengeling 1997, McConville 1991). In Promastigoten vermittelt LPG die Anheftung an bzw. Ablösung vom Darmepithel der Mücke, spielt eine Rolle bei der Bindung an die Makrophagen des Säugetierwirts und verzögert die Phagolysosom-Biogenese im Makrophagen (Turco 1992, Moradin 2012).
Auch für Kmp-11 konnte gezeigt werden, dass es stadienspezifisch exprimiert wird. In den Blutstromformen von *Trypanosoma sp.* wird Kmp-11 in geringeren Mengen exprimiert als in den prozyklischen Stadien im Insektenwirt (Stebeck 1995). Für *L.infantum* ist ebenfalls bekannt, dass die Expression in den amastigoten Formen reduziert ist im Vergleich zu den

Promastigoten (Berberich 1998). Fluoreszenzmikroskopische Analysen von promastigoten *L.infantum* zeigten intensive Kmp-11 Fluoreszenz in der Flagelle sowie in der Flagellentasche, aber zum Teil auch in einigen Parasiten eine diffuse Verteilung von Kmp-11 in der ganzen Zelle (Berberich 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche subzelluläre Lokalisation auch für promastigote *L.donovani* und L.major gezeigt werden (Abb.3.10, Abb.3.11). Mit einem anti-Kmp-11 Antikörper konnten Beberich et al. keine Fluoreszenz in amastigoten Parasiten detektieren. Dennoch muss eine Kmp-11 Expression vorhanden sein, sie konnten im Lysat von amastigoten *L.infantum* eine geringe Immunoreaktivität gegen Kmp-11 im ELISA zeigen. Jardim et al. wiesen hingegen signifikante Mengen von Kmp-11 sowohl in promastigoten als auch in amastigoten *L.donovani* nach (Jardim 1995b).

Für Trypanosomen konnte Kmp-11 Expression im Zytoplasma, in der Flagelle und in der Flagellentasche gezeigt werden (Stebeck 1995, Diez 2008). Li et al. (2008) beobachteten mittels spezifischer Antikörper, dass Kmp-11 neben der Flagelle auch in den Basalkörpern beider Entwicklungsstadien von *T.brucei* exprimiert wird.

Es wurde zuvor jedoch noch nie untersucht, ob beide Kmp-11 Varianten, Kmp-11-YPSK und -NMCK unterschiedlich in der Zelle exprimiert werden. Die fluoreszenz-mikroskopischen Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Kmp-11-YPSK-YFP und -NMCK-YFP in den Parasiten keine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen (Abb.3.10). Sowohl das Kmp-11-YPSK als auch das -NMCK Protein wurde im Zellkörper und der Flagelle nachgewiesen. Eine verstärkte Expression war an der Flagellentasche sowie im Bereich des Kinetoplasten zu sehen. Auch in *L.major* Parasiten, die kein endogenes Kmp-11-NMCK besitzen, zeigt sich ein vergleichbares Verteilungsmuster wie bei *L.donovani*.

Fluoreszenzanalysen der L.m.$_{\text{NMCK-YFP}}$ zeigten bei einigen Leishmanien Foci mit starken Kmp-11-NMCK-YFP Signalen im Zellkörper zusätzlich zu den Signalen in der Flagellentasche und Flagelle, was darauf hindeutet, dass das Protein in der Zelle akkumuliert (Abb.3.11).

Berberich et al. zeigten, dass das Kmp-11 Protein die Tendenz besitzt *in vitro* zu dimerisieren (Berberich 1997). Western Blots inkubiert mit Serum von VL Hunden zeigten, dass rekombinantes Kmp-11 von den im Serum enthaltenen Antikörpern bei 11 kDa erkannt wurde und zusätzlich konnte ein weiteres Signal bei 22 kDa detektiert werden, das der Größe eines Kmp-11-Dimers entspricht. Lacerda et al. konnten ebenfalls

in Western Blot Analysen mit rekombinantem Kmp-11 ein zweites Signal für Kmp-11 bei 22 kDa zeigen.

Allerdings handelte es sich sowohl bei Berberich et al. (*L.infantum* Kmp-11) als auch bei Lacerda et.al (*L.amazonensis* Kmp-11) um aufgereinigtes Kmp-11-YPSK. Die Oligonukleotide, mit denen sie *Kmp-11* amplifizierten, basierten auf einer *Kmp-11-YPSK* Sequenz. In den hier durchgeführten PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit PCR möglich ist, zwischen einer *Kmp-11-YPSK* und einer *-NMCK* Sequenz zu differenzieren, obwohl die 3'-Primer sich in nur vier Nukleotiden unterscheiden (Abb.3.7 A). Für *L.major* Parasiten, die keine *Kmp-11-NMCK* Sequenz im Genom enthalten, wurde nur für die *Kmp-11-YPSK* Sequenz ein Signal nach der gelelektrophoretischen Auftrennung detektiert (Abb.3.7 B). Dennoch kann es, verursacht durch die wenigen vorhandenen Nukleotidunterschiede in der *Kmp-11-YPSK* und *-NMCK* Sequenz, nicht ausgeschlossen werden, dass Berberich et al. sowie Lacerda et al. *Kmp-11-NMCK* amplifizierten.

