

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
Biologie, Chemie und Geowissenschaften
im Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Michael Heimann

Diplom-Biologe

**Biochemisches Institut
der Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

Gießen, Juni 2008

Entwicklung eines ELISA zur Diagnose von viszeraler Leishmaniose

Betreuer:

Prof. Dr. Gottfried Wagner

Institut für Allgemeine Botanik
und Pflanzenphysiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Giessen

Prof. Dr. Ewald Beck

Institut für Biochemie
Fachbereich Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen

ZUSAMMENFASSUNG

Leishmaniosen sind in 88 Ländern der Welt -vor allem in Entwicklungsländern- verbreitet und fordern jährlich bis zu 59.000 Tote. Diese Krankheiten werden von Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen, die durch Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia* übertragen werden. Leishmaniosen zeigen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirtes und der sie auslösenden Spezies sehr unterschiedliche klinische Manifestationen. Die gefährlichste dieser Krankheiten ist die viszerale Leishmaniose, die unbehandelt in über 90% der Fälle zum Tode führt. Eine ähnliche Symptomatik wie bei kutaner Leishmaniose und verschiedenen anderen Erkrankungen erschwert die Diagnose dieser Krankheit. Darüber hinaus haben die verfügbaren Medikamente gegen viszerale Leishmaniose stark toxische Nebenwirkungen.

Verfügbare diagnostische Tests sind unzureichend und meist teuer. Die erschwinglichen Tests sind nicht sensitiv genug, um eine sichere Diagnose zu erstellen, da meistens Rohextrakte promastigoter Leishmanien benutzt werden, die Kreuzreaktionen mit kutaner Leishmaniose zeigen. Der beste Test ist ein ELISA auf der Grundlage des rekombinanten Antigens K39, der jedoch Mängel in der Reproduzierbarkeit in verschiedenen Endemiegebieten aufweist.

Um eine Verbesserung der bisher verfügbaren ELISA-Tests zu erreichen, wurden Antigene gesucht, die sich tandemartig wiederholende Aminosäuresequenzen aufweisen, welche auf eine gute Immunreaktivität hinweisen.

Mit Hilfe im Internet verfügbarer Datenbanken und Programme wurden potentielle Antigene zur Diagnose von viszeraler Leishmaniose auffindig gemacht, kloniert, mit dem rekombinanten Antigen K39 fusioniert und im ELISA getestet. Das daraus entstandene Antigen AK2708 besteht aus einer Fusion von vier verschiedenen Antigenen, ist kostengünstig herzustellen und unterscheidet im ELISA kutane und viszerale Leishmanioseseren aus verschiedenen Endemiegebieten besser als ein Rohextrakt aus promastigoten Leishmanien.

SUMMARY

Leishmaniases are considered to be endemic in 88 countries, most of them developing countries, causing 59.000 deaths per year. These diseases are caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*. Humans are infected via the bite of phlebotomine and *Lutzomyia* sandflies. Depending on the causative agent and the immune status of the host the disease shows different clinical manifestations. Visceral Leishmaniasis is the most dangerous form, which is fatal if untreated in over 90% of all cases.

The symptoms at the beginning of visceral leishmaniasis show similarities to those of cutaneous leishmaniasis and other diseases. All currently available drugs have serious drawbacks.

Simple diagnostic tests have recently been developed which are practical and inexpensive but lack sensitivity because they use crude extract of promastigote *Leishmania*. Better tests based on recombinant antigens are very expensive. Only the recombinant K39 antigen shows a good performance in ELISA in general, which is unfortunately not reproducible in different foci of visceral leishmaniasis.

To improve existing diagnostic ELISA-tests, new antigens were searched with tandem repeated amino acid sequences which are supposed to be immunodominant. Some antigens were found by the help of gene-databases and computerprogramms freely available in the internet. These were cloned and fused with K39 resulting in a protein which consist of four fused different antigens (AK2708). This antigen performs well in ELISA with visceral leishmaniasis sera and distinguishes better between cutaneous and visceral leishmaniasis from different endemic regions than a crude extract from promastigote *Leishmania*.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
INHALT	III
ABBILDUNGEN.....	V
TABELLEN.....	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Leishmaniose.....	2
1.1.1 Die Gattung <i>Leishmania</i>	2
1.1.2 Lebenszyklus.....	3
1.1.3 Infektion und Entwicklung in der Sandmücke	4
1.1.4 Übertragung und Entwicklung im Vertebratenwirt.....	6
1.1.5 Aufnahme des Parasiten durch Makrophagen des Vertebratenwirtes.....	8
1.1.6 Entwicklung des Parasiten innerhalb des Makrophagen	9
1.1.7 Beeinflussung des Immunsystems durch den Parasiten	12
1.1.8 Die verschiedenen Ausprägungen der Leishmaniose	14
1.1.9 Epidemiologie	17
1.1.10 Übertragungswege für Leishmaniose	18
1.1.11 Risiken einer Infektion und Prophylaxe	18
1.1.12 Diagnose von Leishmaniose.....	19
1.1.13 Behandlung von Leishmaniose.....	23
1.2 Aufgabenstellung	24
2. MATERIAL UND METHODE	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Chemikalien.....	28
2.1.3 Enzyme	30
2.1.4 Puffer und Lösungen	31
2.1.4 Bakterienstämme.....	36
2.1.5 <i>Leishmania</i> DNA und Rohextrakt	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Zellaufschluss.....	37
2.2.2 DNA-Extraktionen.....	37

2.2.3 Expression und Reinigung der Taq Polymerase.....	39
2.2.4 Klonierung	41
2.2.5 ELISA	43
2.2.6 PCR-Reaktion.....	44
2.2.7 Gelelektrophorese	45
2.2.8 Patientenseren	47
3. ERGEBNISSE.....	48
3.1. Auswahl von Antigenen.....	48
3.2 Klonierung von potentiellen Antigenen für ELISA	50
3.2.1 Oligonukleotid-Assembly	51
3.2.2 PNK-Methode	52
3.2.3 Synthetische Antigene.....	53
3.2.4 Konstruktionen.....	55
3.2.5 Beispiel einer Gen-Synthese anhand von Linf27	57
3.2.6 ELISA zur Überprüfung der Reaktivität der einzelnen Konstruktionen	61
3.3 Fusion von Proteinen	63
3.3.1 Beispiel einer Fusion	65
3.3.2 Optimierung von Proteinen durch Fusion	69
3.4 Das Antigen AK2708.....	70
3.4.1 PCR mit unklaren Seren aus dem Jemen	73
3.4.2 Reaktion von AK2708 mit mediterraner viszeraler Leishmaniose.....	76
3.4.3 Kreuzreaktion mit <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas) und kutaner Leishmaniose aus Panama (<i>L. panamensis</i>).....	77
4. DISKUSSION	80
4.1 Auswahl und Klonierung potentieller Antigene.....	81
4.2 Antigene.....	84
4.3 Antigen-Fusionen	85
4.4 Diagnose mit AK2708 ELISA	86
4.5 Fazit.....	88
5. LITERATUR	90

ABBILDUNGEN

Abbildung 1. Trypansomatiden-Formen	3
Abbildung 2. fPPG-Pfropfen im Mitteldarm einer Sandmücke.	6
Abbildung 3. Phagocytose	9
Abbildung 4. Lebenszyklus von <i>Leishmania</i>	12
Abbildung 5. Beeinflussung der Immunantwort des Vertebratenwirtes	13
Abbildung 6. Leishmaniosen.....	15
Abbildung 7. Kutane und viszerale Leishmaniose.....	16
Abbildung 8. Verbreitung von Leishmaniose	17
Abbildung 9. pQE30-Vektorplasmid.	42
Abbildung 10. Aminosäuresequenz von Linf27	49
Abbildung 11. Codon-Tabelle von <i>E. coli</i>	51
Abbildung 12. Schematische Darstellung verschiedener Synthesewege einer Nukleotidsequenz	52
Abbildung 13. Globale Verteilung der <i>Leishmania</i> -Arten und deren Varianten.....	55
Abbildung 14. Reaktivität einzelner Antigene im ELISA.....	62
Abbildung 15. Schematische Darstellung einer Fusion.....	64
Abbildung 16. Adaptersequenzen.....	65
Abbildung 17. ELISA zur Reaktivität der Antigene A2 und K39	69
Abbildung 18. ELISA mit AK2708	71
Abbildung 19. Vergleich eines Rohextrakts mit AK2708 im ELISA (viszeraler Leishmaniose).....	72
Abbildung 20. Vergleich eines Rohextrakts mit AK2708 im ELISA (kutane Leishmaniose)	73
Abbildung 21. Primersequenzen für eine "nested"-PCR	74
Abbildung 22. Vergleich eines Rohextrakts mit AK2708 im ELISA (spanische Seren).....	77
Abbildung 23. Vergleich eines Rohextrakts mit Ak2708 im ELISA (panamaische Seren und Chagas-Krankheit)	78

TABELLEN

Tabelle 1. Verschiedene Formen der Leishmaniose	14
Tabelle 2. Methoden zur Diagnose von Leishmaniosen.....	22
Tabelle 3. Medikamente zur Behandlung von Leishmaniose und ihre Nebenwirkungen.....	24
Tabelle 4. Restriktionsenzyme.....	30
Tabelle 5. Andere Enzyme.....	30
Tabelle 6. Aufstellung aller potentiellen Antigene.....	54
Tabelle 7. Aufstellung der zur Klonierung geeigneten potentiellen Antigene	56

1. EINLEITUNG

Die Menschen in Entwicklungsländern haben die niedrigste Lebenserwartung und die höchsten Werte für verlorene Lebensjahre (Disability adjusted life years: DALY's), hauptsächlich als Folge verschiedener Infektionskrankheiten. Täglich sterben Menschen in diesen Ländern an Krankheiten, die in den Industrienationen nahezu verschwunden sind. Grundlage für die Beseitigung dieser Umstände bei uns ist ein funktionierendes Gesundheitssystem. In Entwicklungsländern fehlen meistens die finanziellen Mittel, um eine grundlegende staatliche Gesundheitsversorgung sicher zu stellen. Die Entwicklungshilfe der Industrienationen beschränkt sich häufig auf die Versorgung mit Medikamenten oder Diagnostika, aber nicht mit dem Aufbau eines funktionierenden Gesundheitssystems. Die medizinische Versorgung der Bevölkerung in diesen Ländern liegt oftmals in privater Hand. Dies bedeutet eine hohe finanzielle Belastung der Bevölkerung für Untersuchungen und Behandlung. Während Medikamente zu erschwinglichen Preisen bezogen werden können, sind kommerzielle diagnostische Verfahren sehr teuer. Kostensenkend können hier Diagnostika wirken, die im Land selbst hergestellt werden. Diese können aber nur dann zu günstigen Preisen abgegeben werden, wenn sie kostengünstig hergestellt werden können.

Laut dem „10/90 Report On Health Research 2000“ [Global Forum for Health Research, Genf 2000] werden weltweit 90% der Forschungsmittel im Gesundheitssektor für Belange ausgegeben, die nur 10% der Weltbevölkerung betreffen. Daraufhin wurden die „Top 10 der Biotechnologie zur Verbesserung der Gesundheitslage in Entwicklungsländern“ [Daar et al. 2002] aufgelistet, an deren Spitze der Punkt „Modifizierte molekulare Technologien für günstige, einfache Diagnose von Infektionskrankheiten“ steht. Das 90/10 Verhältnis zeigt den Handlungsbedarf in Entwicklungsländern, während die Top 10 Liste die erfolgversprechendste Technik bestimmt, mit der eine Verbesserung der Gesundheitslage in Entwicklungsländern erreicht werden kann.

Es gab von Seiten der G8 und der WHO in den letzten fünf Jahren verstärkte Bemühungen, die „Großen Drei“ (HIV/AIDS, Tuberkulose und Malaria, zusammen etwa 5,6 Millionen Tote und 166 Millionen DALY's) mit großem Aufwand und finanziellen Mitteln zu bekämpfen. Daneben steht jedoch die sogenannte Gruppe der „neglected tropical diseases“ (vernachlässigte tropische Krankheiten), die besonders

die Bevölkerung von Entwicklungsländern betreffen und für deren Bekämpfung bis jetzt nur wenig finanzielle Mittel zur Verfügung stehen.

Unter den vernachlässigten tropischen Krankheiten ist die Leishmaniose, besonders die viszerale Form, eine der Gefährlichsten. Sie führt unbehandelt in über 90 % der Fälle zum Tode. Mit klinischen Symptomen, die auch bei anderen verbreiteten Krankheiten auftreten, ist die Diagnose von viszeraler Leishmaniose schwierig. Oft erfolgt eine Co- Infektion mit Malaria oder anderen parasitären Erkrankungen, aber auch mit AIDS/HIV. Die meisten Infektionen mit viszeraler Leishmaniose treten in Ländern der Welt auf, in denen ein geregeltes Gesundheitssystem nicht oder nur unzureichend etabliert ist.

1.1 LEISHMANIOSE

Die mit dem Begriff Leishmaniose bezeichnete Gruppe von Krankheiten wird von intrazellulären Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen. Leishmaniosen zeigen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirtes und der sie auslösenden Spezies sehr unterschiedliche klinische Manifestationen.

1.1.1 DIE GATTUNG LEISHMANIA

Bei der Gattung *Leishmania* handelt es sich um Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida, die während ihres biphasischen Lebenszyklusses promastigot, extrazellulär im Insektenwirt oder amastigot, intrazellulär im Säugetierwirt vorkommen. Die promastigote Form ist eher länglich und etwa 12 - 25 µm lang, die amastigote Form eher rundlich und etwa 2 – 5 µm im Durchmesser [Mellenthin K. 2003; Vanier-Santos M.A. et al. 2002]. Die Ordnung Kinetoplastida entstammt einer der stammesgeschichtlich ältesten Linien der Eukaryoten und ihre Vertreter besitzen als erste Mitochondrien. Ihre mitochondriale DNA ist in Form eines Kinetoplasten organisiert, welcher aus einigen Dutzend großer (Maxicircle) und einigen tausend kleiner (Minicircle) ringförmiger DNA-Moleküle besteht. Diese ringförmigen DNA-Moleküle sind so ineinander verschlungen, dass im mikroskopischen Bild ein optisch dichter Fleck zu sehen ist, der Kinetoplast [Englund et al. 1996].



Abbildung 1. Links: Trypanosomatiden-Formen. **1)** Kinetoplast; **2)** Basalkorn; **3)** undulierende Membran mit Geißel; **4)** freie Geißel; **5)** Kern; **6)** zytoplasm. Granula; **7)** Geißelrest. Erscheinungsformen sind **a)** trypomastigote oder Trypanosomen-Form; **b)** epimastigote oder Crithidia-Form; **c)** promastigote oder Leptomonas-Form (nur bei Leishmanien); **d)** amastigote oder Leishmania-Form. (aus Urban & Fischer 2003 – Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl.) Mitte: promastigote Form von *Leishmania tropica*. Rechts: amastigote Form von *Leishmania tropica* (Quelle:<http://www.istanbulsaglik.gov.tr>)

Die Gattung *Leishmania* wird nach dem Aufenthaltsort im Mitteldarm des Insektenwirtes in die Untergattungen *Leishmania* und *Viannia* unterteilt. Innerhalb dieser Untergattungen sind die verschiedenen Spezies in Komplexen zusammengefasst. Die Klassifikation der Spezies basiert im Wesentlichen auf klinischen, geografischen oder biologischen Charakteristika. Durch molekularbiologische Methoden, die auf den teilweise vollständigen Sequenzinformation basieren, sind mittlerweile 30 Spezies identifiziert [Bañuls et al. 2007]. Eine klassische Unterscheidung ist die in Altwelt- und Neuweltleishmanien, welche auf die geografische Verbreitung verschiedener Leishmanienarten in Nord-, Mittel- und Südamerika bzw. Asien, Afrika und Europa Bezug nimmt. Auch die Vektororganismen unterscheiden sich in der Alten und Neuen Welt (s.u.). Die mukokutane Form der Leishmaniose kommt -soweit bekannt- nur in der Neuen Welt vor.

1.1.2 LEBENSZYKLUS

Der biphasische Lebenszyklus von *Leishmania* nimmt seinen Anfang bei der Aufnahme von durch *Leishmania* befallenen Makrophagen aus dem Blut eines Vertebratenwirtes durch Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* bzw. *Lytzomyia*.

Die Phlebotomusarten kommen in der Alten Welt (Asien, Europa, Afrika) vor, die Lutzomyiaarten in der Neuen Welt (Nord-, -Mittel und Südamerika). Diese Mücken sind relativ klein (2mm), fliegen nachts oder in der Dämmerung und sind meistens in der Nähe ihrer Brutplätze anzutreffen. Adulte männliche Sandmücken ernähren sich von Pflanzensäften und Blattlausexkrementen, nur die weiblichen Tiere benötigen eine Blutmahlzeit für die Eientwicklung. Nach Ablage des Geleges entwickeln sich die Larven der Sandmücken über vier Larvenstadien innerhalb von 50 Tagen. In gemäßigten Klimazonen überwintern sie im 4. Larvenstadium und bringen so nur zwei Generationen pro Jahr hervor [Mellenthin K. 2003; <http://www.parasitus.com>]. Aufgrund der speziellen Anforderungen der Sandmückenlarven, aber auch der adulten Sandmücken bezüglich der Temperaturtoleranz und der Notwendigkeit einer ständigen Bodenfeuchte während der Larvalentwicklung, sind die Brutplätze und somit auch das Verbreitungsgebiet limitiert. Man nimmt eine mittlere Temperaturuntergrenze von 10 -15 °C an, welche das Verbreitungsgebiet in Europa auf die südlichen Teile beschränkt [Simsek F.M. et al. 2007; Rotureau P. et al. 2006; Freire de Melo Ximes M. et al. 1999; Johnson R.N. et al. 1999; Aytekin A.M. et al. 2007; Belen A. et al. 2005]. Eine Verschiebung des europäischen Verbreitungsgebietes nach Norden durch Klimaeffekte ist in Zukunft nicht auszuschließen [Sutherst R.W. 2004; Cross R.E. 1996]. Da die Verbreitung von Leishmania und somit auch der Leishmaniose entscheidend von der Verbreitung des Vektors abhängt, ist auch mit vermehrten Fällen von Leishmaniose in Mittel- und Nordeuropa zu rechnen.

1.1.3 INFEKTION UND ENTWICKLUNG IN DER SANDMÜCKE

Die Sandmücken verursachen mit ihren Mundwerkzeugen eine Wunde in der Haut des Vertebraten, in der sich kapillares Blut und auch infizierte Makrophagen sammeln, die von der Sandmücke aufgenommen werden und so in den Mitteldarm des Insekts gelangen. Während des Verdauungsprozesses im posterioren Teil des Mitteldarms der Sandmücken werden die amastigoten Leishmanien aus den Makrophagen freigesetzt und differenzieren, stimuliert durch die Veränderung des sie umgebenden Milieus, zu prozyklischen, sich teilenden Promastigoten. Diese wiederum differenzieren nach ein paar Tagen zu nectomonaden Promastigoten, die

zum anterioren Teil des Mitteldarms wandern und nach Auflösung der die Blutmahlzeit umschließenden peritrophen Matrix an die Mikrovilli des Mitteldarmepithels in der Nähe des Übergangs zum Vorderdarm (Cardia) binden [Bates P. 2007; Alexander J. et al. 1999; Rogers M. E. et al. 2002; Rodrigo P.P. et al. 2002]. Die Differenzierung in die prozyklische promastigote Form geht mit der Ausbildung einer Glykokalyx einher, die hauptsächlich aus Lipophosphoglycan (LPG) besteht und der vermehrten Expression einer Zn-abhängigen Metalloprotease (gp63) [Yao C. et al, 2007]. Diese Hülle und die Metalloprotease schützen die Promastigoten vor den Verdauungsenzymen des Insektenmitteldarms, wobei das LPG über die Bindung an β -Galaktose-bindende Lektine im Mitteldarmepithel auch die Anheftung des Parasiten ermöglicht.

Das LPG auf der Oberfläche der prozyklischen Parasiten besteht aus einem GPI (Glycosylphosphatidylinositol) Ankerprotein, repetitiven Phosphosaccharidelementen und einer Phosphosaccharidkappe. Die LPGs verschiedener Leishmaniaarten unterscheiden sich im Verzweigungsgrad, in der Anzahl der repetitiven Phosphosaccharide oder in der Struktur der Phosphosaccharidkappe, was die unterschiedliche Fähigkeit der Bindung an das Mitteldarmepithel erklärt und mit der Vektorspezifität mancher Leishmania-Arten korreliert [Descoteaux A. et al. 1999; Olivier M. et al. 2005; Ilg T. 2000; Ferguson A. J. 1997; Besteiroa S. et al. 2007; McConville M.J. et al. 2002; Pimenta P.F. et al. 1999; McConville M.J. et al. 1995].

Gebunden an das Mitteldarmepithel des Insektenvektors differenzieren sich die Parasiten zu leptomonaden Promastigoten und beginnen sich durch Teilung zu vermehren. Die leptomonade Form ist auch zuständig für die Sekretion des PSG (promastigote secretory gel) über die Flagellartasche, was eine wesentliche Rolle bei der Übertragung auf den Vertebratenwirt spielt. Das PSG besteht im Wesentlichen aus filamentösem Phosphoglycan (fPPG), das sich zu einem länglichen Pfropfen anordnet und sich vom anterioren Teil des Mitteldarms durch die Cardia in den Vorderdarm erstreckt. Eine Dehnung und Blockade des anterioren Teils des Mitteldarms ist die Folge, die noch von zu Haptomonaden differenzierten Parasiten unterstützt wird, die sich an der Cardia anheften [Bates P. , 2007; Rogers M. E. et al, 2002]. Diese Form des Leishmaniaparasiten heftet sich unspezifisch über ihr Flagellum an die Epithelien der Cardia, indem die Spitze ihres Flagellums eine hemidesmosome Form annimmt. Die Fähigkeit dieser alternativen Bindung und ihre

Stärke variieren innerhalb der Leishmania-Arten und Isolaten und scheint nicht ligandenvermittelt zu sein [Wakid H. et al. 2004].

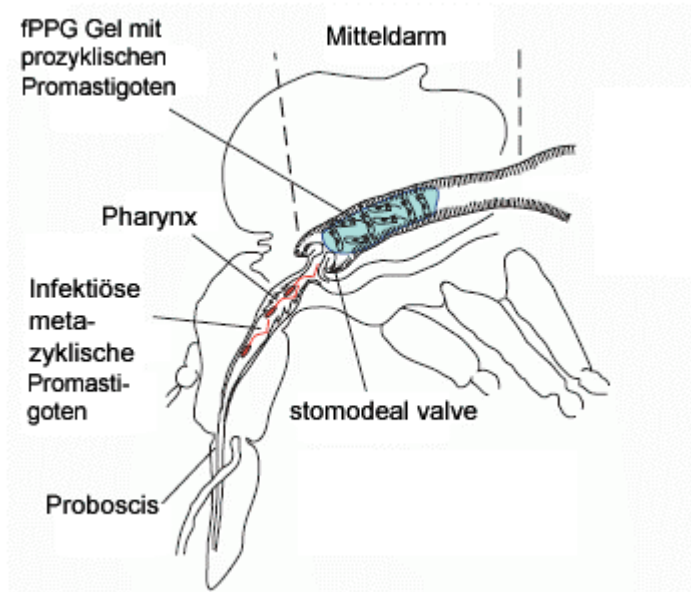


Abbildung 2. fPPG-Pfropfen im Mitteldarm einer Sandmücke (stomodeal valve = Cardiaregion) (Quelle: Ilg 2000).

Die Funktion der haptomonaden Form liegt wahrscheinlich darin einen Ausgangspunkt für die Generierung des PSG zu bilden. Sie verursacht zudem durch eine von ihr sekretierte Chitinase eine Schädigung der Cardiaregion, die den Vorderdarm vom Mitteldarm trennt und einen Rückfluß des Darminhaltes verhindern soll. In das PSG eingebettet sind prozyklische Promastigoten. Im vorderen Bereich des länglichen PSG-Pfropfens konzentrieren sich aus leptomonaden Parasiten differenzierte metazyklische Promastigoten, welche die infektiöse Form für Vertebraten darstellen.

1.1.4 ÜBERTRAGUNG UND ENTWICKLUNG IM VERTEBRATENWIRT

Für den Übertragungsmechanismus in die durch die Mundwerkzeuge der Sandmücke verursachte Wunde in der Epidermis des Vertebratenwirtes wird eine Regurgitation angenommen [Rogers M.E. et al. 2004]. Ausgelöst durch die Blockade des vorderen Teils des Mitteldarms durch den PSG-Pfropf wird dieser mit den infektiösen metazyklischen Promastigoten und dem Speichel der Sandmücke

während der Blutmahlzeit durch einen Reflux in die Wunde ausgeschieden [Bates P. 2007; Ilg T. 2000; Rogers M. E. et al. 2002].

Der Speichel der Sandmücken hat die Funktion die Produktion mikrobizider Substanzen, die Antigenpräsentation und die Th1-Immunantwort zu behindern, außerdem verursacht er Vasodilatation und wirkt antihämostatisch, begünstigt also sowohl die Verbreitung des Parasiten als auch die Aufnahme der Blutmahlzeit durch die Sandmücke.

Dieser Übertragungsmechanismus resultiert wahrscheinlich in einer nicht ausreichenden Aufnahme von Nahrung während eines Blutmahls. Der mit metazyklischen Promastigoten infizierte und mit einem PSG-Pfropfen versehene Insektenvektor wird durch diese Hungersituation angeregt, länger auf einem Wirt zu verbleiben und mehrere Wirte aufzusuchen, um sein Nahrungsbedürfnis zu stillen. Dieser Umstand begünstigt die erfolgreiche Etablierung des Parasiten im Vertebratenwirt und erhöht die Anzahl an infizierten Wirten [Rogers M. et al. 2007].

Die Transformation von prozyklischen in metazyklische Promastigoten, ausgelöst durch eine Veränderung des pH-Wertes im sie umgebenden Milieu, geschieht innerhalb von 7-8 Tagen nach der Blutmahlzeit und führt zu einer dickeren Glykokalyx, hervorgerufen durch die Erhöhung der Anzahl der repetitiven Elemente im LPG was eine Verlängerung des LPG bewirkt [Dobson D.E. et al. 2003; Vanier-Santos M.A. et al. 2002]. Die Verdickung der Glykokalyx führt dazu, dass die Komponenten des C5-C9 Membranangriffkomplexes des Vertebratenwirtes von der Oberfläche abgelöst und die Komplement-vermittelte Lyse verhindert wird. Zudem wird die Metalloprotease gp63 vermehrt exprimiert, was die Formung der C5-Konvertase verhindert, indem C3b-Untereinheiten in das inaktive C3bi umgewandelt und die C3bi Untereinheit auf der Oberfläche der metazyklischen Promastigoten gebunden wird [Alexander J. et al. 1999; Sacks D.L. et al. 1995 ; Olivier M. et al. 2005; Brittingham A. et al. 1995]. Übertragene prozyklische Promastigoten werden, aufgrund der fehlenden Umstrukturierung des LPG und der fehlenden Hochregulierung der Expression der Metalloprotease gp63, durch die Komplement-vermittelten Lyse entfernt. Die Opsonisierung der metazyklischen Promastigoten durch C3bi und C3 vermittelt die Interaktion mit den CR1- und CR3- Rezeptoren der Makrophagen des Vertebratenwirtes [Mosser D.M. et al. 1987 ; Olivier M. et al. 2005; Brittingham A. et al. 1995; Domínguez M. et al. 2003].

1.1.5 AUFNAHME DES PARASITEN DURCH MAKROPHAGEN DES VERTEBRATENWIRTES

Abgesehen von den Makrophagen und Monozyten, die das primäre Ziel der Leishmanienpromastigoten darstellen, können sie auch, bedingt durch die passive Art der Aufnahme, von anderen Zellen die über entsprechende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche verfügen phagozytiert werden [Rittig M.G et al. 2000; Körner U. et al. 2006]. Durch die Bindung an diese Rezeptoren wird eine Phagozytose forciert, jedoch wird eine Initialisierung des „oxidativen Bursts“ verhindert, was die Lyse der phagozytierten Promastigoten durch Sauerstoffradikale vermindert [Alexander J. et al. 1999].

Weitere Möglichkeiten der Interaktion metazyklischer Promastigoten mit Makrophagen bestehen über die direkte Bindung von gp63 an CR3 und Fibronectinrezeptoren und LPG an CR3 und CR1 [Handmann E. 1999] sowie über CRP, welches über den CRP-Rezeptor eine Phagozytose anregt, ohne eine Makrophagenaktivierung auszulösen [Descoteaux A. et al. 1999; Olivier M. et al. 2005]. Eine Bindung von gp63 an den Fibronectinrezeptor der Makrophagen kann in Anwesenheit oder Abwesenheit von Komplement stattfinden. [Brittingham A. et al. 1999].

In all diesen Fällen kommt es zu einer Internalisation des metazyklischen Parasiten durch Phagozytose, die nach verschiedenen Mechanismen ablaufen kann. Es gibt sowohl die Möglichkeit einer Phagozytose nach dem „zipper“-Mechanismus bei dem sich Pseudopodien symmetrisch um den Parasiten schlingen, als auch nach dem „coiling“-Mechanismus, bei dem ein Pseudopod den Parasiten regelrecht einwickelt. Beiden Methoden liegt eine Reorganisation von Aktinmolekülen im Bereich der Anlagerung des zu phagozytierenden promastigoten Parasiten zu Grunde, die durch Ligand–Rezeptor-Bindung und anschließender Signalkette ausgelöst wird [Desjardins M. 2003; Rittig M.G. et al. 1998; Rittig M.G et al. 2000]. „Coiling“-Mechanismen findet man auch bei der Phagozytose von *Legionella pneumophila*. Im Gegensatz dazu wird *Trypanosoma cruzi*, ein naher Verwandter von *Leishmania*, ohne Einbeziehung von Aktinelementen phagozytiert. Dieser Mechanismus beinhaltet die durch Interaktion mit der Makrophagenmembran ausgelöste lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Ionen Konzentration und als Folge davon die Ansammlung von Lysosomen unter der Zelloberfläche, die sich dann nach außen stülpen.

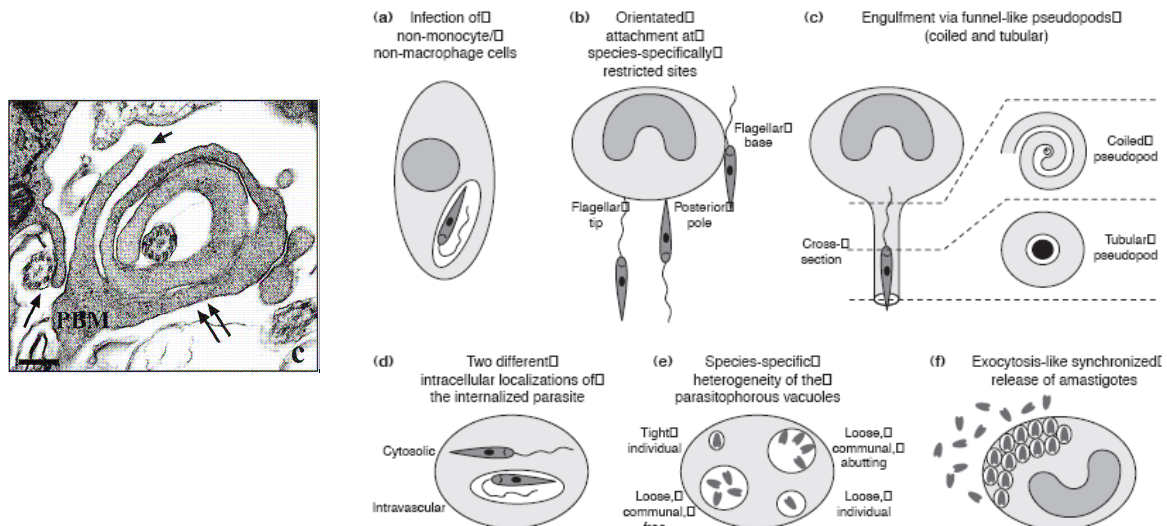


Abbildung 3. Links: „coiling“-Mechanismus bei *Leishmania ethioplastica*. (Rittig et al. 1998)
 Rechts: verschiedene Mechanismen der Anheftung, Phagozytose, intrazellulären Lokalisation und Exocytose von *Leishmania*. (Quelle: Rittig und Bogdan 2000)

Mittels dieser sich ausbildenden Tasche dringt *Trypanosoma cruzi* in den Makrophagen ein [Rodriguez A. et al,1996]. Durch die Phagozytose wird der Parasit in ein Phagosom (parasitophore Vakuole) eingeschlossen, welches -abhängig vom Mechanismus der Phagozytose- aus Material der äußeren Makrophagenmembran, oder im Fall von *Trypanosoma* aus lysosomalem Membranmaterial besteht. Zusätzlich zu äußeren Makrophagenmembranbestandteilen wurden in Phagosomen von *Leishmania* Membranteile des endoplasmatischen Retikulums (ER) gefunden. Dies legt eine ER-vermittelte Phagozytose als Makrophageninvasionsmechanismus nahe [Desjardins M. 2003; Rodriguez A. et al. 1996].