Die in dieser Arbeit gezeigten Analysen der rekombinanten, aufgereinigten Kmp-11-Proteine *in vitro* haben gezeigt, dass das Kmp-11-NMCK Protein dimerisiert (Abb.3.28, 3.29 A). Für aufgereinigtes Kmp-11-YPSK konnte dies nicht nachgewiesen werden. *In vivo* könnte eine Dimerisierung für eine differenzielle Funktion des Kmp-11-NMCK sprechen. Ob es *in vivo* auch dimerisiert, konnte nicht geklärt werden, da die intrinsischen Kmp-11 Signale, die durch den Kmp-11 Antikörper detektiert wurden, sehr schwach waren (Abb.3.29 B). Zudem ist durch den Kmp-11 Antikörper keine Unterscheidung beider Kmp-11 Proteine möglich und Leishmanien besitzen nur ein *Kmp-11-NMCK* im Vergleich zu zwei *Kmp-11-YPSK*.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der Kmp-11 Locus von verschiedenen *Leishmania*-Spezies eingehend untersucht. Das erste *Leishmania* Genom, das komplett sequenziert wurde, war das von *L.major* Friedlin (Ivens 2005). In den letzten Jahren folgte die Sequenzierung der Genome von *L.infantum* (Klon JPCM5), *L.braziliensis* (Klon MHOM/BR/75M2904), *L.mexicana* (Klon MHOM/GT/2001/U1103) und kürzlich *L.donovani* (Klon BPK282A1) (GeneDB, NCBI). Durchgeführte Sequenzanalysen unserer Arbeitsgruppe zusammen mit deren Vergleich der verfügbaren Genomdaten zeigen, dass der Kmp-11 Locus in verschiedenen Spezies unterschiedlich aufgebaut ist. Das Kmp-11 wird durch mehrere Sequenzen codiert, die im Fall von *L.infantum, L.donovani und L.mexicana* zudem einen Polymorphismus aufweisen und zur Expression von zwei

unterschiedlichen Varianten des Kmp-11 führen, einmal mit den C-terminalen AS YPSK und einmal NMCK (Abb.3.1, Tabelle 1).

Die *Kmp-11* Loci von *L.mexicana* und *L.infantum* sind in Aufbau und Größe vergleichbar, sie bestehen aus einem *Kmp-11-NMCK* (Kmp-11A) gefolgt von zwei *Kmp-11-YPSK* (Kmp-11B und C). Für *L.donovani* konnte zwar das Vorkommen von *Kmp-11-NMCK* und *Kmp-11-YPSK* nachgewiesen werden, jedoch wurde nicht das Vorhandensein von zwei Kopien *Kmp-11-YPSK* in BPK282A1 gezeigt (GeneDB).

Basierend auf den Genomdaten wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht, ob der Kmp-11-Locus von *L.tropica* und *L.aethiopica* im Aufbau dem von *L.infantum* ähnelt. Zudem wurde in die Analysen ebenfalls *L.donovani* integriert, da Jardim et al bereits 1995 durch Southern Blot Analysen zeigten, dass die Parasiten drei Kmp-11 Kopien besitzen. Für *L.tropica*, *L.aethiopica* und *L.donovani* konnten mit den hier durchgeführten Sequenzanalysen alle drei *Kmp-11* Sequenzen, *Kmp11-A, B* und *C*, nachgewiesen werden (Abb.3.4-3.6). Somit zeigen die Untersuchungen erstmals das Vorhandensein von *Kmp-11-NMCK* Sequenzen im Genom von *L.tropica* und *L.aethiopica*, was für diese beiden Spezies zuvor noch nicht beschrieben wurde. Zudem konnten sowohl bei *L.donovani*, *L.tropica* als auch bei *L.aethiopica* zu der *Kmp-11-NMCK* Sequenz erstmals auch zwei *Kmp-11-YPSK* Sequenzen gefunden werden, was die Annahme bekräftigt, dass der *Kmp-11* Locus ähnlich dem von *L.infantum* aufgebaut ist.

Für alle drei *Kmp-11* Sequenzen waren die Nukleotidsequenzen von *L.infantum* und *L.donovani* identisch (Abb.3.4-3.6). Die Sequenzen von *L.tropica* und *L.aethiopica* weisen gemeinsame Nukleotidabweichungen auf, in allen drei *Kmp-11* Sequenzen an den gleichen Positionen zu finden sind (Nukleotid 171, 238, 243, Abb.3.4-3.6). Somit zeigt *L.tropica* mehr Homologien zu *L.aethiopica* als zu *L.infantum*. Zu bemerken ist, dass momentan die Einteilung von *L.tropica* und *L.aethiopica* als separate Spezies diskutiert wird, da sie bei neueren durchgeführten phylogenetischen Studien nicht unterscheidbar sind (Schönian 2010). Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen die Diskussion dahingehend, dass sich die *Kmp-11* Loci von *L.tropica* und *L.aethiopica* durch identische Nukleotidaustausche von den *L.infantum* (bzw. *L.donovani*) Sequenzen unterscheiden, *L.tropica* und *L.aethiopica* untereinander aber nahezu identische Sequenzen aufweisen.

Ebenfalls konnte durch die Analysen die hohe Konserviertheit der *Kmp-11* Sequenzen bei mehreren *Leishmania*-Spezies gezeigt werden. Auch in Trypanosomen sind die *Kmp-11* Sequenzen hochkonserviert, so sind z.B. die *T.cruzi* und *T.rangeli Kmp-11* Sequenzen zu 97 % homolog (Diez 2005).

In Trypanosomen besteht der Kmp-11 Locus aus vier Kmp-11 Kopien, die durch gleich große intergenische Regionen getrennt sind (Diez 2005, Thomas 2000). Im Gegensatz dazu sind die Kmp-11 Kopien in Leishmanien durch unterschiedlich lange Regionen separiert (Abb.3.1 A).

Eine Variabilität der vier C-terminalen AS in den Kmp-11 Sequenzen wie bei Leishmanien findet sich in Trypanosomen nicht, die Kmp-11 Sequenzen enden mit den AS FPGK. Ebenso weisen Kmp-11-Sequenzen von *Crithidia sp*. und *Bodo sp*. das gleiche C-terminale Ende wie Trypanosomen auf. *L.braziliensis* ist die bis jetzt einzig bekannte *Leishmania*-Spezies mit drei identischen Kmp-11-Kopien. Alle drei Kmp-11 enden mit den AS YPGK (GeneDB).