1.1.6 ENTWICKLUNG DES PARASITEN INNERHALB DES MAKROPHAGEN

Durch Veränderung des inneren Milieus und der vorübergehenden Fusion mit frühen und späteren Endosomen sowie Lysosomen reift das Phagosom zu einem Phagolysosom, welches ein hydrolytisches Milieu besitzt und reich an proteolytischen Enzymen ist. Um dieses für den Parasiten lebensfeindliche Milieu zu umgehen und sich im Falle von *Leishmania* sogar darin zu vermehren, sind verschiedene Strategien denkbar. Zum einen können sich Mikroorganismen wie *Chlamydia*

trachomatis oder *Legionella pneumophila* in spezialisierten Kompartimenten schützen, zum anderen kann eine Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom durch Vermeidung der Fusion des Phagosoms mit Lysosomen verhindert oder verzögert werden. Letzteres ist bei *Leishmania* der Fall. Eine große Rolle spielen dabei die repetitiven Phosphosaccharidelemente des LPG auf der Oberfläche des metazyklischen promastigoten Parasiten, die vermutlich in Interaktion mit der Membran sterisch eine Fusion mit einem Lysosom verhindern. [Descoteaux A. et al. 1999; Desjardins M. 2003]. Die Produktion von mikrobiziden, gegen *Leishmania* Promastigote wirksamen Molekülen wie „Nitric oxide“ (NO) oder „radical oxygen intermediate“ (ROI) über den NADPH-Oxidase-Komplex, wird durch Hemmung der Antwort auf IFN γ -Stimulation und Hemmung des Jack/STAT -Signalweges durch LPG und gp63 verhindert. LPG hemmt ebenfalls die Aktivität der Protein-Kinase-C (PKC). Hieraus wird ersichtlich, dass LPG und gp63 wahrscheinlich die wichtigste Rolle in der Invasion und dem Überleben im Makrophagen spielen [Descoteaux A. et al. 1999; Olivier M. et al. 2005; Handmann E. et al. 2002].

Die Verzögerung der Reifung der Phagosomen schützt die gegen das Milieu der Phagolysosomen empfindlichen metazyklischen Promastigoten von *Leishmania* und ermöglicht die weitere Differenzierung in eine amastigote Form. Auslöser für die Differenzierung und die Vermehrung durch Teilung, dürfte die Veränderung des Milieus durch die endgültige Reifung zum Phagolysosom und einem sauren pH (5,5) sein, ebenso wie die Anhebung der Temperatur auf 37°C [Debrabant A. et al. 2004; Barak E. et al, 2005; Russel D.G. et al. 1992]. Die offensichtlichste Veränderung ist dabei eine morphologische. Die Umwandlung (2-5 Tage) von einer länglichen Form in eine eher runde Form und die Reduktion des Flagellums sind äußere Belege für die Anpassung an die veränderten Lebensumstände innerhalb des Phagolysosoms. Auffällig ist auch ein extrem vergrößertes lysosomales System (Megasom) innerhalb der Amastigoten [Waller R.F. et al. 2002].

Die Transformation geht einher mit der verminderten Expression von LPG und gp63. Das nun vorherrschende Glykokonjugat auf der Oberfläche von Amastigoten ist Glykolylinositol Phospholipid (GIP), welches auch inhibitorischen Einfluß auf Proteinkinase C hat. Die Amastigoten erhalten durch eine membranständige ATPase ein neutrales Milieu ihres Zytoplasmas aufrecht. Der dabei entstehende elektrochemische Gradient, garantiert die Versorgung mit lebensnotwendigen Nährstoffen.

In mit *Leishmania* infizierten Makrophagen wird die Antigenpräsentation durch verminderte Expression, Endozytose oder Verhinderung der Beladung des MHC II Komplexes mit Antigenen verhindert. Der Aktivitätsstatus eines Makrophagen hängt von der Verfügbarkeit von stimulierenden oder hemmenden Cytokinen ab. In *Leishmania* infizierten Makrophagen ist die Produktion der die Makrophagenaktivität hemmenden Cytokine (IL10, TGF β) hochreguliert, während die Produktion der aktivierenden Cytokine (IL12) gehemmt ist [Bogdan C. et al. 1999]. Um die Infektion weiter zu etablieren und auf andere Wirte zu übertragen, muss der Parasit den Makrophagen verlassen. Der Mechanismus, der zur Freisetzung der Amastigoten aus dem Makrophagen führt, ist noch nicht abschließend geklärt. Angenommen wird ein Platzen der Zelle oder eine kontinuierliche Abgabe der Amastigoten über einen Exozytose-ähnlichen Prozess [Rittig M.G et al. 2000]. Der erneute Befall von Makrophagen durch amastigote *Leishmanien* findet wahrscheinlich über Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose statt.

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die Lebenszyklen der meisten *Leishmanien* einen sylvatischen Ursprung haben und Nager, Hunde oder Eidechsen die Endwirte darstellen. Infektionen des Menschen erfolgen auf drei Wegen. Eine zufällige Infektion innerhalb eines sylvatischen Zyklusses, eine innerhalb eines peridomestischen Zyklus erworbene Infektion mit einem Haustier als Reservoir oder ein Zyklus, in dem das Tierreservoir verschwunden ist oder noch nicht entdeckt wurde und der Mensch der einzige Endwirt ist [Bañuls A.-L. et al, 2007]. Vor allem Hunde und Kleinsäuger dienen in den meisten Gegenden als Reservoir für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus der *Leishmanien* und sorgen somit auch für eine hohe Infektionsrate unter Menschen. Einige Sandmückenarten zeigen eine ausgeprägte Vorliebe für menschliche Quellen ihrer Blutmahlzeit, was natürlich den Menschen als favorisierten Endwirt erscheinen lässt.

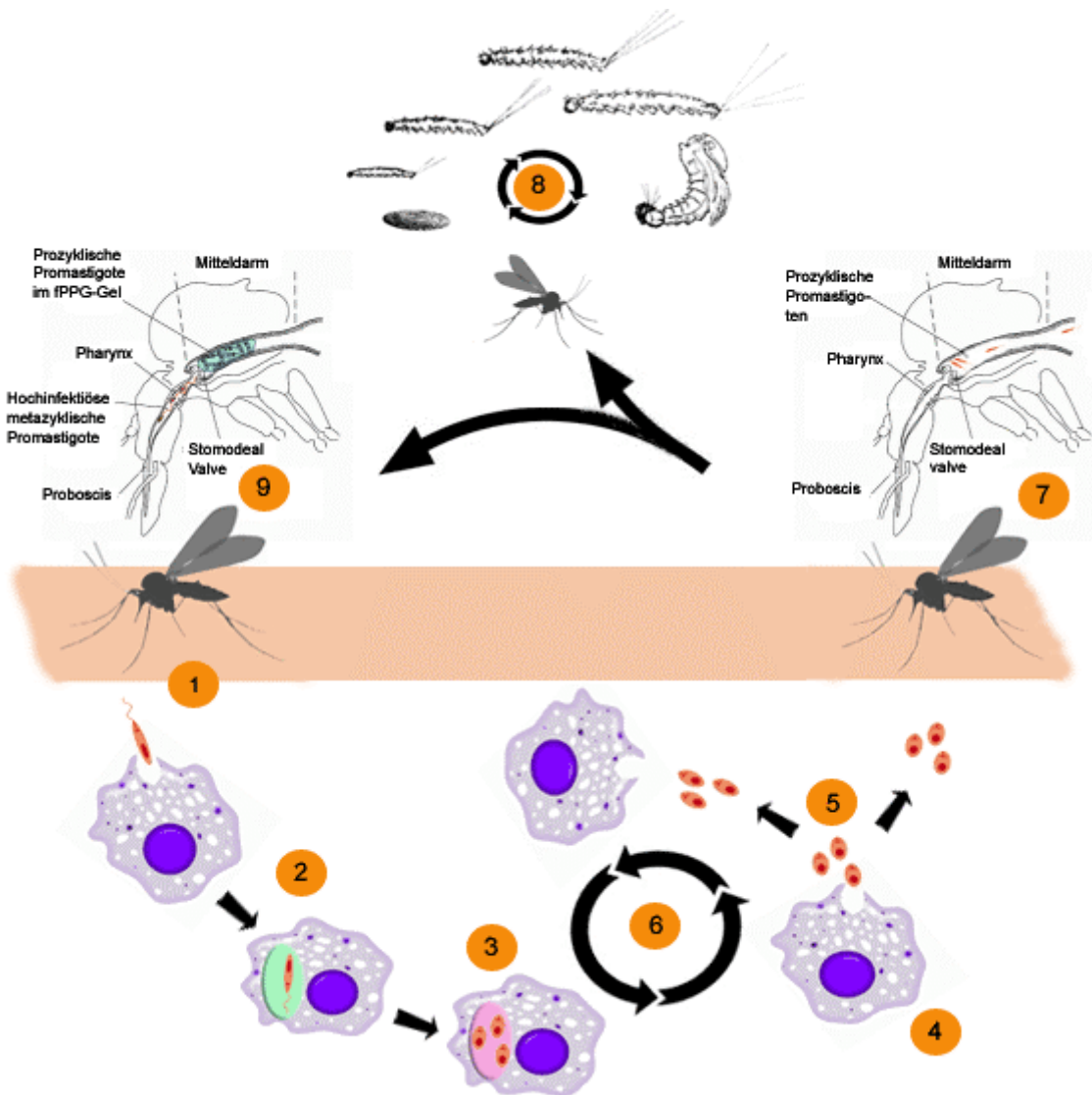


Abbildung 4. Lebenszyklus von *Leishmania*. 1. Übertragung der metazyklischen Promastigoten Parasiten auf den Vertebratenwirt. 2. Phagozytose durch Makrophagen 3. Differenzierung in Amastigote und Teilung 4. Exozytose 5. Aufnahme durch eine Sandmücke oder 6. Befall neuer Makrophagen. 7. Aufnahme in den Mitteldarm der Sandmücke, Entwicklung zu prozyklischen Promastigoten und Teilung 8. Vermehrungszyklus einer Sandmücke 9. Ausbildung des PSG-Pfropfs und Differenzierung zu metazyklischen Promastigoten.(Eigene Darstellung)

1.1.7 BEEINFLUSSUNG DES IMMUNSYSTEMS DURCH DEN PARASITEN

Der Verlauf einer Infektion mit *Leishmania* hängt in nicht unerheblichem Maße von der Immunkompetenz des betroffenen Wirtes ab. Eine Anfälligkeit für Leishmaniose hängt mit der Dominanz einer Interleukin4 (IL4) abhängigen Th2 Immunantwort

1.1.8 DIE VERSCHIEDENEN AUSPRÄGUNGEN DER LEISHMANIOSE

Der Verlauf einer Infektion mit *Leishmania* ist abhängig von der Leishmaniaart unterschiedlich. Die klinischen Symptome lassen sich hauptsächlich in einen viszerotropen und einen kutanen Verlauf einteilen (siehe Tabelle 1). Es gibt Hinweise darauf, dass manche Arten ein unterschiedliches Temperaturoptimum *in vitro* haben. Ein höheres Temperaturoptimum favorisiert einen viszerotropen Krankheitsverlauf. Hauptsächlich scheint der Krankheitsverlauf aber durch die unterschiedliche Modulation der Antwort des Immunsystems des

Klinische Erkrankung	Leishmaniaart	Geografische Verbreitung
Lokale kutane Leishmaniose der Alten Welt (singuläre oder multiple Läsionen)	L. major L. tropica L. infantum L. aethiopica	Mittelmeerraum, Nordafrika, Naher und Mittlerer Osten, Zentralasien
Diffuse kutane Leishmaniose der Alten Welt	L. aethiopica L. major (bei Immunsuppression)	Äthiopien, Kenia, Jemen, Sudan
Diffuse kutane Leishmaniose der Neuen Welt,	L. brasiliensis L. mexicana L. amazonensis L. panamensis L. guyanensis	Mexiko, Zentralamerika, Südamerika
Mukokutane Leishmaniose (Espundia)	L. brasiliensis L. guyanensis L. panamensis	Zentralamerika, Südamerika
Viscerale Leishmaniose	L. infantum L. donovani L. chagasi L. tropica L. arattonensis	Mittelmeerraum, China, Indien, Ostafrika Süd- und Mittelamerika Mittlerer Osten Brasilien
Post-Kala-Azar-dermale Leishmaniose	L. donovani	Indien, Sudan

Tabelle 1. Verschiedene Formen der Leishmaniose mit den Erregern und deren geografischer Verbreitung. (nach Bogdan 2006)

Vertebratenwirtes bestimmt zu werden. Die vermehrte Genexpression von Komponenten des Prostaglandin E₂-Syntheseweges (PGE) in mit viszerotropen Leishmania-Arten infizierten Makrophagen, führt zu verminderter IIFN γ und TNF α Produktion und sorgt so für eine Begrenzung der Entzündungsreaktion. Vermutlich

trägt dies zur Viszeralisierung bei [Gregory D.J. et al. 2008]. Einige Leishmania-Arten lösen immer nur eine Art von Leishmaniose aus, während andere durchaus die kutane und die viszerale Form auslösen können (siehe Tabelle 1) [Noyes H. et al. 1997].

Bei einer einfachen kutanen Leishmaniose bleibt die Infektion auf die Hautmakrophagen in unmittelbarer Nähe der Einstichstelle beschränkt. Die Gewebszerstörung aufgrund der Ausbildung eines Granuloms gipfelt in der Ausbildung eines nässenden oder auch trockenen Ulkus. Kutane Leishmaniosen heilen spontan nach sechs bis acht Monaten ab und der betroffene Wirt erwirbt eine lebenslange Immunität gegenüber kutaner Leishmaniose. Die Vernarbungen, ausgelöst durch die Gewebszerstörungen, sorgen allerdings nicht selten für soziale Stigmatisierung, da sie an exponierten Stellen des Körpers (Gesicht, Hand) zu sehen sind. Eine Variante ist die diffuse kutane Leishmaniose, bei der sich mehrere Läsionen über einen größeren Bereich des Körpers ausbreiten. Eine weitere Variante ist die mukokutane Leishmaniose (Espundia), bei der die befallenen Makrophagen überwiegend an die Schleimhäute von Mund und Nase wandern und die dortigen Gewebszerstörungen zu massiven Entstellungen führen. Diese Form der Leishmaniose war bisher ausschließlich in der Neuen Welt zu beobachten. Komplikationen im Krankheitsverlauf treten bei kutanen Leishmaniosen durch bakterielle Superinfektion auf.



Abbildung 6. Von Links: Post Kalar Azar dermal Leishmanoid (PKDL), rezidive Leishmaniose, diffuse kutane Leishmaniose und mukokutane Leishmaniose (Septum). (Quelle: WHO)

Die viszerale Leishmaniose ist die weitaus gefährlichere Form der Leishmaniose. Sie führt unbehandelt in über 90% der Fälle zum Tode, bei in Behandlung befindlichen

Patienten liegt der Prozentsatz immer noch bei 15%. Die Parasiten gelangen über das Blut oder die Lymphe in die Eingeweide und vermehren sich im retikuloendothelialen System (RES). Dies führt zu Gewebszerstörungen, besonders in Leber, Knochenmark und Milz, und verursacht die Vergrößerung dieser Organe (Hepatosplenomegalie). Die Inkubationszeit variiert zwischen wenigen Wochen und mehreren Monaten. Die Patienten haben meistens hohes Fieber, leiden unter Gewichtsverlust und weisen ein abnormales Blutbild mit Anzeichen für eine Leukozytopenie und Anämie auf. Bei einer nicht geringen Anzahl von Menschen verläuft die Infektion mit viszeraler Leishmaniose subklinisch. In fortgeschrittenen Fällen zeigt die sehr trockene und blasse Haut eine dunkle Pigmentierung, darauf ist die Bezeichnung Kala-Azar (Hindi für „schwarze Haut“) zurückzuführen. Große Probleme bereiten Co-Infektionen mit HIV/AIDS, die in den endemischen Gebieten massiv zunehmen. In einigen Fällen kann sich vier bis sechs Wochen nach Abheilung der viszeralen Leishmaniose eine Post-Kala-Azar-Dermale-Leishmaniose (PKDL) ausbilden. Auf der Haut des Patienten bilden sich viele kleine knotige Pusteln, die amastigote Leishmanien enthalten. Der Verlauf von PKDL ist chronisch und hat damit eine große Bedeutung als Reservoir für die Ausbreitung der viszeralen Leishmaniose.