Interessanterweise ist der Kmp-11 Locus in Leishmanien je nach Spezies auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. In *L.major* und *L.infantum* befindet sich der Kmp-11 Locus auf Chromosom 35, wohingegen Kmp-11 in *L.braziliensis* und *L.mexicana* auf Chromosom 34 lokalisiert ist (NCBI). Auch in Trypanosomen konnte der Kmp-11-Locus speziesabhängig auf verschiedenen Chromosomen gezeigt werden (Thomas 2000, Diez 2005).

Anhand der Beobachtungen, die bei den Sequenzvergleichen von Kmp-11 gemacht wurden, würde sich das Protein gut eignen für die Ermittlung von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen zwischen den Gruppen der *Kinetoplastida*, sowie zwischen den einzelnen Spezies. Ebenfalls könnten die intergenischen Regionen des Kmp-11 Locus miteinbezogen werden, da auch diese Sequenzen konserviert zu sein scheinen. Die Oligonukleotide, die für die Amplifizierung der *Kmp-11A, -B, -C* Sequenzen verwendet wurden, basierten auf dem bereits sequenzierten *L.infantum* Genom. Dennoch konnten bei den anderen *Leishmania* Spezies starke PCR-Amplikons detektiert werden. So zeigte sich aber sowohl bei *L.tropica* als auch bei *L.aethiopica* in der PCR für *Kmp11C* nur ein schwaches Signal im Vergleich zu *L.infantum* (bzw. *L.donovani)* (Abb. 3.3), was vermuten lässt, dass auch die UTR Regionen speziesspezifisch sind. Durch Vergleiche der UTR-Sequenzen verschiedener Spezies könnten weitere Kenntnisse über das Kmp-11 Protein gewonnen werden, da mehrere Untersuchungen gezeigt haben, das Sequenzen in den 3'-UTR-Regionen der mRNA die Genexpression in Kinetoplastiden beeinflussen können (Clayton 2002, Martinez-Calvillo 2010).

Es konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Kmp-11-NMCK überexprimierenden *Leishmania*-Transfektanten nicht so stabil waren wie die Kmp-11-YPSK Parasiten und das Fusionskonstrukt wieder verloren haben**.** Das könnte

dafür sprechen, dass Kmp-11-NMCK und Kmp-11-YPSK unterschiedliche Funktionen besitzen und anders als bei Kmp-11-YPSK eine Überexpression des Kmp-11-NMCK nicht lange von den Parasiten tolerierbar ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen und gezeigten Ergebnisse, machen das Kmp-11-Protein weiterhin zu einem wichtigen und interessanten Forschungsobjekt zukünftiger Arbeiten. Nicht zuletzt durch die Tatsache, das hier auch gezeigt werden konnte, das die Infektion von Parasiten mit Kmp-11-YFP im Vergleich mit YFP allein, zu einer Erhöhung der Expression von HLA-Klasse II-Molekülen auf den infizierten Makrophagen führt (Abb.3.19). Somit scheint eine Funktion des Kmp-11 bei der Herunterregulierung der HLA Expression, als Mechanismus der Immunevasion, unwahrscheinlich. Das Ergebnis, dass ein Kmp-11-K.o. nicht möglich scheint, deutet darauf hin, dass das Protein für das Überleben der Zelle essentiell ist und damit seiner Rolle als spannendes, immunogenes Antigen für eine Immuntherapie gerecht wird.

5 Literaturverzeichnis

Agallou, M., M. Margaroni, et al. (2011). "Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis." Vaccine **29**(31): 5053-64.

Ahluwalia, S., S. D. Lawn, et al. (2004). "Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America." Bmj **329**(7470): 842-4.

Alvar, J., I. D. Velez, et al. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.

Arens, R. and S. P. Schoenberger (2010). "Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation." Immunol Rev **235**(1): 190-205.

Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses." Int J Parasitol **30**(12-13): 1269-81.

Bailey, H. and W. J. Bishop (1959). "Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951." Br J Vener Dis **35**(1): 8-9.

Barral-Netto, M., A. Barral, et al. (1992). "Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism." Science **257**(5069): 545-8.

Barratt, G. and P. Legrand (2005). "Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis." Curr Opin Infect Dis **18**(6): 527-30.

Bastrenta, B., N. Mita, et al. (2003). "Human mixed infections of Leishmania spp. and Leishmania-Trypanosoma cruzi in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(2): 255-64.

Basu, R., S. Bhaumik, et al. (2005). "Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of Leishmania donovani that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis." J Immunol **174**(11): 7160-71.

Basu, R., S. Bhaumik, et al. (2007a). "Hybrid cell vaccination resolves Leishmania donovani infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13." Infect Immun **75**(12): 5956-66.

Berberich, C., J. M. Requena, et al. (1997). "Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the Leishmania infantum KMP-11 protein." Exp Parasitol **85**(1): 105-8.

Bhaumik, S., R. Basu, et al. (2009). "KMP-11 DNA immunization significantly protects against L. donovani infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against L. major." Vaccine **27**(9): 1306-16.

Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1998). "The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion." Int J Parasitol **28**(1): 121-34.

Bogdan, C., G. Schonian, et al. (2001). "Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature." Clin Infect Dis **32**(2): 302-6.

Boucher, N., Y. Wu, et al. (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in Leishmania mediated by a conserved 3'-untranslated region element." J Biol Chem **277**(22): 19511-20.

Brittingham, A., G. Chen, et al. (1999). "Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin." Infect Immun **67**(9): 4477-84.

Brittingham, A., C. J. Morrison, et al. (1995). "Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-11.

Bryceson, A. (2001). "A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance." Trop Med Int Health **6**(11): 928-34.

Burchmore, R. J., D. Rodriguez-Contreras, et al. (2003). "Genetic characterization of glucose transporter function in Leishmania mexicana." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3901-6.