Abbildung 7. Von Links: Mikroskopische Untersuchung von Wundabstrichen mit Giemsa-Färbung, Anfertigung eines Wundabstrichs bei einem Patienten mit Verdacht auf kutane Leishmaniose, Kind mit vergrößerter Leber und Milz aufgrund von viszeraler Leishmaniose. (Quelle: Eigene Bilder und WHO)

1.1.9 EPIDEMIOLOGIE

Leishmaniosen aller Art kommen in 88 Ländern vor, von denen 72 als Entwicklungsländer klassifiziert werden. Über 90% der Fälle von viszeraler Leishmaniose finden sich in Bangladesh, Indien, Brasilien und Sudan. Über 90% der Fälle kutaner Leishmaniose finden sich im Iran, in Afghanistan, Syrien, Saudi Arabien, Brasilien und Peru. Mukokutane Leishmaniose findet man nur in Südamerika. Ein Punkt, der hier nicht unerwähnt bleiben soll, ist das Auftreten von Fällen viszeraler Leishmaniose bei Menschen in Südeuropa, besonders im Mittelmeerraum. Häufiger ist dort kutane aber auch viszerale Leishmaniose bei Hunden (42% der Hunde in Andalusien sind mit viszeraler Leishmaniose infiziert) anzutreffen. Die Erhöhung der Anzahl der Leishmaniefälle bei Menschen in Südeuropa wird auf diese hohe Infektionsrate von Hunden zurückgeführt und auf die sich erholenden Sandmückenpopulationen, die nach der Kampagne der Malariamückenbekämpfung mit DDT in den 1950er Jahren stark zurückgegangen waren [Moral L. et al. 2002].

Die Ausbreitung von AIDS/HIV forciert weltweit die Ausbreitung von viszeraler Leishmaniose. Weltweit sind etwa 350 Millionen Menschen dem Risiko einer Infektion mit Leishmaniose ausgesetzt. Etwa 1,5 Millionen Personen erkranken jährlich an kutaner und 500.000 an viszeraler Leishmaniose. Hauptsächlich an viszeraler Leishmaniose sterben jährlich 59.000 Menschen [WHO/TDR].

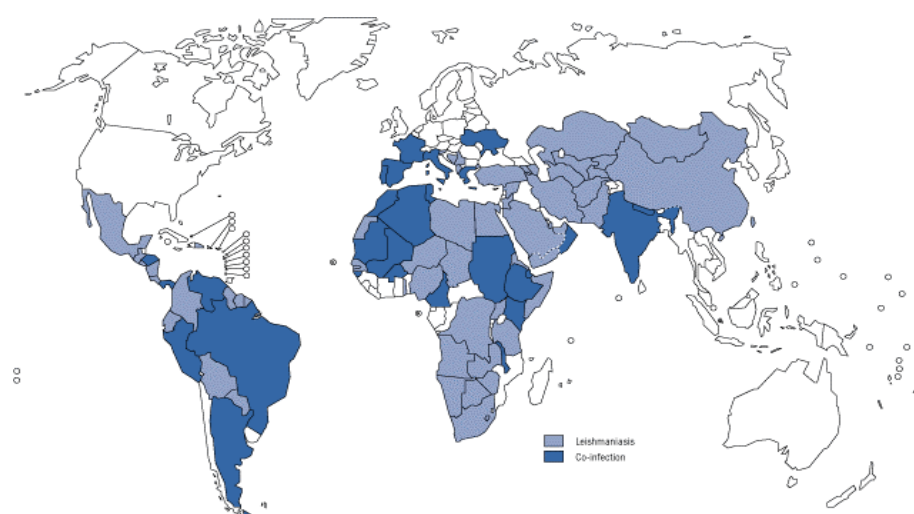


Abbildung 8. Verbreitung von Leishmaniose (Hell- und Dunkelblau) und Co- Infektion mit HIV/AIDS (Dunkelblau). (Quelle: WHO)

1.1.10 ÜBERTRAGUNGSWEGE FÜR LEISHMANIOSE

Die weitaus meisten Infektionen sind auf eine vektorbasierte Übertragung zurückzuführen. Theoretisch sind auch andere Übertragungswege wie parentale, kongenitale, sexuelle Übertragung oder eine Infektion durch Exposition gegenüber Risikomaterial (kontaminierte Nadeln) möglich. Nachgewiesene Übertragungswege - neben der Infektion über den Vektor- sind Dialyse, Transplantation, kongenitale Übertragung und sexueller Kontakt. [Vannier-Santoz M.A. et al. 2002].

1.1.11 RISIKEN EINER INFEKTION UND PROPHYLAXE

In ländlichen Gebieten der oft durch Agrarland geprägten Entwicklungsländer ist ein nahes Beieinander von menschlicher Behausung und Tierställen üblich. Hier finden die Vektororganismen idealen Voraussetzungen, indem Brutplatz (feuchter Stallboden) und Nahrungsquelle (Stalltiere bzw. Mensch) nahe beieinander liegen. Stalltiere bilden hier ein Reservoir das den Lebenszyklus der Leishmanien aufrecht erhält, in Stadtgebieten sind freilaufende Hunde als Reservoir häufig. In warmen Gegenden besteht grundsätzlich ein größeres Risiko, sich mit Leishmaniose zu infizieren, da die Vektororganismen eine Temperaturuntergrenze von ca. 15°C zum Überleben benötigen. Da die Vektororganismen überwiegend in der Dämmerung und nachts auf der Suche nach einer Blutmahlzeit umherfliegen, ist dies die Zeit mit der größten Ansteckungsgefahr.

Zur Prophylaxe ist es ratsam, sich während der Dämmerung von endemischen Gebieten fernzuhalten oder zumindest alle freien Körperstellen zu bedecken, da die Sandmücken aufgrund ihrer Größe (ca. 2mm) nicht in der Lage sind die Kleidung zu durchdringen. Moskitonetze bieten nur wenig Schutz, da die Sandmücken diese aufgrund ihrer geringen Größe durchdringen können. Ratsam in Bezug auf Moskitonetze ist die Imprägnierung mit Repellent.

Möglichkeiten, von staatlicher Seite gezielt gegen die Ausbreitung der Leishmaniose vorzugehen sind die Vektorkontrolle, die Bestimmung der Infektionsrate der Bevölkerung durch geeignete Diagnose und die konsequente Behandlung bekannter Leishmaniosepatienten.

1.1.12 DIAGNOSE VON LEISHMANIOSE

Der Nachweis von kutaner Leishmaniose ist im Gegensatz zu viszeraler Leishmaniose einfacher. Die meisten kutanen Leishmaniosen heilen nach sechs Monaten von selbst ab. Eine ulzerierende Läsion der Haut ist ein Hinweis auf kutane Leishmaniose, der jedoch klinisch abgesichert werden sollte, da auch bei viszeraler Leishmaniose zunächst eine Läsion zu sehen ist. Die Präsentation der Parasiten aus einer Biopsie oder einem Abstrich der ulzerierenden Hautpartie mittels Giemsa-Färbung und Mikroskopie bildet hier den Goldstandard.

Der rot angefärbte Kern und der violett-rot angefärbte Kinetoplast dienen ebenso zur Identifikation wie die äußere Form des Parasiten. Zur Absicherung und Sensitivierung des Mikroskopbefundes ist eine Kultivierung der Parasiten oder eine PCR nötig, da in den Läsionen oft wenig Parasiten vorhanden sind und somit die Diagnose per Mikroskop schwierig ist. Kulturen promastigoter Leishmanien werden in RPMI160 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, Schneider Insektenmedium, M199 oder Grace's Medium angesetzt und bei 22°-28°C inkubiert. Die Differenzialdiagnose umfasst ulzerierende Läsionen aufgrund von Mycobakteriumbefall, kutaner Diphtherie, tertiärer Syphilis, Frambösie, subkutane Karzinome oder Pilzinfektionen. Problematische Verläufe einer kutanen Leishmaniose sind nur bei Superinfektion der Läsionen, bei diffuser kutaner Leishmaniose und bei mukokutaner Leishmaniose zu erwarten. Bei Verdacht auf die beiden letzteren schwereren Formen von kutaner Leishmaniose ist eine serologische Diagnose und PCR sinnvoll, um sie frühzeitig auszuschließen.

Methoden der serologischen Diagnose sind der Montenegro Skin Test (MST) [Melo et al. 1977; Passos et al. 2000], Direkt Agglutination Test (DAT) [Chappuis et al. 2006], Formol Gel Test (FGT) [Chappuis et al. 2005], Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) [Salotra P, Singh R. 2005] und Immunofluoreszentest (IFA). Der Montenegro Skin Test und der Formol Gel Test, die besonders in Entwicklungsländern häufig angewendet werden führen oft zu Fehldiagnosen, da nur inaktiviertes unspezifisches Leishmaniaextrakt benutzt wird, oder wie im Falle des Formol Gel Test (Aldehyd-Test), nur unspezifisch ansteigende Immunglobulinkonzentrationen gemessen werden, die nur Rückschlüsse auf eine Entzündung erlauben, nicht aber auf deren Art. Gerade Methoden, die als Antigen einen Rohextrakt aus Leishmaniakulturen benutzen, unterliegen einer hohen

Fehlerquote, da besonders in Südamerika Kreuzreaktionen mit verschiedenen Trypanosomatidenarten zu erwarten sind. Dies gilt auch für die Verwendung von Leishmania-Rohextrakt im ELISA. Der Direkt Agglutination Test (DAT), der trypsinisierte ganze Promastigote als Antigen benutzt, wird seit Jahren eingesetzt und zeigt gute Ergebnisse in verschiedenen Ländern. Probleme mit der Reproduzierbarkeit und Qualitätsunterschieden in den Antigenchargen stellen diese Ergebnisse jedoch in Frage. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine Methode, die hohe Spezifität und Sensitivität zeigt, die aber natürlich vom verwendeten Antigen abhängt. Weit verbreitet ist die Verwendung von CSL (Crude Leishmania Antigen oder auch LSA = Leishmania Soluble Antigen). Diese Rohextrakte lassen aber Kreuzreaktionen mit z.B. Chagas Disease (*Trypanosoma cruzi*) erwarten. Über Kreuzreaktionen mit Trypanosomiasis, Tuberkulose und Toxoplasmose wurde schon berichtet [Choudhry et al.1990; Kumar R. et al. 2001; Singh S. et al. 1995; Srmkovsky L.L. et al. 1977].

Die Diagnose im Anfangsstadium der viszerale Leishmaniose ist wichtig um sie von kutaner zu unterscheiden, da die Mortalitätsrate unbehandelt bei über 90% liegt. Eine Läsion an der Einstichstelle liefert keinen klaren Hinweis auf einen viszerale Befall, da ernste Beschwerden erst nach Wochen oder Monaten auftreten. Eine Differentialdiagnose beinhaltet Malaria, Typhus und Tuberkulose. Co-Infektionen mit diesen Krankheiten sind möglich. Ein einfacher preiswerter Test ist wiederum die mikroskopische Präsentation des Parasiten im Biopsiematerial von Leber, Milz oder Knochenmark. Es gelten die gleichen Restriktionen wie schon bei der kutaner Leishmaniose beschrieben, zuzüglich der immer mit Risiken behafteten invasiven Techniken um geeignetes Biopsiematerial zu erhalten. Um den Parasiten im Biopsiematerial nachzuweisen ist auch bei viszerale Leishmaniose eine Kultivierung der Promastigoten möglich. Makrophagen oder Gewebekulturen von amastigoten Parasiten werden nur bei chemotherapeutischen Studien benutzt. Eine Kultivierung der Parasiten ist aufgrund der speziellen Medien sehr teuer und aufwendig, da der Nachweis meistens mehrere Wochen benötigt. Eine weitere Methode zur Diagnose viszerale Leishmaniose ist die Inokulation von Versuchstieren (Goldhamster, Labormäuse oder Meerschweinchen) mit Probenmaterial aus Biopsien. Dieser Nachweis ist durch die Anschaffung von geeigneten Versuchstieren ebenfalls sehr teuer und kann mehrer Monate dauern. PCR mit DNA, gewonnen aus Leber-, Milz-, oder Knochenmark-Biopsien, liefert gute Ergebnisse. Eine weniger risikoreiche

invasive Technik zur Gewinnung der DNA für eine PCR, wäre die Isolation des „buffy coat“ aus Citrat- oder EDTA-Blut. Als Zielsequenz für PCR haben sich die DNA des Kinetoplasten (kDNA) [Smyth et al. 1992], die miniexon-derived-RNA Gene [Hassan et al. 1993] oder die ribosomale RNA Genabschnitte (rRNA) [Van Eys et al. 1992] bewährt, die in unterschiedlich hoher Kopienzahl vorkommen. Wirklich zufriedenstellende Ergebnisse bringen jedoch nur „nested“-PCRs, die aber einer hohen Kontaminationsgefahr unterliegen. PCR eignet sich sowohl zur Diagnose akuter als auch chronischer oder bereits geheilter und auch rezidiver Infektion mit Leishmaniose. Sie ist also auch zur Überprüfung des Erfolgs von Chemotherapien gegen Leishmaniose einsetzbar.

Eine weitere Möglichkeit der Diagnose und der Überprüfung von Behandlungserfolgen bei viszeraler Leishmaniose und vor allem der taxonomischen Einordnung der Erreger, liefert die Restriction Fragment Length Polymorphismus (RFLP) [Marfurt 2003], bei der die PCR Produkte mit Restriktionsendonukleasen geschnitten werden und über das Chromatogrammmuster einer Art zugeordnet werden können. Die sichere Deutung der Bandenmuster erfordert aber ein hohes Maß an Erfahrung. Eine eindeutige Diagnose benötigt jedoch auch immer einen zweiten Test, um eine gesicherte Aussage über den Infektionsstatus besonders schwach positiver Patienten zu treffen. Hier bietet sich der immunologische Nachweis an. Die verfügbaren serologischen Methoden sind unterschiedlich gut einsetzbar. Die Detektion von Antigenen oder Antikörpern mittels Antigen-Antikörper-Bindung ist mit Hilfe von ELISA und DAT (siehe oben) möglich. Monoklonale Antikörper liefern in diesem Zusammenhang eine Möglichkeit zum Nachweis parasitärer Antigene. Diese Tests liefern auch bessere Ergebnisse als der Antikörpernachweis [De Colmenares M. et al. 1995; Vinayak V. et al. 1994], sind aber mit erheblichen Kosten verbunden. Der KATEX-Test bietet hier eine sensitive Möglichkeit des Nachweises von Antigenen im Urin. Dieser Test benutzt Latexbeads, die mit aus Kaninchen isolierten polyklonalen Leishmania-Antikörpern beschichtet sind [Attar J.A. et al. 2000]. Die andere Möglichkeit, einen serologischen Nachweis auf viszerale Leishmaniose zu bringen, stellt der Nachweis von Antikörpern durch isoliertes oder synthetisches Leishmania-Antigen dar. Diese Art Tests versprechen gute Resultate, da gerade viszerale Leishmaniose eine hohe Anzahl Antikörper gegen eine Vielzahl von unspezifischen Proteinen und Haptenen aufgrund einer polyklonalen B-Zell Aktivierung aufweist. Die Verwendung von spezifischen

rekombinanten Antigenen verbessert die Leistungsfähigkeit dieser Tests. Das Antigen K39 (Kinesin related Antigen) ist hierfür ein Beispiel, wie vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität im ELISA in Indien zeigen. In Südeuropa, Sudan und Brasilien ist jedoch eine weit weniger überzeugende Sensitivität und Spezifität erreicht worden als in Indien [Singh S. 2006].

Methoden	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Literaturreferenz
Antikörpernachweis durch:			
Indirekte Haemagglutination	73-75	80-90	Bray S., 1976 und 1975; Haldar J.P. et al., 1981; Piaroux R. et al., 1994; WHO 1995
IFA	55-70	70-89	
DAT	91-100	72-95	Singh S. et al., 1995; Sundars. et al., 2002 ; Zijlstra E.E. et al., 1995 und 1992 Choudhry A. et al., 1990
ELISA (CSA)	80-100	84-95	
ELISA (K39)	100	100	Kumar R. et al., 2001; Singh S. et al., 1995
Dipstick (K39) Indischer Subkontinent	100	88-98	
Dipstick (K39) Sudan, Europa	67-71	97-100	
Antigennachweis durch:			
KATEX (im Urin)	68-100	k. A.	
Parasitenpräsentation:			
Mikroskopie und Giemsa-Färbung Knochenmark	60-85	k. A.	
Mikroskopie und Giemsa-Färbung Milzbiopsie	>95	k. A.	