Campos-Neto, A., J. R. Webb, et al. (2002). "Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice." Infect Immun **70**(6): 2828-36.

Carrera, L., R. T. Gazzinelli, et al. (1996). "Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice." J Exp Med **183**(2): 515-26.

Carrillo, E., M. Crusat, et al. (2008). "Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis." Vaccine **26**(15): 1902-11.

Chakravarty, J., S. Kumar, et al. (2011). "A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis." Vaccine **29**(19): 3531-7.

Chalifour, A., P. Jeannin, et al. (2004). "Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production." Blood **104**(6): 1778-83.

Choo, S. Y. (2007). "The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications." Yonsei Med J **48**(1): 11-23.

Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." Embo J **21**(8): 1881-8.

Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." Annu Rev Immunol **12**: 259-93.

Cruz, A., C. M. Coburn, et al. (1991). "Double targeted gene replacement for creating null mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7170-4.

Cruz, A. K., R. Titus, et al. (1993). "Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(4): 1599-603.

Cuellar, A., F. Rojas, et al. (2009). "Natural CD4(+) T-cell responses against Trypanosoma cruzi KMP-11 protein in chronic chagasic patients." Immunol Cell Biol **87**(2): 149-53.

Cupolillo, E., G. Grimaldi Junior, et al. (1995). "Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 145-55.

Da Silva, R. P., B. F. Hall, et al. (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages." J Immunol **143**(2): 617-22.

Das, S., A. Freier, et al. (2014)."Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis." Sci Transl Med **6**(234): 234ra56.

de Bruijn, M. H. and D. C. Barker (1992). "Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA." Acta Trop **52**(1): 45-58.

de Carvalho, L. P., M. Soto, et al. (2003). "Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens." Microbes Infect **5**(1): 7-12.

Delgado, G., C. A. Parra-Lopez, et al. (2003). "Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during Leishmania (Viannia) panamensis infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs)." Parasite Immunol **25**(4): 199-209.

Descoteaux, A. and S. J. Turco (1993). "The lipophosphoglycan of Leishmania and macrophage protein kinase C." Parasitol Today **9**(12): 468-71.

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

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-18.

Diez, H., M. C. Lopez, et al. (2006). "Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with Trypanosoma cruzi." Parasite Immunol **28**(3): 101-5.

Diez, H., L. Sarmiento, et al. (2008). "Cellular location of KMP-11 protein in Trypanosoma rangeli." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(1): 93-6.

Diez, H., M. C. Thomas, et al. (2005). "Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite Trypanosoma rangeli." Parasitology **130**(Pt 6): 643-51.

Dumas, C., M. Ouellette, et al. (1997). "Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages." Embo J **16**(10): 2590-8.

El Fadili, K., J. Drummelsmith, et al. (2009). "Down regulation of KMP-11 in Leishmania infantum axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen." Exp Parasitol **123**(1): 51-7.

Esfandiarpour, I. and S. H. Dabiri (2007). "Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histologic study." Int J Dermatol **46**(8): 848-52.

Freedman, D. J. and S. M. Beverley (1993). "Two more independent selectable markers for stable transfection of Leishmania." Mol Biochem Parasitol **62**(1): 37-44.

Frezard, F., C. Demicheli, et al. (2009). "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs." Molecules **14**(7): 2317-36.

Fuertes, M. A., C. Berberich, et al. (1999). "Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from Leishmania infantum." Eur J Biochem **260**(2): 559-67.

Furger, A., N. Schurch, et al. (1997). "Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of Trypanosoma brucei by modulating RNA stability and translation." Mol Cell Biol **17**(8): 4372-80.

GeneDB "www.genedb.org."

Giorgione, J. R., S. J. Turco, et al. (1996). "Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11634-9.

Glaser, T. A., S. F. Moody, et al. (1991). "An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of Leishmania major." Mol Biochem Parasitol **45**(2): 337-44.

Goto, H. and J. A. Lindoso (2004). "Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **37**(4): 615-23.

Graham, S. V. (1995). "Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida." Parasitol Today **11**(6): 217-23.

Grimaldi, G., Jr., J. R. David, et al. (1987). "Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies." Am J Trop Med Hyg **36**(2): 270-87.

Haile, S. and B. Papadopoulou (2007). "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-77.

Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clin Microbiol Rev **14**(2): 229-43.

Handman, E., L. F. Schnur, et al. (1986). "Passive transfer of Leishmania lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages." J Immunol **137**(11): 3608-13.

Hermoso, T., Z. Fishelson, et al. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system." Embo J **10**(13): 4061-7.

Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-9.

Hotz, H. R., C. Hartmann, et al. (1997). "Mechanisms of developmental regulation in Trypanosoma brucei: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation." Nucleic Acids Res **25**(15): 3017-26.

Ilg, T., D. Harbecke, et al. (1993). "The lysosomal gp63-related protein in Leishmania mexicana amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum." FEBS Lett **327**(1): 103-7.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major." Science **309**(5733): 436-42.

Jardim, A., V. Funk, et al. (1995b). "Isolation and structural characterization of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein." Biochem J **305 (Pt 1)**: 307-13.

Jardim, A., S. Hanson, et al. (1995a). "Cloning and structure-function analysis of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11." Biochem J **305 (Pt 1)**: 315-20.

Jardim, A., D. L. Tolson, et al. (1991). "The Leishmania donovani lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex." J Immunol **147**(10): 3538-44.

Jha, T. K., S. Sundar, et al. (1999). "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **341**(24): 1795-800.

Jiang, Y., S. C. Roberts, et al. (1999). "Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of Leishmania donovani." J Biol Chem **274**(6): 3781-8.

Johnson, P. J., J. M. Kooter, et al. (1987). "Inactivation of transcription by UV irradiation of T. brucei provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene." Cell **51**(2): 273-81.

Kaye, P. M., N. J. Rogers, et al. (1994). "Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages." Eur J Immunol **24**(11): 2850-4.

Kohl, L., D. Robinson, et al. (2003). "Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes." Embo J **22**(20): 5336-46.

Kooter, J. M. and P. Borst (1984). "Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes." Nucleic Acids Res **12**(24): 9457-72.

Kreutzer, R. D. and H. A. Christensen (1980). "Characterization of Leishmania spp. by isozyme electrophoresis." Am J Trop Med Hyg **29**(2): 199-208.

Kuhls, K., I. L. Mauricio, et al. (2005). "Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the Leishmania donovani complex." Microbes Infect **7**(11-12): 1224-34.

Lacerda, D. I., L. Cysne-Finkelstein, et al. (2012). "Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with Leishmania amazonensis in murine macrophages." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(2): 238-45.

Laird, P. W., J. C. Zomerdijk, et al. (1987). "In vivo labelling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in Trypanosoma brucei." Embo J **6**(4): 1055-62.

LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, et al. (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania." Genes Dev **7**(6): 996-1007.

Lee, S. A. and R. Hasbun (2003). "Therapy of cutaneous leishmaniasis." Int J Infect Dis **7**(2): 86-93.

Li, Z. and C. C. Wang (2008). "KMP-11, a basal body and flagellar protein, is required for cell division in Trypanosoma brucei." Eukaryot Cell **7**(11): 1941-50.

Liang, X. H., A. Haritan, et al. (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2**(5): 830-40.

Liew, F. Y. and C. A. O'Donnell (1993). "Immunology of leishmaniasis." Adv Parasitol **32**: 161-259.

Lopez-Fuertes, L., E. Perez-Jimenez, et al. (2002). "DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice." Vaccine **21**(3-4): 247-57.

Lumsden, W. H. (1974). "Letter: Biochemical taxonomy of Leishmania." Trans R Soc Trop Med Hyg **68**(1): 74-5.

Lumsden, W. H. (1977). "Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations." Ann Soc Belg Med Trop **57**(4-5): 361-8.

Luyo-Acero, G. E., H. Uezato, et al. (2004). "Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus Leishmania and their phylogeny." Parasitology **128**(Pt 5): 483-91.

Martinez-Calvillo, S., J. C. Vizuet-de-Rueda, et al. (2010). "Gene expression in trypanosomatid parasites." J Biomed Biotechnol **2010**: 525241.

Martinez-Calvillo, S., S. Yan, et al. (2003). "Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-9.

Mauricio, I. L., M. W. Gaunt, et al. (2001). "Genetic typing and phylogeny of the Leishmania donovani complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions." Parasitology **122**(Pt 4): 393-403.

McCall, L. I., W. W. Zhang, et al. (2013). "Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease." PLoS Pathog **9**(1): e1003053.

McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-9.

McGwire, B. S. and A. R. Satoskar (2013). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." Qjm.

McNeely, T. B., G. Rosen, et al. (1989). "Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite Leishmania." Biochem J **259**(2): 601-4.

McNeely, T. B. and S. J. Turco (1990). "Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes." J Immunol **144**(7): 2745-50.

Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, et al. (1994). "Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **62**(3): 837-42.

Mengeling, B. J., D. Zilberstein, et al. (1997). "Biosynthesis of Leishmania lipophosphoglycan: solubilization and partial characterization of the initiating mannosylphosphoryltransferase." Glycobiology **7**(6): 847-53.

Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22**(2): 240-73, Table of Contents.

Momeni, A. Z., M. R. Reiszadae, et al. (2002). "Treatment of cutaneous leishmaniasis with a combination of allopurinol and low-dose meglumine antimoniate." Int J Dermatol **41**(7): 441-3.

Moody, S. F., E. Handman, et al. (1993). "The structure of Leishmania major amastigote lipophosphoglycan." J Biol Chem **268**(25): 18457-66.

Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.

Moreno, M., E. Rincon, et al. (2003). "Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process." Biochem Biophys Res Commun **308**(2): 214-8.

Moreno, S., L. Lopez-Fuertes, et al. (2004). "DNA immunisation with minimalistic expression constructs." Vaccine **22**(13-14): 1709-16.

Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1987). "The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major." Nature **327**(6120): 329-31.

Mougneau, E., F. Altare, et al. (1995). "Expression cloning of a protective Leishmania antigen." Science **268**(5210): 563-6.

Murray, A. S., M. A. Lynn, et al. (2010). "The Leishmania mexicana A600 genes are functionally required for amastigote replication." Mol Biochem Parasitol **172**(2): 80-9.

NCBI- "www.ncbi.nlm.nih.gov/"

Parsons, M., R. G. Nelson, et al. (1984). "Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence." Cell **38**(1): 309-16.

Pimenta, P. F., S. J. Turco, et al. (1992). "Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut." Science **256**(5065): 1812-5.

Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, et al. (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10984-9.

Proudfoot, L., C. A. O'Donnell, et al. (1995). "Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages." Eur J Immunol **25**(3): 745-50.

Proudfoot, N. J. (1989). "How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes." Trends Biochem Sci **14**(3): 105-10.

Puentes, S. M., R. P. Da Silva, et al. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9." J Immunol **145**(12): 4311-6.

Ramirez, J. R., C. Berberich, et al. (1998). "Molecular and antigenic characterization of the Leishmania (Viannia) panamensis kinetoplastid membrane protein-11." Mem Inst Oswaldo Cruz **93**(2): 247-54.

Rioux, J. A., G. Lanotte, et al. (1990). "Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification." Ann Parasitol Hum Comp **65**(3): 111-25.

Roberts, S. C. (2011). "The genetic toolbox for Leishmania parasites." Bioeng Bugs **2**(6): 320-6.

Roberts, S. C., Y. Jiang, et al. (2001). "Genetic analysis of spermidine synthase from Leishmania donovani." Mol Biochem Parasitol **115**(2): 217-26.