Tabelle 2. Methoden zur Diagnose von Leishmaniosen.

Limitierend für Entwicklungsländer sind bei allen Arten von Tests die Kosten und ihre praktische Durchführbarkeit. Zur Felddiagnose eignet sich vor allem die Dipstick („lateral flow“) -Methode. Bei diesem Test wird das Antigen K39 auf einer Nitrozellulosemembran appliziert und das Patientenblut wandert durch die Kapillarkräfte zur Antigenbande. Ein positiver Test ist durch die Anfärbung der Antigenbande leicht abzulesen. Diese Technik macht den Test zu einem guten Mittel für die Felddiagnose, da er sofort anwendbar ist und keine weitere Laborausstattung

und kein ausgebildetes Personal benötigt. Im regionalen Vergleich waren jedoch Schwierigkeiten in der Sensitivität zu beobachten (Sudan) [Sundar S. et al. 2002]. In kleineren Labors kann durchaus eine PCR oder ein ELISA durchgeführt werden. IFA und RFLP erfordern schon ein gut ausgestattetes Labor, was wiederum mit hohen Kosten verbunden ist. Die Schwierigkeiten beim Einsatz K39 basierender Tests z.B. im Sudan und in Südeuropa legen die Vermutung nahe, dass eine Kombination von K39 mit verschiedenen rekombinanten Antigenen sinnvoll zur Einsetzbarkeit dieser Tests beitragen kann.

1.1.13 BEHANDLUNG VON LEISHMANIOSE

Die Behandlung von kutaner Leishmaniose ist grundsätzlich nur notwendig, wenn die Läsionen nicht innerhalb von 6 bis 9 Monaten abheilen oder andere Komplikationen wie z.B. eine Superinfektion durch Bakterien auftreten. Gewöhnlich heilen die Läsionen innerhalb dieser Zeit wieder ab und der Patient erwirbt Immunität gegen diesen Erreger. Wichtig ist eine Behandlung der viszeralen Leishmaniose, da sie unbehandelt in über 90% der Fälle zum Tode führt. Für eine korrekte Behandlung ist eine zuverlässige Diagnosemethode unverzichtbar, denn eine viszerale Leishmaniose ist äußerlich im Anfangsstadium schwer von der kutanen Form zu unterscheiden. Die Behandlung mit den zurzeit verfügbaren Medikamenten ist mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden (Tabelle 3) und sollte Patienten mit kutaner Leishmaniose nicht zugemutet werden. Patienten, die aufgrund von AIDS/HIV immunsupprimiert sind, entwickeln eine schwächere Immunantwort als Patienten ohne diese Einschränkung. In diesen Fällen sind häufig Infektionen mit Leishmanien zu beobachten (25-70% der Fälle in Spanien, Frankreich und Portugal) oder eine abgeheilte Infektion mit Leishmaniose tritt wieder auf. Die Diagnose von viszeraler Leishmaniose bei einem immunsupprimierten Patienten wird durch die verminderte Immunantwort erschwert und der Patient reagiert häufig nicht auf eine Medikation. Zurzeit wird die viszerale Leishmaniose noch hauptsächlich mit pentavalenten Antimonpräparaten behandelt. Der unsachgemäße und massive Einsatz dieser Medikamente hat dazu geführt, dass Resistenzen der Erreger gegen diese Präparate weit verbreitet sind [Ponte-Sucre 2003]. Als Alternativpräparat wird von der WHO Amphotericin B, einem Antimykotikum empfohlen, welches leishmanizide Wirkung

besitzt. Dieses Medikament ist jedoch sehr teuer und noch nicht überall erhältlich, da es eine wirkliche Alternative zu den bisher verwendeten darstellt. Außerdem hat es ähnlich starke Nebenwirkungen wie pentavalente Antimonpräparate.

Medikament	Nebenwirkungen	Häufigkeit
Pentavalentes Antimon (Intralesional inCL., parenteral)	Allgemein Schmerzen, Erythema, Oedeme, Erhöhte Werte von Amylase/Lipase oder Leberfunktionstest, Muskelschmerz, Gelenkschmerzen, Bauchschmerzen, Übelkeit, Thrombozyto- und Leukozytopenie, Schwankungen im EEG	Häufig, vorübergehend Sehr Häufig Häufig, mild bis moderat Häufig, mild bis moderat Selten, mild ansteigend Selten, mild (CL), mild bis stark (VL) evtl. tödlich
Paromomycin (CL) (parenteral VL)	Erythema, Schmerzen, Oedem, Bläschenbildung Ototoxizität	Selten, vorübergehend Selten
Miltefosine	Übelkeit, Erbrechen und/oder Durchfall Erhöhtes Kreatinin Erhöhter Leberfunktionstest	Häufig, gewöhnlich mild und vorübergehend Häufig, mild ansteigend Selten (CL), häufig leicht zunehmend (VL)
Pentamidin	Übelkeit, Erbrechen und/oder Durchfall Hyperglykämie Kardiotoxizität	Sehr Häufig Selten, evtl. Stark (VL) Selten, evtl. Stark (VL)
Amphotericin B (Für VL)	Nebenwirkungen aufgrund von Infusion Azothämie Anämie und Hypokalämie	Sehr Häufig Häufig Selten

Tabelle 3. Medikamente zur Behandlung von Leishmaniose und ihre Nebenwirkungen.

Eine weitere Alternative zeigt sich in Form des oral verabreichten Medikaments Miltefosine, welches erst seit kurzem auf dem Markt ist und sich durch wenige Nebenwirkung von den anderen Medikamenten abhebt. Bei weiterer Verbreitung und erschwinglichen Preisen kann es als echte Alternative zu den bisher verwendeten Medikamenten gesehen werden.

1.2 AUFGABENSTELLUNG

Das Gesundheitssystem in Entwicklungsländern ist zu großen Teilen so aufgebaut, dass Patienten privat für medizinische Behandlung aufkommen müssen. Das Netz der Institutionen zu Gesundheitsversorgung ist unzureichend ausgebaut, so dass

Patienten oft lange Wege auf sich nehmen müssen, um behandelt werden können. Zusätzlich ist die Ausstattung der kleineren Kliniken oder medizinischen Stationen oft unzureichend für umfangreiche diagnostische Tests. Die Ursache hierfür liegt unter anderem in den fehlenden finanziellen Mitteln für das Gesundheitssystem in Entwicklungsländern.

Eine Konsequenz daraus ist das Medikamente und diagnostische Tests möglichst günstig erworben werden müssen bzw. selbst hergestellt werden sollten, um sie für die Bevölkerung erschwinglich zu machen. Vernachlässigt werden hierbei immer wieder die diagnostischen Tests, die für eine effektive Behandlung unverzichtbar sind. Gerade bei Krankheiten die schwer zu diagnostizieren sind, zunächst eine unauffällige oder sehr uncharakteristische Symptomatik zeigen, sich daher schleichend ausbreiten und in ihrem Ausmaß gar nicht erkannt werden, bedürfen einer guten Diagnostik.

Die viszerale Leishmaniose ist eine Krankheit, die zunächst nur schwer von kutaner Leishmaniose zu unterscheiden ist, da sich bei beiden eine oder mehrere Läsionen an der Einstichstelle der Sandmücke entwickeln. Die späteren Symptome sind eher allgemein und werden auch bei vielen anderen Erkrankungen beobachtet, so dass Fehldiagnosen möglich sind. Die Konsequenz daraus kann eine falsche Medikation sein, die im schlimmsten Fall zum Tode des Patienten führen kann. Auch die Behandlung eines falsch positiv diagnostizierten Patienten kann fatale Wirkung haben, da die meisten Medikamente, die gegen viszerale Leishmaniose eingesetzt werden, starke Nebenwirkungen haben.

Bestehende diagnostische Tests sind allenfalls eine gute Grundlage für ein Diagnoseverfahren, welches kostengünstig, einfach zu handhaben und sensitiv genug ist für die Diagnose von viszeraler Leishmaniose in möglichst allen Endemiegebieten der Welt. Bezüglich der Sensitivität und gleichzeitiger kostengünstigen Herstellung ist der ELISA das Mittel der Wahl. Die dafür benötigten Antigene können gezielter gefunden und günstiger synthetisiert werden als das bisher der Fall ist.

Es soll ausgehend vom schon etablierten K39-Antigen eine Kombination von Antigenen gefunden und synthetisiert werden, welche die oben aufgeführten Kriterien bezüglich Kosten, Einsetzbarkeit und Sensitivität zur Diagnose von viszeraler Leishmaniose erfüllt. Dabei soll eine Strategie etabliert werden, die durch Nutzung von im Internet frei verfügbarer Software und selbst entwickelter Methoden für die

Synthese von Proteinen, das gezielte Auffinden und die Synthese von potentiellen Antigenen kostengünstig ermöglicht. Diese Strategie soll sich auch für die Entwicklung diagnostischer Tests für andere Krankheiten eignen, um Entwicklungsländer unabhängiger von etablierten kostenintensiven Strukturen zum Aufbau eines Gesundheitssystems zu machen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 MATERIAL

2.1.1 Geräte

Gelelektrophorese

Horizontales Minigelsystem (8x8cm)	AGS, Heidelberg, Deutschland
Vertikale Minigelkammer (8x10cm)	Keutz Reiskirchen, Deutschland
Netzgerät EPS 500/400	Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Schüttler

Horizontalschüttler GFL 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
GFL 3020	Deutschland
Certomat R	Braun, Melsungen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

IKA MS3 Digital	IKA Works Incorporated, Wilmington, NC, USA
-----------------	---

ELISA

BioRad Model 3550-UV	Bio Rad, München, Deutschland
----------------------	-------------------------------

AM60 Multi Reagent Washer	Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland
---------------------------	---

Wasserbäder

GFL Wasserbad 1013	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
--------------------	---

PCR-Geräte

T1 Thermocycler 96	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
--------------------	---------------------------------------

Primus 96	MWG Biotech AG, Eberberg, Deutschland
-----------	---------------------------------------

Robocycler Gradient 96	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
------------------------	------------------------------------

Elektroporation

Easyject Prima Equibio

Thermo Electron Corporation, Milford,
MA, USA

Photometer

Bio Photometer

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zentrifugen

Kühlzentrifuge Beckman J2-21

Beckman Instruments, Somerset, NJ,
USA

Centrifuge 5415C

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Multifuge 3 L-R Heraeus

Kendro Laboratory Products, Osterode,
Deutschland

Ultraschallapparatur

Sonoplus HD70

Bandelin, Berlin, Deutschland

UV Transilluminator

Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland

Dokumentation

UV Transilluminator MW 312nm N36

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Polaroid MP-4 Land Camera

Polaroid Corporation, Cambridge, MA,
USA

Polaroidfilm 667 Professional

Polaroid Corporation, Cambridge, MA,
USA

2.1.2 CHEMIKALIEN

β -Mercaptoethanol

Serva, Heidelberg, Deutschland

5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat
(BCIP)

Gerbu, Wiesloch, Deutschland

Acrylamid

Serva, Heidelberg, Deutschland

Adenosintriphosphat (ATP)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Agarose für die Gelelektrophorese

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Ammoniumchlorid

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumhydrogencarbonat

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumpersulfat (APS)

Serva, Heidelberg, Deutschland

Ammoniumsulfat

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Biorex 70	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol-Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dithiolreitol (DTT)	Biomol, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure/ Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycerin 80%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Guanidiniumhydrochlorid (GHC)	ICN Biomedicals, Deutschland
Harnstoff	ICN Biomedicals, Deutschland
Heparin-Sepharose	Pharmacia-LKB, Upsalla, Schweden
Isopropyl- β -D-thiogalctopyranosid (IPTG)	Gerbu, Wiesloch, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver fettarm zum Blocken	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Deutschland
N,N-Dimethylacetamid (DMA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Gerbu, Wiesloch, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglykol (Mr 3500-4500)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rinderserumalbumin Fraktion 5 (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Siliziumoxid (SiO ₂)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)	Gerbu, Wiesloch, Deutschland
Tetrazyclin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% (w/v)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylene-Cyanol-Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Enzyme

Enzym	Unit/µl	Reaktionspuffer	Zielsequenz	Bezugsfirma
BamHI	20	NEB2 + BSA	G/GATCC	New England BioLabs® Inc
EcoRI	20	NEB2 + BSA	G/AATTC	New England BioLabs® Inc
HindIII	20	NEB2 + BSA	A/AGTCC	New England BioLabs® Inc
PvuI	20	NEB3 + BSA	CGAT/CG	New England BioLabs® Inc
SauI3AI	20	NEB1 + BSA	/GATC	New England BioLabs® Inc
BglII	20	NEB3 + BSA	A/GATCT	New England BioLabs® Inc

Tabelle 4. Restriktionsenzyme

Enzym	Aktivität	Bezugsfirma
T4 DNA Ligase	1 Weiss-U/ µl	New England BioLabs® Inc
Taq Polymerase	5 U/ µl	Eigene Herstellung
Proteinase K	0,3 U/ µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rnase A	0,5 Kunitz-U/ µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lysozym	100 U/ µg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polynukleotidkinase	10 U/ µl	New England BioLabs® Inc
Klenowfragment	5U/µl	Roche Diagnostics GmbH

Tabelle 5. Andere Enzyme

2.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Allgemeine Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl

0,1 mM EDTA

T4 Ligasepuffer

30 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM MgCl₂

10 mM Dithiothreitol (DTT)

10% Polyethylenglykol (PEG)

1 mM ATP

100 µg/ml Rinderserumalbumin Fraktion
5 (BSA)NEB 1 Puffer

10 mM Tris/HCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol (DTT)

pH 8,0

NEB 2 Puffer

10 mM Tris/HCl

10 mM MgCl₂

50 mM NaCl

1mM Dithiothreitol (DTT)

pH 8,0

NEB 3 Puffer

50 mM Tris/HCl

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

1mM Dithiothreitol (DTT)

pH 8,0

Taq Polymerase Reaktionspuffer

40 mM Tricine/KOH pH 8,7

15 mM Kaliumacetat

3,5 mM Acetat

0,1% Gelatine

0,05% Tween20

DNA-Extraktion

Guanidinium-Lyse-Puffer (Für DNA Extraktion)

5 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl)
40 mM Tris/HCl pH 7,0
20 mM EDTA
1% Tween20

DNA-Waschpuffer

70% Ethanol
10 mM TrisHCl pH 7,0

RBC-Lyse-Puffer

300 mM NH₄Cl
30 mM NH₄HCO₃
30 mM KCl
0,1 mM EDTA

Plasmidpräparation mit alkalischer Lyse

Lösung 1

100 mM Tris/HCl pH 7,5
10 mM EDTA

Lösung 2

200 mM NaOH
1% SDS

Lösung 3

3 M Natriumacetat
2 M Essigsäure

DNA-Gelelektrophorese

Probenpuffer (DNA)

20 mM Tris/HCl pH 7,5
50% Glycerin
0,02% Bromphenol Blau
0,02% Xylen-Cyanol-Blau
20 mM EDTA

Agarosegel Elektrophoresepuffer

40 mM Tris/Acetat (pH 8,0)
40 mM Natriumacetat
2,0 mM EDTA

Acrylamid Elektrophoresepuffer

90 mM Tris/Borat pH 8,3
2,5 mM EDTA

Puffer für die Proteinreinigung über TALON®

Protein-Lyse-Puffer

6 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl)
40 mM Tris/HCl pH 8,0
250 mM NaCl

Protein-Waschpuffer

8 M Harnstoff
40 mM Tris/HCl pH 8,0
250 mM NaCl

Protein-Elutionspuffer

8 M Harnstoff
40 mM Tris/HCl pH 8,0
250 mM Imidazol

Protein-Gelelektrophorese

Tris-Glycin Elektrophoresepuffer (TG)

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

Probenpuffer (Protein)

50 mM Tris/HCl pH 8,6
2% SDS
10% Glycerin
1% β -Mercaptoethanol
12,5 mM EDTA
0,025% Bromphenol Blau

Coomassie-Blau Färbereagens

50% Ethanol
10% Essigsäure
0,12 % Coomassie-Brilliant-Blau

Entfärbelösung

5% Ethanol
7,2% Essigsäure

Sammelgelpuffer

125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1% SDS

Trenngelpuffer

375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1% SDS

Puffer für ELISA

TBS-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl

TBST-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,05% Tween20

Carbonate-Coating-Buffer CCB

70 mM Na_2CO_3
30 mM NaHCO_3
5 mM NaN_3

Antikörper-Verdünnungspuffer

1 xTBST
1% BSA
1mM DTT

Reaktionspuffer für alkalische

Phosphatase ELISA

100 mM Tris/HCl pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

BCIP-Substratlösung für alkalische

Phosphatase ELISA

50 mg/ml BCIP

100% Dimethylformamid

Puffer A für Peroxidase ELISA

0,2 Kaliumcitrat

3 mM H₂O₂

Substrat-Reaktions-Puffer für Peroxidase

ELISA

200 µl Puffer B

8 ml Puffer A

Block-Puffer

1% Milchpulver (Fettarm)

1 x TBS

NBT-Farblösung für alkalische

Phosphatase ELISA

50 mg/ml NBT

70% Dimethylformamid

Entwicklungslösung für alkalische

Phosphatase ELISA

60 µl BCIP Substratlösung für alkalische

Phosphatase ELISA

60 µl NBT Färbelösung für alkalische

Phosphatase ELISA

in 10 ml Reaktionspuffer für alkalische

Phosphatase ELISA

Puffer B für Peroxidase ELISA

41 mM Tetramethylbenzidin

8,2 mM TBABH in N,N Dimethylacetamid
(DMA)

Stop-Lösung für Peroxidase ELISA

1 M H₂SO₄

ELISA-Waschpuffer

1 x TBST

Puffer für die Reinigung der Taq Polymerase

TMN Puffer

50 mM Tris/HCl pH 8,5
1 mM EDTA
20 mM (NH₄)₂SO₄

KTA Puffer

20 mM Tris/HCl pH 8,5
10mM β-Mercaptoethanol
10% w/v Glycerin
0,1 mM EDTA
0,05% Triton X 100
0,05% Tween20

2.1.4 BAKTERIENSTÄMME

Escherichia coli XL-1 Blue

recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17
supE44 relA1 lac
[F'proAB, lacI_Z .M15Tn10 (Tet)]

Escherichia coli XL-1 Blue pREP

recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17
supE44 relA1 lac
[F'proAB, lacI_Z .M15Tn10
(Tet)]/pREP(Kan)

2.1.5 LEISHMANIA DNA UND ROHEXTRAKT

DNA-Material von *Leishmania infantum* und *Leishmania major* wurden von Prof. Dr. Bernhardt Fleischer vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg zur Verfügung gestellt. Aus Kulturen von *Leishmania major* und *Leishmania infantum* aus der gleichen Quelle wurde DNA gewonnen. Zur DNA-Extraktion wurde nach dem Standardprotokoll verfahren.