Rosenthal, L. A., F. S. Sutterwala, et al. (1996). "Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion." Infect Immun **64**(6): 2206-15.

Sacks, D. and A. Sher (2002). "Evasion of innate immunity by parasitic protozoa." Nat Immunol **3**(11): 1041-7.

Sacks, D. L., E. M. Saraiva, et al. (1994). "The role of the lipophosphoglycan of Leishmania in vector competence." Parasitology **108 Suppl**: S55-62.

Saha, B., G. Das, et al. (1995). "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 **25**(9): 2492-8.

Sangraula, H., K. K. Sharma, et al. (2003). "Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine." J Assoc Physicians India **51**: 686-90.

Santos, D. M., M. W. Carneiro, et al. (2012). "PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of Leishmania." Nanomedicine **9**(7): 985-95.

Schönian, G., M. El Fari, et al. (2001). "Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 61-3.

Schönian, G., I. Mauricio, et al. (2010). "Is it time to revise the nomenclature of Leishmania?" Trends Parasitol **26**(10): 466-9.

Schönian, G., C. Schweynoch, et al. (1996). "Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus Leishmania using single primers in the polymerase chain reaction." Mol Biochem Parasitol **77**(1): 19-29.

Seay, M. B., P. L. Heard, et al. (1996). "Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of Leishmania mexicana amazonensis promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes." Infect Immun **64**(12): 5129-37.

S**ingh, S.** (2006). "New developments in diagnosis of leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 311-30.

Soto, J., B. A. Arana, et al. (2004). "Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis." Clin Infect Dis **38**(9): 1266-72.

Soto, J., J. Rea, et al. (2009). "Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia." Am J Trop Med Hyg **81**(3): 387-9.

Spanakos, G., E. T. Piperaki, et al. (2008). "Detection and species identification of Old World Leishmania in clinical samples using a PCR-based method." Trans R Soc Trop Med Hyg **102**(1): 46-53.

Stebeck, C. E., G. S. Baron, et al. (1996). "Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 from African trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **81**(1): 81-8.

Stebeck, C. E., R. P. Beecroft, et al. (1995). "Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites." Mol Biochem Parasitol **71**(1): 1-13.

Sundar, S. (2001a). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." Trop Med Int Health **6**(11): 849-54.

Sundar, S., K. Pai, et al. (2001b). "Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India." Am J Trop Med Hyg **65**(3): 193-6.

Sundar, S. and M. Rai (2002). "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis." Clin Diagn Lab Immunol **9**(5): 951-8.

Thakur, C. P., J. P. Dedet, et al. (2001). "Leishmania species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(2): 187-9.

Thomas, G.-P. J., Alonso C, López MC. (2000). "Molecular characterization of KMP11 from Trypanosoma cruzi: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level." DNA Cell Biol. **19**(1): 47-57.

Thomas, M. C., M. V. Longobardo, et al. (2001). "Mapping of the antigenic determinants of the T. cruzi kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera." Clin Exp Immunol **123**(3): 465-71.

Tolson, D. L., A. Jardim, et al. (1994). "The kinetoplastid membrane protein 11 of Leishmania donovani and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation." Infect Immun **62**(11): 4893-9.

Trujillo, C., R. Ramirez, et al. (1999). "The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes." Immunol Lett **70**(3): 203-9.

Tschudi, C. and E. Ullu (1988). "Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes." Embo J **7**(2): 455-63.

Turco, S. J. and A. Descoteaux (1992). "The lipophosphoglycan of Leishmania parasites." Annu Rev Microbiol **46**: 65-94.

Uliana, S. R., M. H. Affonso, et al. (1991). "Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence." Exp Parasitol **72**(2): 157-63.

Ullu, E., K. R. Matthews, et al. (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." Mol Cell Biol **13**(1): 720-5.

Vaughan, S., L. Kohl, et al. (2008). "A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in Trypanosoma brucei." Protist **159**(1): 127-36.

Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, et al. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." Nat Rev Immunol **8**(8): 607-18.

Webb, J. R., A. Campos-Neto, et al. (1998). "Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family." Infect Immun **66**(7): 3279-89.

WHO (2010). "Control of Leishmaniasis." 1-186.

Wortmann, G., C. Sweeney, et al. (2001). "Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 583-7.

Wright, S. D. and S. C. Silverstein (1983). "Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes." J Exp Med **158**(6): 2016-23.

Zijlstra, E. E., A. M. Musa, et al. (2003). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis." Lancet Infect Dis **3**(2): 87-98.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Erscheinungsformen von *Leishmania*

Abb.1.2 Taxonomie von *Leishmania*

Abb.1.3 Lebenszyklus *Leishmania*

Abb.1.4 Vergleich der Genregulation in höheren Eukaryoten und in Kinetoplastiden

Abb.1.5 Verschiedene Formen des Kmp-11 Proteins in *L.infantum*

Abb.2.1 Optischer Aufbau eines FACS Calibur Durchflusszytometers

Abb.2.2 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Generationszeit von *Leishmania*

Abb.3.1 *Kmp-11* Locus von *L.major* und *L.infantum*

Abb.3.2 Oligonukleotidbindestellen für die Amplifizierung der *Kmp-11 A-C* Sequenz

Abb.3.3 Kmp-11 A-C Amplikons aus genomischer DNA von Leishmanien

Abb.3.4 Sequenzvergleich Kmp-11A

Abb.3.5 Sequenzvergleich Kmp-11B

Abb.3.6 Sequenzvergleich Kmp-11C

Abb.3.7 Identifizierung *Kmp-11-YPSK/Kmp-11-NMCK* in verschiedenen *Leishmania* Arten

Abb.3.8 Kmp-11-YFP Fusionskonstrukt

Abb.3.9 Kmp-11-YPSK/ -NMCK Überexpression in *L.donovani*

Abb.3.10 Subzelluläre Lokalisation von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK in *L.donovani*