Zur Gewinnung von Rohextrakt als Antigen für den ELISA wurde die promastigote Kultur bei 5000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, 5 x mit PBS gewaschen und 3 x 30 Sekunden mit Ultraschall (50% Amplitude) behandelt (Ultraschallpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 2mM EDTA und 1,6 mM PMSF) . Danach wurde die Kultur bei

10000 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und als Antigen benutzt (LSA = Leishmania Soluble Antigen).

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLAUFSCHLUSS

Allgemein wurde die denaturierende Wirkung von Guanidiniumhydrochlorid zum Aufbrechen von E. coli-Zellen genutzt. Verschiedene andere Zellen lassen sich ebenfalls mit Guanidiniumhydrochlorid aufbrechen. Bei Isolation von DNA aus Sputum und gramnegativen Zellen sollten die Bedingungen verschärft und die Zellen unter Zuhilfenahme von Proteinase und Ultraschall aufgebrochen werden.

2.2.2 DNA-EXTRAKTIONEN

Silika-Methode zur Isolation von Nukleinsäuren

Die Bindung von Nukleinsäuren an Silikasuspension findet in Anwesenheit von stark chaotropen Substanzen wie Natriumiodid, Guanidiniumsalzen und Perchloraten statt. Nach der Bindung der Nukleinsäuren wird die Suspension mit alkoholhaltigen Puffern gewaschen und die Nukleinsäuren unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Standardprozedur:

10 bis 20 µl Zellpellet von E. coli wurden mit 500 µl Guanidiniumhydrochlorid versetzt und auf dem Vortex gemischt. Die Suspension wurde bei 65°C 10 Minuten erhitzt und 2 Minuten bei 13.000 U/Min in der Minifuge zentrifugiert. Zu dem in ein neues Gefäß überführten Überstand wurden 5 µl Silikasuspension gegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde die Suspension 30 Sekunden bei 13.000 U/Min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in DNA-Waschpuffer resuspendiert. Nach erneuter zweimaliger Zentrifugation bei 13.000 U/Min, Resuspension in DNA-Waschpuffer und vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 5 µl TE Puffer oder destilliertem Wasser aufgenommen. Diese Suspension wurde 10 Minuten bei 55°C inkubiert, bei 13.000 U/Min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben. Anschließend wurde das

Pellet noch einmal in 5 µl TE oder destilliertem Wasser resuspendiert, diesmal nicht erhitzt, sondern gleich bei 13.000 U/Min herunterzentrifugiert, der Überstand entnommen und zum Vorhergehenden gegeben.

Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli-Zellen wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim and Doly (1979) benutzt. Durch Zugabe von Detergenz und durch einen hohen alkalischen pH-Wert werden Proteine und Nukleinsäuren denaturiert. Nach anschließender Neutralisierung befinden sich renaturierte Plasmide in Lösung, während chromosomale DNA und Proteine ausfallen. Diese werden durch einen langen Zentrifugationsschritt pelletiert und die sich im Überstand befindenden Plasmide werden mit der Silika-Methode gereinigt. Die ebenfalls renaturierte RNA wird durch Zugabe von RNase A zerstört. Diese Methode kann für Minipräparationen (1,5 ml Kultur) oder Maxipräparation (50 ml Kultur) benutzt werden.

Standardprozedur:

Die folgenden Angaben sind für eine Minipräparation. Die entsprechenden Angaben für eine Maxipräparation sind in Klammern angegeben. Eine 1,5 ml Übernachtskultur wurde 5 Minuten bei 13.000 U/Min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl (2 ml) Lösung 1 resuspendiert. 20 µl (100 µl) RNase A (5mg/ml) wurden hinzugegeben und die Suspension bei Raumtemperatur für 2 (10) Minuten inkubiert. Anschließend wurden 200 µl (4ml) von Lösung 2 hinzugefügt und die Suspension vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden 150 µl (3 ml) von Lösung 3 dazu gegeben. Wiederum wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde bei 13.000 U/Minute zentrifugiert und die Plasmid-DNA nach der oben beschriebenen Silika-Methode isoliert und gereinigt.

DNA-Reinigung über Agarosegele

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe aus einem Gemisch zu isolieren, wurde die DNA-haltige Lösung je nach Größe über ein 1 oder 2%iges Agarosegel aufgetrennt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid konnte die Bande mit der

entsprechenden Größe unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten werden [Vogelstein 1979]. Das 3-fache Volumen NaI wurde hinzugegeben und bei 60°C inkubiert, um das Gel zu schmelzen. Nach Zugabe von mindestens 5 µl Silika, abhängig von der zu erwartenden Menge DNA, wurde mit der allgemeinen Silika – Methode die DNA gereinigt.

Extraktion von DNA aus „buffy coat“

Die Extraktion aus „buffy coat“ erhöht die Ausbeute an DNA von Erregern, die sich z.B. in Makrophagen befinden. Der „buffy coat“ ist nach der Zentrifugation als sehr schmale gelblich-braune Schicht zwischen Plasma und Erythrozytenschicht zu erkennen.

Standardmethode:

2-3 ml durch Citrat oder EDTA stabilisiertes Vollblut wurden 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Nachdem die annähernd durchsichtige Plasmaschicht mit einer Pipette entfernt worden ist, kann der „buffy coat“ mit einer Pipette von der darunter liegenden Erythrozytenschicht getrennt und in ein neues Gefäß überführt werden. Durch Zugabe von 1,2 ml RBC-Lyse-Puffer, mischen und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, werden die mit dem „buffy coat“ transferierten Erythrozyten lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 1 Minute bei 2000 x g wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in Guanidinium-Lyse-Puffer resuspendiert und die DNA mit der Silikamethode extrahiert.

2.2.3 EXPRESSION UND REINIGUNG DER TAQ POLYMERASE

Eine Mutante dieses Enzyms ohne Exonukleaseaktivität wurde rekombinant in E. coli XL-1 Blue exprimiert (E. Beck nicht veröffentlichte Daten).

Reinigungsvorschrift:

1 Liter LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin /50mg/ml Ampicillin) wurde mit 100 ml einer Übernachtskultur des E. coli Stammes inokuliert und bei 37°C 1 bis 2 Stunden geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 1,8 erreicht war. IPTG in der Endkonzentration von 1 mM wurde hinzugefügt, um eine Überexpression zu induzieren. Unter starkem

Schütteln wurde die Kultur 4 bis 5 Stunden induziert und dann 20 Minuten/ 4°C bei 10.000 U/min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei -20°C eingefroren. Bei sofortiger Weiterverarbeitung erübrigt sich das Einfrieren. Das Pellet wird in 15 ml TMN Puffer resuspendiert und mit 8 ml Lysozym (10g/ml) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 20 – 25 °C wurden 200µl TritonX-100 und 200 ml von 10%igem Tween20 hinzugefügt und die Suspension gemischt. Die Suspension wurde bei 80°C im Wasserbad für 20 Minuten erhitzt und danach sofort 250 µl 100mM PMSF hinzugefügt, um eine Degradation des Proteins zu verhindern. Zur Scherung der DNA wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt und dann 15 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M NaCl hinzugegeben. Die in der Suspension enthaltene DNA wurde durch tropfenweise Zugabe von 500µl einer 5%igen Polyethyleniminlösung (PEI) gefällt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 10.000 x g zentrifugiert. Um eine vollständige Fällung zu gewährleisten, wurden 500 µl Aliquots des Überstandes mit 2,4,6 und 8 µl PEI versetzt, um die minimalste Menge, die eine Präzipitation hervorruft, zu ermitteln. Die ermittelte Menge wurde zum Überstand gegeben und dieser für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der 20-minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g wurde das 6-fache Volumen an KTA Puffer hinzugefügt. Überschüssiges PEI wurde mittels Reinigung über eine Säule mit BIOREX 70 - equilibriert mit KTA Puffer und 30 mM Ammoniumsulfat- entfernt. Daran schloss sich ein weiterer Reinigungsschritt des Durchlaufs über eine Säule mit Heparin-Sepharose an, die ebenfalls mit KTA-Puffer und 30 mM Ammoniumsulfat equilibriert wurde. Als Säulen wurde Einwegmaterial (International Sorbent Technology, Hengoed, Mid Glamorgan UK) verwendet. Gewaschen wurde die Säule erst mit 50 ml KTA Puffer und 40 mM Ammoniumsulfat, dann mit 20 ml KTA Puffer, 40 mM Ammoniumsulfat in 50% Glycerin. Eluiert wurde die Taq Polymerase in 500 µl Aliquots mit KTA Puffer und 150 mM Ammoniumsulfat in 50% Glycerin. Zur Feststellung der Peakfraktionen wurden 5 µl Aliquots auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Enzym lässt sich bei -20 °C lagern.

2.2.4 KLONIERUNG

Schneiden von DNA

Die in Tabelle 4 zu den jeweiligen Enzymen aufgeführten Puffer wurden im Verhältnis 1:10 zum Endvolumen des Ansatzes eingesetzt. Die Menge an Enzym wurde abhängig von der Menge an zu schneidender DNA nach den Angaben des Herstellers bemessen. Die Inkubationszeit für einen Restriktionsansatz betrug in Abhängigkeit von der Menge der DNA gewöhnlich zwischen einer und drei Stunden bei 37°C.

Ligation

Ligationen wurden immer über Nacht bei 12°C inkubiert. Der Ligasepuffer wurde immer im Verhältnis 1:2 zum Endvolumen des Ansatzes eingesetzt. Die Menge an T4-Ligase wurde nach den Angaben des Herstellers (siehe Tabelle 5) berechnet. Für eine Transformation musste der Ligaseansatz sehr gründlich mit der Silika-Methode gereinigt werden, um Salz und PEI zu entfernen.

Transformation von E. coli-Zellen durch Elektroporation

Vorbereiten von elektrokompetenten Zellen:

Transformiert wurden E. coli XL-1 Blue-Zellen, die zuvor gereinigt werden mussten. Dazu wurde eine 200 ml LB-Medium mit 5ml einer frischen Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Danach wurde die Kultur sofort auf Eis abgekühlt und bei 4°C bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde das Pellet in 400 µl eiskaltem Wasser und 10% Glycerin resuspendiert. 40 µl Aliquots werden bei -70°C gelagert.

Transformation:

Zu 40 µl auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen wurden 10 µl des mit der Silika-Methode gereinigten Ligaseansatzes gegeben und 1 Minute ebenfalls auf Eis inkubiert. Überführt in eine vorgekühlte Küvette, wurde der Ansatz mit 2500 V

elektroporiert. Sofort danach wurde 1 ml LB Medium dazugegeben, der Ansatz in ein Eppendorf Gefäß überführt und bei 37°C 1 Stunde inkubiert. 100 µl dieser Kultur wurden auf einer Agarplatte mit Antibiotikaselektion ausplattiert. Danach wurde die restliche Kultur zentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer Agarplatte ausplattiert.

Expression und Reinigung von His-tagged Proteinen

Die rekombinanten Proteine wurden in das pQE30 Vektorplasmid kloniert. Bei Integration in den Vektor wird eine 6-fache Histidin-Sequenz an den N-Terminus angehängt. Die Überexpression wird durch Zugabe von IPTG induziert, welches die Repression des T5-Promotors des Vektorplamids verhindert. Der Repressor wird vom pREP-Plasmid von E. coli XL-1 Blue exprimiert.

Eine Selektion ist möglich über Kanamycin Resistenz (pREP) und Ampicillin Resistenz (pQE30).

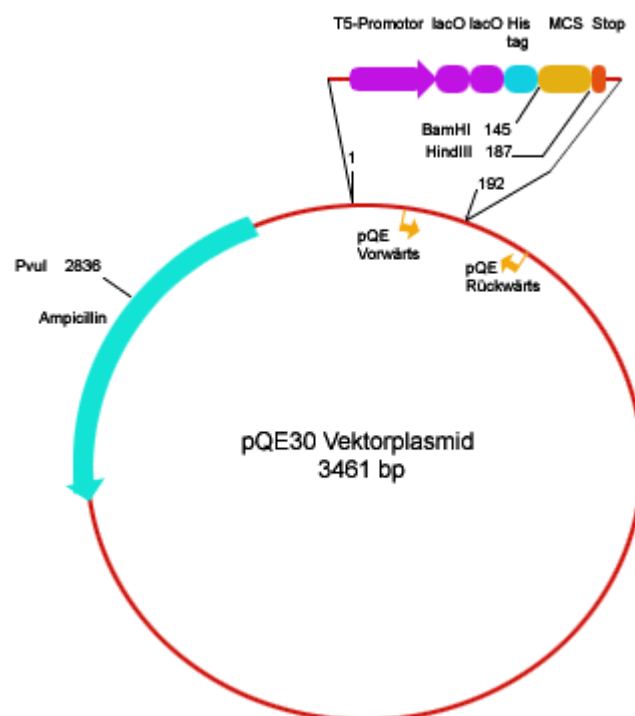


Abbildung 9. pQE30-Vektorplasmid mit multiple cloning site (MCS), Restriktionsschnittstellen, Ampicillinresistenzgen und Zielsequenzen der pQE-Vorwärts und –Rückwärts Primer.

E. coli XL-1 Blue-Zellen wurden mit dem pQE30-Vektor transformiert, welcher das gewünschte Gen enthält. Eine 250 ml Kultur wurde im Verhältnis 1:10 mit einer Übernachtskultur der transformierten Zellen angeimpft und bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,8–1,0 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1mM wurde die Expression induziert. Nach einer Inkubationszeit von 4–5 Stunden bei 37°C wurden die Zellen bei 10.000 x g zentrifugiert und bei –20°C über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Protein-Lyse-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Suspension bei 50°C für 10 Minuten erhitzt oder 2 x 30 Sekunden bei 50% Amplitude mit Ultraschall behandelt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die lysierten Zellen wurden bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, welches 1 ml einer in Protein-Wasch-Puffer equilibrierten TALON[®]-Suspension enthielt [Hochuli E. 1990]. Die Suspension wurde 1 Stunde auf einem rotierenden Rad gemischt und anschließend bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und die TALON[®]-Matrix mit 50 ml Protein-Wasch-Puffer durch Mischen und Zentrifugieren bei 3000 x g gewaschen. Dieser Vorgang wurde 2- bis 3-mal wiederholt. Die Matrix wurde im letzten Schritt in 4 ml Protein-Wasch-Puffer resuspendiert und auf eine Einwegsäule (International Sorbent Technology, Hengoed, Mid Glamorgan UK) geladen. Die beladene Säule wurde nochmals mit 5 ml Protein-Waschpuffer gewaschen und das Protein mit Protein-Elutionspuffer in 500 µl Aliquots eluiert. Die Peakfraktion des Proteins wurde durch Analyse von 10 µl Aliquots auf SDS PAGE bestimmt.