Abb.3.11 Überexpression von Kmp-11-NMCK in *L.major*

Abb.3.12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von THP-1 Zellen infiziert mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$

Abb.3.13 Infektion von THP-1 Zellen mit L.d.$_{YPSK-YFP}$ und L.d.$_{NMCK-YFP}$

Abb.3.14 Western Blot-Analyse zur Detektion infizierter THP-1 Zellen nach verschiedenen Infektionszeiten

Abb.3.15 Infektion von THP-1 Zellen mit L.m$_{YFP}$ und L.m.$_{NMCK-YFP}$

Abb.3.16 Infektion von THP-1 Zellen mit L.m$_{YFP}$ und L.m.$_{YPSK-YFP}$

Abb.3.17 HLA-Klasse I Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter THP-1 Zellen

Abb.3.18 HLA-Klasse I Expression von THP-1 Zellen nach *Leishmania* Infektion

Abb.3.19 HLA-Klasse II Expression von THP-1 Zellen nach *Leishmania* Infektion

Abb.3.20 Schematische Übersicht der Konstrukte zur Herstellung von *L.infantum* Kmp-11$^{-/-}$

Abb.3.21 Integration der K.o.-Vektoren

Abb.3.22 Kmp-11 PCR- und Western Blot-Analyse von L.inf Kmp-11$^{-/-}$

Abb.3.23 Mikroskopische Analyse von L.inf. Kmp-11^{low}

Abb.3.24 Infektion von THP-1 Zellen mit L.inf. und L.inf.Kmp-11^{low}

Abb.3.25 Analyse der Generationszeiten

Abb.3.26 Klonierungsstrategie Expression von Kmp-11-YPSK in *E.coli*

Abb.3.27 Rekombinante HIS-NMCK und HIS-YPSK nach Expression in *E.coli*

Abb.3.28 Untersuchung einer möglichen Dimerisierung des Kmp-11-NMCK Proteins

Abb.3.29 Vergleich von Kmp-11-YPSK und Kmp-11-NMCK *in vitro* und *in vivo*

Abb.A1 Vektorkarte pQE30-YPSK

Abb.A2 Vektorkarte pLEXSY-YPSK-YFP

Abb.A3 Vektorkarte pBS-L3-YFP-hyg-L4

Abb.A4 Vektorkarte pBS-L3-Cherry-neo-L4

7 Anhang

Vektorkarten

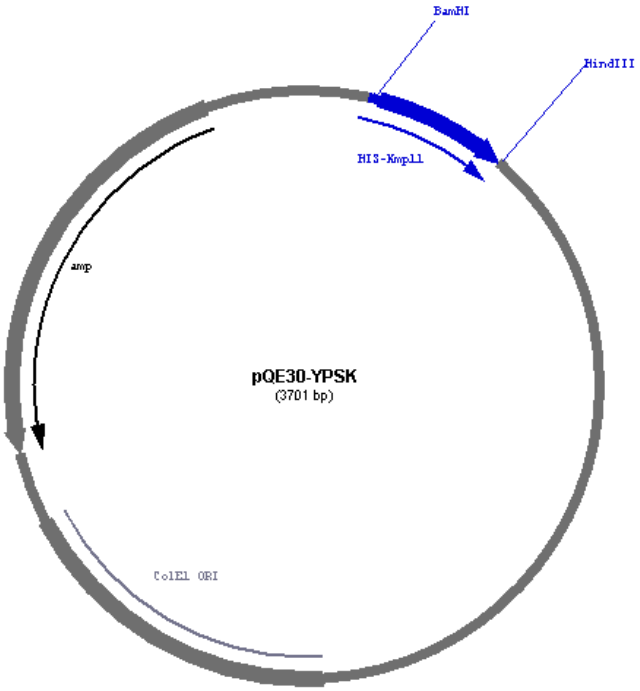

Abb.A1 Vektorkarte pQE30-YPSK Expressionsvektor für Überexpression von HIS-Kmp-11 in *E.coli*

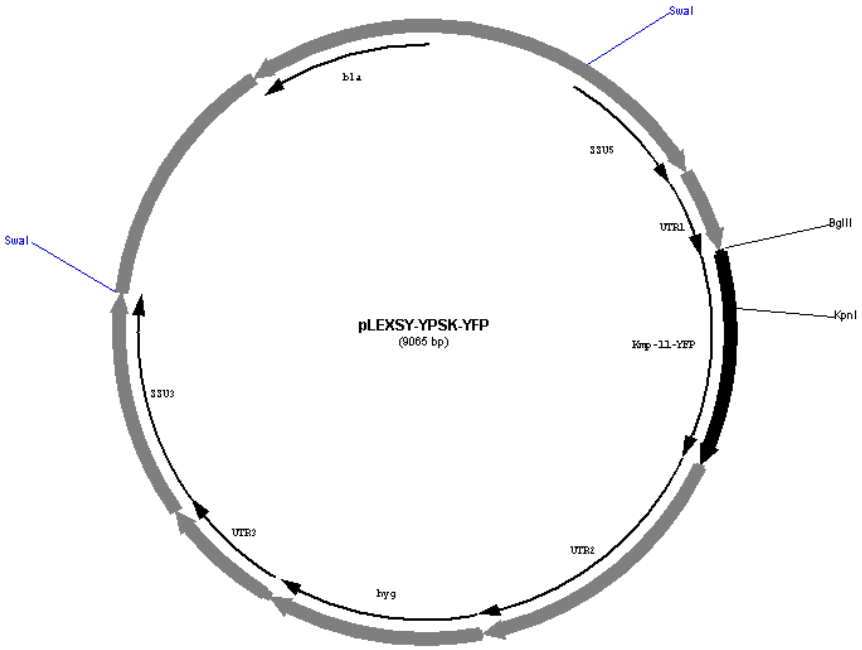

Abb.A2 Vektorkarte pLEXSY-YPSK-YFP Expressionsvektor für Überexpression von Kmp-11-YPSK-(NMCK) YFP in *Leishmania*.