2.2.5 ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) wurde zur immunologischen Diagnose von viszeraler Leishmaniose durchgeführt. Für sämtliche Vorversuche, wie z.B. Überprüfung der Reaktivität der potentiellen Antigene und Bestimmung der Verdünnung, wurde ebenfalls der ELISA Test benutzt.

Für einen ELISA-Test wurde eine 96er Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Antigen verdünnt in Antigen-Verdünnungspuffer (CCB) beschichtet (ca. 50 ng/well), abgedeckt und über Nacht bei 4 - 8°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde sie mit 1 x TBST 3 mal gewaschen und danach sorgfältig von Waschflüssigkeit befreit. Geblockt wurde die Mikrotiterplatte mit 100 µl Blockpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde sie wiederum 3 mal mit ELISA- Waschlösung gewaschen, mit 2 µl Serum verdünnt in 100 µl Blockpuffer beschichtet und 1 Stunde inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit ELISA- Waschpuffer wurde die ELISA-Platte mit Anti-Human-IgG, konjugiert mit Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, Dianova, Hamburg, Germany) 1:2500 verdünnt, in Blockpuffer beschichtet und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die IgG-Lösung durch 3-maliges Waschen entfernt wurde, konnten 100 µl des Substrat-Reaktions-Puffers hinzugegeben werden. Die Reaktion zeigte sich in einer Blaufärbung der positiven Proben und wurde nach 15 Minuten mit 100 µl einer 1M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Daraufhin färbten sich die positiven Proben gelb und die Mikrotiterplatte wurde sofort im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Eine Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel 2000.

2.2.6 PCR-REAKTION

Die PCRs zur Klonierung und Synthese von potentiellen Antigenen mussten den Gegebenheiten angepasst werden, d.h. die Annealing-Temperaturen und die Anzahl der Zyklen sowie die Länge der einzelnen Schritte wurden in Abhängigkeit von der Länge der Oligonukleotide durchgeführt. Exemplarisch wird dies im Kapitel Ergebnisse dargestellt.

Allen PCRs gemeinsam war der verwendete Reaktionspuffer. Die PCRs zur Analyse der Klone nach einer Transformation wurde nach einer Standardmethode durchgeführt. Soweit möglich wurde als Vorwärtsprimer das erste Oligonukleotid aus der Synthese des Antigens verwendet. Als Rückwärtsprimer empfiehlt es sich einen Primer zu benutzen, der seine Zielsequenz im Plasmid hat. Hierfür wurde ein pQE30 Rückwärtsprimer verwendet.

Diagnostische PCRs wurden abweichend von den Standardbedingungen, angepasst an die Primerbedingungen, durchgeführt.

10 µl Standard-PCR-Reaktion

1 µl Taq Puffer
 1 µl dNTP-Mischung (jedes 2,5 mM)
 0,5 µl 10 µM Vorwärtsprimer
 0,5 µl 10 µM Rückwärtsprimer
 1 µl Template- DNA
 0,2 µl Taq DNA Polymerase (ca. 5 U/µl)

5,8 µl destilliertes Wasser

10 µl

Standardbedingungen für eine PCR

2 Minuten bei 94 °C Denaturierungsschritt
 35 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94 °C
 1 Minute bei 60 °C
 1 Minute bei 72 °C
 5 Minuten bei 72 °C um die DNA-Enden
 komplett aufzufüllen.

2.2.7 GELELEKTROPHORESE

DNA-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden auf horizontalen Agarosegelen durchgeführt [Sambrook et al. 1989]. Dabei wurde, je nach Größe des Fragments, ein 1 bis 2%iges Gel hergestellt, die Proben mit Probenpuffer aufgetragen und die Fragmente in Agarose-Elektrophoresepuffer (TE) nach Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Der Probenpuffer mit den Farbstoffen Bromphenol-Blau und Xylene-Cyanol-Blau dient hierbei der Orientierung über die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente im Gel. Bromphenol-Blau bewegt sich auf der Höhe eines 200bp DNA Fragments, Xylen-Cyanol-Blau auf der Höhe eines 300bp Fragments. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (0,1–0,5 µg/ml) für 20 Minuten angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht, ggf. mit einer Polaroidkamera oder einer Digitalkamera mit Gelbfilter fotografiert.

DNA-Fragmente unter 200bp wurden über ein 6%iges Acrylamidgel in Acrylamidgel-Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

Präparative Gele für Fragmente zur Klonierung wurden auf vertikalen Gelen aufgetrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gewinnung von DNA aus Agarosegelen ist ausführlich unter 2.2.2 beschrieben worden.

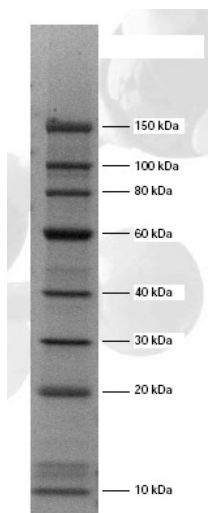
Proteingelelektrophorese

Proteine wurden zur Analyse ihrer Größe und zur Bestimmung der Ausbeute auf Polyacrylamid/SDS-Gelen mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese in Laemmli-Puffer aufgetrennt. Bei dieser Methode wurden 6%ige Sammelgele und Trenngele mit Konzentrationen von 12 – 15 % Acrylamid, je nach zu erwartender Proteingröße, angefertigt.

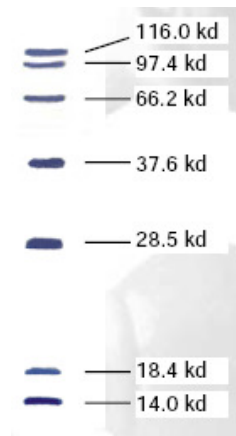
	Sammelgel	Trenngel	
	6%	12%	15%
40% Acrylamid/ 1,3%	1,5 ml	5,0 ml	6,0 ml
Bisacrylamidlösung			
Trenn- oder	2,5 ml	4,0 ml	4,0 ml
Sammelgelpuffer (4 x)			
Destilliertes Wasser	6,0 ml	7,0 ml	6,0 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	10 µg	10 µg	10 µg
TEMED	15 µl	20 µl	20µl
	10 ml	16 ml	16 ml

Protein-Größenmarker:

AppliChem 10 –180 kD



14 – 116 kD



DNA-Größenmarker:

2.2.8 PATIENTENSEREN

Viszerale Leishmaniose:

Jemenitische Patientensereren wurden von Herrn Abdulatif Ali in verschiedenen Krankenhäusern in der Republik Jemen gesammelt. Sie wurden 1:1 in einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung verdünnt.

Spanische Patientensereren wurden von der Parasitologischen Fakultät an der Universität in Barcelona zur Verfügung gestellt.

Kutane Leishmaniose:

Jemenitische Patientensereren wurden von Herrn Abdulatif Ali in jemenitischen Krankenhäusern gesammelt.

Patientensereren aus Panama wurden von einem diagnostischen Labor in David/Panama zur Verfügung gestellt.

Chagas-Krankheit:

Patientensereren mit der Chagas-Krankheit wurden von einem diagnostischen Labor in Chochabamba in Bolivien zur Verfügung gestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. AUSWAHL VON ANTIGENEN

Aus Gründen der höheren Spezifität und Sensitivität ist der ELISA mit rekombinanten Antigenen die vielversprechendste Lösung für eine akkurate Immundiagnose von viszeraler Leishmaniose (Tabelle 2). Die Kreuzreaktionen, die durch die Verwendung von Rohextrakten aus pro- oder amastigoten Leishmanien zu erwarten sind und auch schon festgestellt wurden [Porrozzi R. et al. 2007; Rosario E.Y et al. 2005; Malchiodi E.L. et al. 1994; Mohammed E.A.R. et al. 1985; Mettler et al. 2005], können durch die systematische und sorgfältige Auswahl der Antigene vermieden werden.

Neben einigen antigenen Polypeptiden, die bereits beschrieben sind, teilweise gute Ergebnisse im ELISA zeigen, jedoch verschiedenen Limitierungen unterworfen sind, erschien es sinnvoll nach neuen, immunreaktiven Proteinen zu suchen. Um dies systematisch zu tun, sollten Gemeinsamkeiten potentieller Antigene als Kriterien für eine Suche festgelegt werden. Als besonders immundominant bei *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma cruzi* haben sich Antigene erwiesen, bei denen die Epitope tandemartig wiederholt angeordnet sind. Diese „Tandem Repeats“ finden sich in großer Zahl bei *Trypanosomatiden* und *Plasmodien* [Frasch A.C.C. 1991; Anders R.F. et al. 1986; Corradine G. et al. 2007; Nardin et al. 1992], wobei nicht alle eine starke Immunantwort im Menschen auslösen. Auch bei *Leishmania* findet sich eine große Anzahl an repetitiven Aminosäuresequenzen in Proteinen [Wickstead B. et al. 2003; Goto Y. et al. 2006 und 2007]. Diese repetitive Anordnung von Epitopen scheint eine vielfach höhere B-Zell Immunantwort zu stimulieren als das einzelne Epitop [Fehr T. et al. 1997; Liew et al. 1990; Baschong W. et al. 2003; Ronet et al. 2008].

Viele Sequenzinformationen, besonders von pathogenen Organismen, sind mittlerweile im WorldWideWeb verfügbar und nutzbar. Die Sequenzierung der gesamten genetischen Information von *L. major* durch den SANGER WELCOME TRUST ist inzwischen abgeschlossen, die von *L. infantum* nahezu. Die daraus entstandene Datenbank (<http://www.genedb.org>) [Herz-Fowler et al. 2004],

ermöglicht es auf Gen- oder Aminosäuresequenzen von *L. major* und *L. infantum* geordnet nach Chromosomen zuzugreifen. Mit Hilfe geeigneter Software, wie dem „Tandem Repeats Finder“ (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) [Benson G. 1999] auf DNA-Ebene oder durch farbliche Markierung einzelner Aminosäuren innerhalb der Sequenzen, lassen sich Wiederholungsmuster leicht erkennen und ganze Genome können systematisch nach diesen Mustern durchsucht werden. Als besonders interessant sind hier möglichst lange Aminosäuresequenzen anzusehen, die in hoher Frequenz wiederholt werden. Eine hohe Anzahl von Kopien erhöht die Wahrscheinlichkeit einer starken Immunantwort auf dieses potentielle Antigen.

```
>gi|146086877|ref|XP_001465669.1| hypothetical protein,
unknown function [Leishmania infantum JPCM5] (Linf27)

MSPKPTLSPPPFLRRHPVGTTRRGRQVRNGRLIADVEMPLLTSCAVVSLLLVCVLWRMEDGVELCAVGLVS
CFGCRALRMAMRLSLFSLHAFVLVRAHCPLAYTLLFVAGGLVLHACALLYLSLSLGMRALRSSCPAFPC
WQASPSTTPLLREISRNEPPSAKNERNNDYSSMKPSKRAANLDSRGATSADHSTASSHTEAVPPLTVDT
LTVPLVHAECAPTTAPLSPGNLTPTLAECASEAARRPTEAAPVSAVEALPPTPAECASDAAPQKIKMTA
RKRHATASLHRKRERDGDSSSLWPLHTRRALDPSANTAAPLLSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQP
SEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTP
AECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAP
VSAVEALPPTPAECASDAVPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEDSAPQPSMVSRMFAGNAAPR
MYFAPHHREEGGPVMAMRPPSGSCRVDASRAAARLAAVFGGLPTLEVSPPSRCPKVVLPASQHVQPASKA
APVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASDAVPQPSEAAPVSAVEALPPTPAEC
ASEAAPQPSEAAPQPSMVSRMFAGNAAPRMYFAPHHREEGGPVMAMRPPSGSCRVDASRAAARLAAVFGG
LPTLEVSPPSRCPKVVLPASQHVQPASKAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSLSHTRPPTPV
ECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSLSHTRPPTPAECASDAAADPSDSAPV
SAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSLSHTRPPTPVECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASE
AAPQPSEAAPVSLSHTRPPTPAECASDAAPQPSEEAQRDETAPLRRKRPRDDASDSSFWRRRRFRSRL
DREPPTAPPVTLPRNTRRAPRASAHTAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEAL
PPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASDAVPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPS
EAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASDAVPQPSEAAPVSAVEALPPTPA
ECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASDAVPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPV
SAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASD
AVPQPSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAAPQPSEAAPVSAVYASCCRCRRSAWNLACDRWGASRRRCVLG
RVKTSQRSNCRGGGARPSVSVRSRVINGWQSVLGVIRRWNKGFVDRRDIVCSARVSEPAAPQPSEA
AAKLDATASLRRKRPRDDASDSSFWRRRRFRSRLDREPPTAPPVTLPRNTRRAPRASAHTAAPQPSEAA
PVSAVYASCCRCRSLWDLACDRIGARRRRCVLRVKTSQRPKRRVVGPSAPAAASRSLNGGWHALVRM
LRRWYRSALCVGHRLICRRSRTSARDAAPQVSEVSTLRGQNALPADVPQAPRVVSDAGTTSPLVCAHCIA
```

Abbildung 10. Aminosäuresequenz eines hypothetischen Proteins aus dem Chromosom 22 von *L. infantum* bezeichnet als Linf27 mit typischem farbig hervorgehobenem tandemartigem Wiederholungsmuster.

Dadurch, dass die repetitiven Elemente in Aminosäuresequenzen bei *Trypanosomatiden* allgemein vorkommen, besteht immer die Möglichkeit einer Kreuzreaktion von Leishmania-Antigenen mit *Trypanosoma cruzi* oder von *Leishmania-infantum*-spezifischen Antigenen (viscerale Leishmaniose) mit *Leishmania major* (kutane Leishmaniose). Um diese Möglichkeit zu minimieren, können Sequenzvergleiche, mit der zur Sanger-Datenbank gehörenden BLAST-Funktion (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/l_major) oder anderer Sequenzvergleichssoftware (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) durchgeführt werden. Die Suche nach geeigneten potentiellen Antigenen kann durch dieses Verfahren sehr viel schneller und somit effektiver durchgeführt werden.

3.2 KLONIERUNG VON POTENTIELLEN ANTIGENEN FÜR ELISA

Die Nukleotidsequenzen der mittels des beschriebenen Verfahrens ausgewählten potentiellen Antigene wurden aus Oligonukleotiden synthetisch hergestellt, in den pQE30 Vektor kloniert und in *E. coli* XL-1 Blue exprimiert. Die DNA-Sequenz wurde durch die Variation der Tripletts, die für die jeweilige Aminosäure zu Verfügung stehen und durch die Verwendung von Tripletts die *E. coli* bevorzugt, optimiert (Abbildung 11). Dies ist notwendig, um den Verlust der sich wiederholenden Information durch Reparaturmechanismen bzw. homologe Rekombination in *E. coli* zu vermeiden [Robinson et al. 1990].

Die Aufteilung in Oligonukleotide mit überlappenden Enden und annähernd gleicher Annealingtemperatur und die Limitierung der sich wiederholenden Codons für eine Aminosäure wurde durch das Computerprogramm DNAWorks 2.4 (<http://mcl1.ncifcrf.gov/dnaworks/dnaworks2.html>) [Hoover et al. 2002] berechnet. DNAWorks 2.4 erlaubt es außerdem die für die Klonierung benötigten Restriktionssequenzen einzubeziehen und unerwünschte Restriktionssequenzen auszusparen. Um das Verfahren der Klonierung zu vereinheitlichen, wurden am Beginn jeder Sequenz die Restriktionssequenz für BamHI und am Ende HindIII eingefügt. Das Zusammensetzen der Nukleotidsequenzen erfolgte über die Oligonucleotide-Assembly-Methode per PCR [Gao X. et al. 2003; Xiong A. et al. 2004] oder durch direkte Ligation der Oligonukleotide nach Phosphorylierung der Oligonukleotide am 5'-Ende mittels Polynukleotidkinase (PNK).