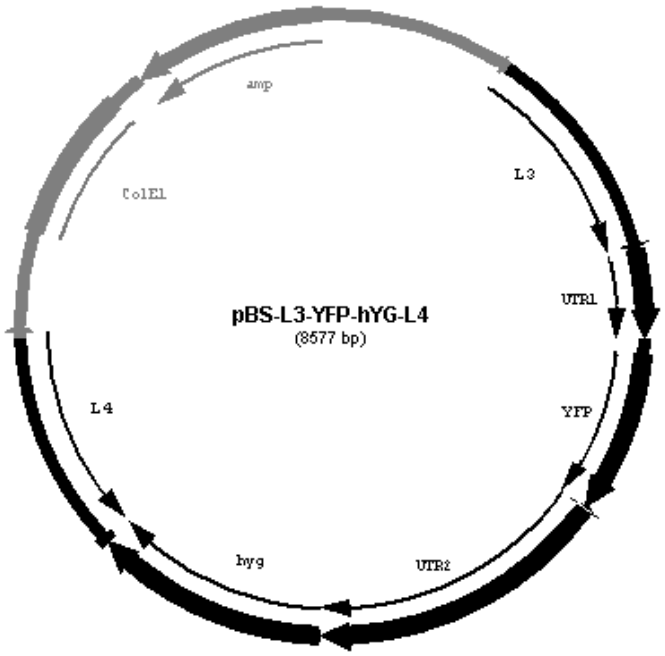

Abb.A3 Vektorkarte pBS-L3-YFP-hyg-L4 1.K.o.-Vektor , L3, Kmp-11 5'UTR, L4, Kmp-11 3'UTR

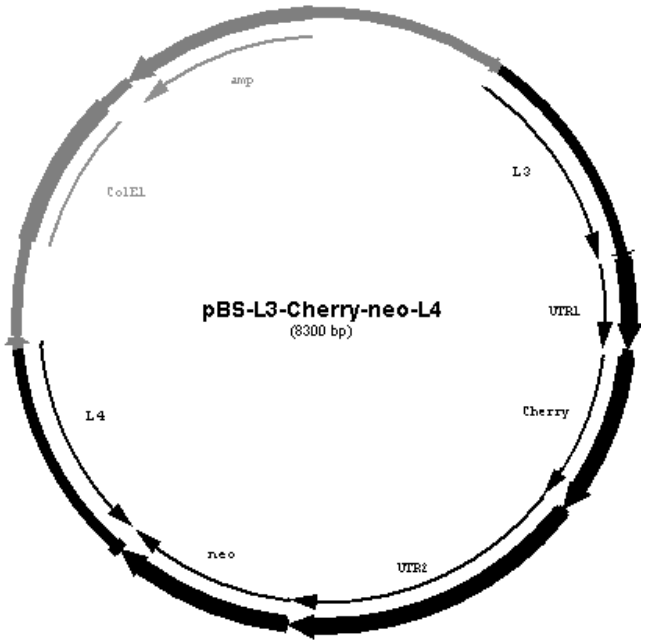

Abb.A4 Vektorkarte pBS-L3-Cherry-neo-L4 2.K.o.-Vektor , L3, Kmp-11 5'UTR, L4, Kmp-11 3'UTR

8 Publikationen

Modular multi-antigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis
Das S, Freier A, Boussoffara T, Das S, Oswald D, Losch FO, Selka M, Sacerdoti-Sierra N, Schönian G, Wiesmüller KH, Seifert K, Schroff M, Juhls C, Jaffe CL, Roy S, Das P, Louzir H, Croft SL, Modabber F, Walden P.
Sci Transl Med. 2014 Apr 30;6(234):234ra56

Identification and characterization of Kmp-11-NMCK and Kmp-11-YPSK in Leishmania
Selka M, Losch FO, Walden P.
[Manuskript in Vorbereitung]

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Melanie Selka, geboren am 07.02.1981 in Altdöbern, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung verschiedener Formen des Leishmania Kmp-11 Proteins

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche ausgewiesen habe.

Ich versichere zudem, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Berlin, 2014

Melanie Selka

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Walden bedanken für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Betreuung und die vielen Ratschläge, die wesentlich bei der Ausarbeitung dieser Dissertation mitgewirkt haben.

Bei Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank geht an Dr. Florian Losch für die vielen Tipps und Tricks der Molekularbiologie, fürs unermüdliche Korrekturlesen und die stetige Motivation.

Bei meinen Arbeitskollegen und -kolleginnen Rebecca Hugel, Ulrike Fritz, Dr. Arlina Wiguna und Dr. Renato Baleeiro bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme und immer freundliche Arbeitsatmosphäre. Nicht vergessen dabei möchte ich meine Eberle Mädels Dr. Anja Berger und Dr. Annika Quast. Ein spezieller Dank geht an Dr. Saulius Jarmalavicius für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und für das eine oder andere Kaffeepäuschen. Bei Arthur O'Connor bedanke ich mich neben den unverwechselbaren Brownies für die Hilfe bei den zweidimensionalen Gelelektrophorese-Experimenten.

Ein ganz besonderes Dankeschön für die permanente seelische und moralische Unterstützung an Susanne Marek und Anja Freier und natürlich klein Lenny Freier, der mir stets ein Lächeln ins Gesicht zaubert.

Zu guter Letzt geht mein größter Dank an meine Familie und Freunde, in erster Linie an meine Eltern, meine Großeltern und Jürgen, dafür das ihr mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir Mut zugesprochen habt und mich immer zum Weitermachen motiviert habt.