TTT F 0.58	TCT S 0.17	TAT Y 0.59	TGT C 0.46
TTC F 0.42	TCC S 0.15	TAC Y 0.41	TGC C 0.54
TTA L 0.14	TCA S 0.15	TAA X 0.60	TGA X 0.31
TTG L 0.13	TCG S 0.13	TAG X 0.08	TGG W 1.00
CTT L 0.12	CCT P 0.18	CAT H 0.58	CGT R 0.36
CTC L 0.10	CCC P 0.13	CAC H 0.42	CGC R 0.35
CTA L 0.04	CCA P 0.21	CAA Q 0.34	CGA R 0.07
CTG L 0.47	CCG P 0.49	CAG Q 0.66	CGG R 0.11
ATT I 0.49	ACT T 0.19	AAT N 0.50	AGT S 0.16
ATC I 0.39	ACC T 0.39	AAC N 0.50	AGC S 0.24
ATA I 0.12	ACA T 0.17	AAA K 0.74	AGA R 0.07
ATG M 1.00	ACG T 0.25	AAG K 0.26	AGG R 0.04
GTT V 0.29	GCT A 0.19	GAT D 0.63	GGT G 0.35
GTC V 0.20	GCC A 0.26	GAC D 0.37	GGC G 0.36
GTA V 0.17	GCA A 0.23	GAA E 0.67	GGA G 0.13
GTG V 0.34	GCG A 0.32	GAG E 0.33	GGG G 0.16

Abbildung 11. Codon-Tabelle von *E. coli*. Hinter dem Triplet sind die prozentualen Häufigkeiten der Verwendung in Dezimalzahlen angegeben. Die selten benutzten Codons sind farbig hervorgehoben.

3.2.1 OLIGONUKLEOTID-ASSEMBLY

Die durch DNAWorks 2.4 optimierten Oligonukleotide wurden entsprechend ihrer Annealingtemperatur in ein PCR-Gefäß gegeben, welches schon Taq-Polymerase – Puffer und dNTP's enthielt. Die äußeren Oligonukleotide wurden in höherer Konzentration eingesetzt als die inneren, um zu gewährleisten, dass nach der Zusammenlagerung der entsprechenden überlappenden Enden genug äußere Oligonukleotide als Primer für eine Amplifikation der Nukleotidsequenz zu Verfügung stehen. Die Taq Polymerase wurde nach der „assembly“-Phase hinzugegeben und die Amplifikation in Form einer „hot-start“-PCR gestartet. Lange Nukleotidsequenzen für repetitive Antigene bergen das Risiko, dass sich bei der Aufteilung in Oligonukleotide Wiederholungen in der Sequenz nicht ausschließen lassen. Die Folge wäre eine Zusammenlagerung der falschen Oligonukleotide (Mispriming). Um diesem Umstand zu begegnen, wurden längere Sequenzen in zwei voneinander getrennten PCR-Reaktionen synthetisiert, um sie in einer dritten zu einer großen Sequenz zusammenzufügen. Amplifikation und Auffüllen der Lücken zwischen den überlappenden Enden der Oligonukleotide wurden hier also durch den Einsatz der Taq Polymerase erreicht.

3.2.2 PNK-METHODE

Von den durch DNAWorks 2.4 optimierten Oligonukleotiden wurden die inneren mit Polynukleotidkinase (PNK) in 2x Ligasepuffer bei 37 °C für 30 Minuten phosphoryliert.

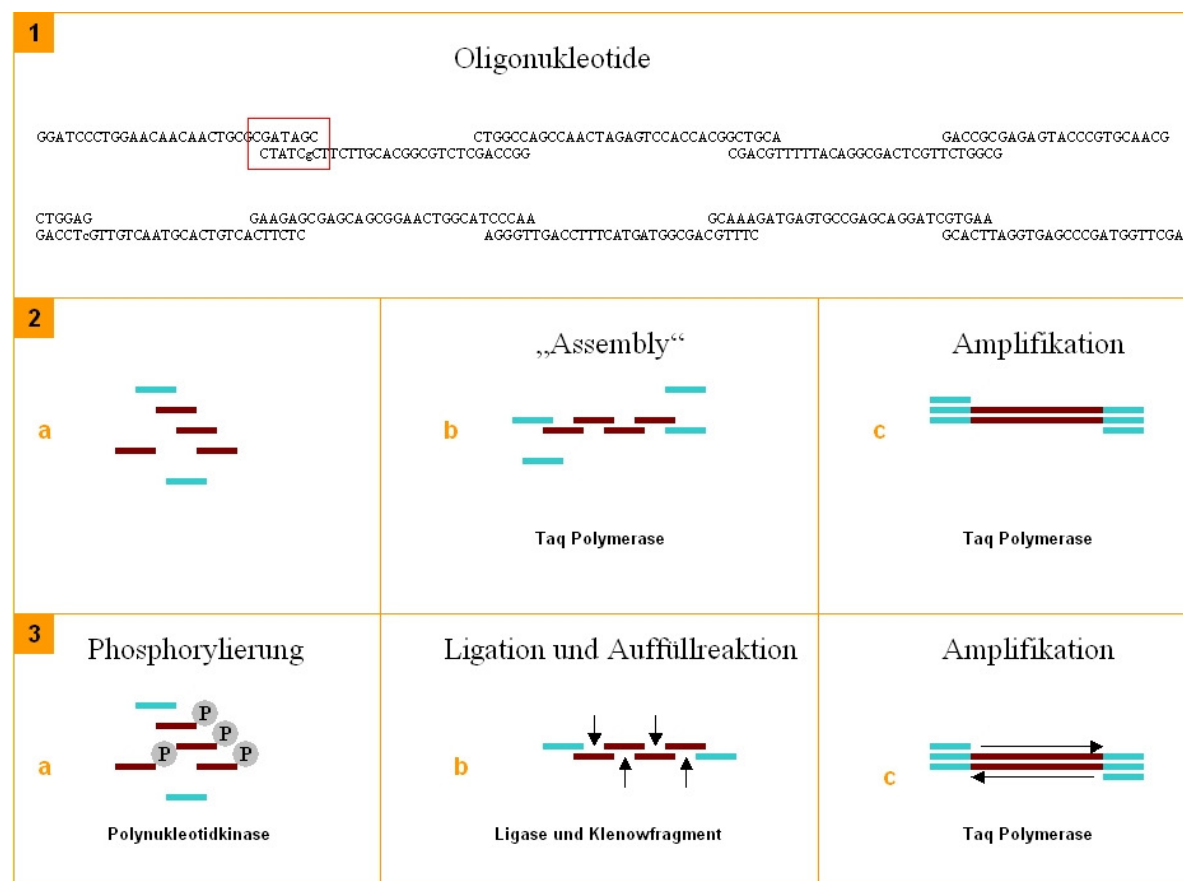


Abbildung 12. Schematische Darstellung verschiedener Synthesewege einer Nucleotidsequenz für ein mögliches Antigen. **1.** Oligonukleotidsequenzen mit überlappenden Enden (rotes Rechteck). **2.** „Assembly Methode“ **a.** Oligonukleotide (äußere Oligonukleotide farbig) **b.** Zusammenlagerung der Oligonukleotide im Thermocycler. Die äußeren Oligonukleotide sind in höherer Konzentration vorhanden und dienen in der **c.** Amplifikation als Primer. **3.** Ligation- und Auffüllmethode **a.** Phosphorylierte Oligonukleotide (äußere Oligonukleotide nicht Phosphoryliert) **b.** Ligation und Auffüllreaktion **c.** Amplifikation.

Die Polynukleotidkinase wurde bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert und der Ansatz mit den unphosphorylierten äußeren Oligonukleotiden kombiniert. Für die Annealingreaktion wurde der Ansatz im Thermocycler auf 94 °C erhitzt und dann langsam auf die Annealingtemperatur der Oligonukleotide heruntergekühlt. Die

Lücken zwischen überlappenden Enden wurden durch Zugabe von Klenowfragment und Auffüllreaktionspuffer bei Raumtemperatur aufgefüllt und über Guanidinium/SiO₂ gereinigt. Das entstandene Nukleotidfragment wurde durch PCR mit den äußeren Oligonukleotiden als Primer amplifiziert.

In beiden Fällen wurden die Restriktionsschnittstellen zur Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten.

3.2.3 SYNTHETISCHE ANTIGENE

Die Antigene, die der Literatur entnommen wurden, werden hier kurz vorgestellt. Informationen über die anderen, durch die Suche in den genannten Datenbanken gefundenen potentiellen Antigene sind Tabelle 6 zu entnehmen.

K39

K39 ist ein Kinesin-verwandtes Protein, welches in Amastigoten von *Leishmania chagasi* gefunden wurde. Es besteht aus 298 Aminosäuren und darin enthalten eine sich sechs Mal wiederholende Sequenz aus 39 Aminosäuren.

Hohe Antikörpertiter gegen K39 wurden bei südamerikanischen und afrikanischen Patienten mit viszeraler Leishmaniose gefunden. Patienten mit kutaner und mukokutaner Leishmaniose induzieren keine Immunantwort. Aufgrund dieser Eigenschaft ist eine Eignung als Antigen für einen ELISA zur Diskriminierung zwischen kutaner und viszeraler Leishmaniose zu erwarten. Tatsächlich ist eine abfallende Sensitivität durch Sequenzunterschiede in den verschiedenen *Leishmania*-Stämmen bei europäischen und afrikanischen Patienten gegenüber Patienten aus Asien und Südamerika festzustellen. Trotzdem ist dieses Protein als Ausgangsbasis für die Entwicklung eines immunologischen Tests die erste Wahl, da es als einziges, bisher entdecktes Antigen gute bis sehr gute Ergebnisse mit Seren von viszerale Leishmaniose zeigt [Burns, J.M. et al., 1993; Rosati S. et al. 2003].

Antigen	Aminosäuresequenz	Wdh.	Kommentar	Homologien
rk39	LEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRAT	50	Kinesin-verwandtes Protein	Ähnliche Sequenz in <i>Leishmania major</i>
A2	GPL(S/A)VGPQSV	37	Hyp. Protein aus <i>Leishmania infantum</i> Chr. 22	Nur in <i>Leishmania infantum</i>
Linf22	PRLHLLPFVLSPPYIFVFPTRGSSSTSLPRCVWWWFASLV DSCSCRLVSNCFESEQACVLRARLPWLLSLLRRLVADT SFR RLYLSFLR	37	Hyp. Protein aus <i>Leishmania infantum</i> Chr. 22	Nur <i>Leishmania infantum</i>
Linf27	SEAAPVSAVEALPPTPAECASDAVPQP	109	Hyp. Protein aus <i>Leishmania infantum</i> Chr. 22	Ähnliche Sequenz in <i>Leishmania major</i>
Linf0809	QARRE(A/V)EE QQRLVTATQQRAELEAQVARLAADRDEAREQLAANAEEEL	33 bzw 31	Fusion aus Linf033 und K39 Variante	
Linf35	QQAGDAKEPASRDAVLERSMGTPVDETQRALESAL	60		
Linf13	VHNTQTKMYIDVN	45	Hyp. Protein aus <i>Leishmania infantum</i> Chr. 22	Nur <i>Leishmania infantum</i>
Leishkin	TEETLQETSAKLAD	152	<i>Leishmania</i> Kinesin Chr. 16	Identische Sequenz in <i>Leishmania major</i> und <i>infantum</i>
LinfRA	KPEGVPLRCVPLDEDAEFVALEDEWRGLLQDPQRNSMPL KDLERRMNDRAHDLA CDKKWADRDRVLDP	40	<i>Leishmania infantum</i> Flagellar Repetitive Antigen	Ähnliche Sequenz in <i>Leishmania major</i> und <i>Trypanosoma cruzi</i>

Tabelle 6. Aufstellung aller potentiellen Antigene nach Durchsuchen der Gendatenbank nach oben genanntem Muster.

A2

A2-Proteine werden im amastigoten Stadium exprimiert und kommen in *Leishmania donovani*, nicht aber in *Leishmania major* vor. A2-Gene, die in das *Leishmania major* Genom eingeführt wurden, führten zu einem viszeralem Krankheitsverlauf (Splenomegalie) bei infizierten BALB/c Mäusen. Diese Eigenschaften des A2-

Genclusters führten zu der Vermutung, dass A2 zur Viszeralisierung von *Leishmania donovani* beiträgt. Antikörper gegen A2-Proteine wurden in einer hohen Zahl bei Patienten, die an viszeraler Leishmaniose leiden, festgestellt [Ghedini et al., 1997]. Somit sollten A2-Proteine auch zur Differenzierung zwischen kutaner und viszeraler Leishmaniose geeignet sein. Eine genauere funktionelle Charakterisierung des A2-Proteins ist noch nicht erfolgt.

Die Proteine der A2-Familie bestehen im Wesentlichen aus einer sich bis zu 37 mal tandemartig wiederholenden Sequenz von 10 Aminosäuren und kommen im Zytosol vor [Zhang und Matlashewski, 2001].

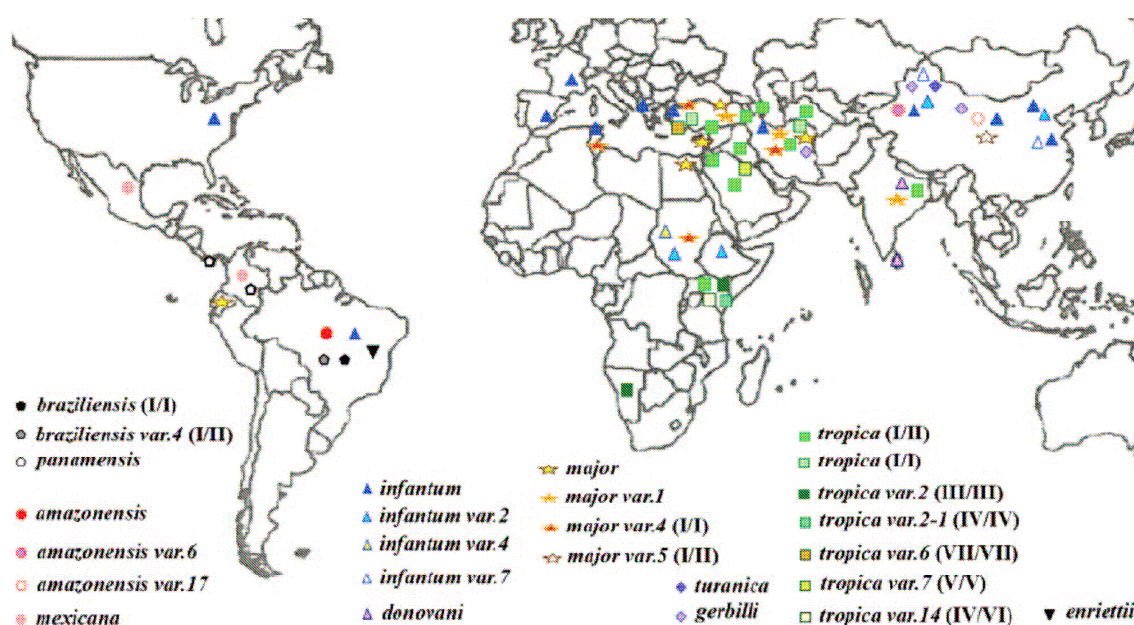


Abbildung 13. Globale Verteilung der *Leishmania*-Arten und deren Varianten. (Waki et al. 2007)

3.2.4 KONSTRUKTIONEN

Das Ziel, die viszerale Leishmaniose möglichst umfassend diagnostizieren zu können, erfordert die Einbeziehung der verschiedenen *Leishmania*-Arten und Varianten die diese Krankheit auslösen. Die oben dargestellten Proteine und ihre charakteristischen Aminosäuresequenzen unterscheiden sich von Art zu Art durch einzelne oder auch mehrere Aminosäuren .

Antigenbezeichnung	Konstruktionen
rK39	<p>STRATLEQQLRDSEERAELASQLESTTAAKMSAEQDRENRATLE</p> <p>QQLRDSEERAELASQLEATAAAKMSAEQDRENTRAALEQQLRDSEE</p> <p>RAAELASQLESTTAAKMSAEQDRE</p>
Linf27	<p>SAVEALPPTPAECAYDGAQPQSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAA</p> <p>QPQSEAAPASAVEALPPTPAECASDAVPQSEAAPVSAVEALPPTPAECASEAA</p> <p>QPQSEAA</p>
A2	<p>PQAVGPLSVGPQSVGPLSV</p> <p>GPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVG</p>
Linf0809	<p>QARREAEQARRVAEEQARREAEQARREAEQARRVAEEPLGPGSP</p> <p>QQRLVTATQQRAELEAQVARLAADRDEAREQLAANAEEEL</p> <p>QQRLVTAAGGRAELEAQVARLAADRDEAREQLAANAEEEL</p> <p>QQRLVTATQQRAELEAQVARLAADRDEAREQLAANAEEEL</p>
Linf13	<p>VHNTQTKMYIDVN</p> <p>VHNTQTKMYIDVNVHSTQTKMYIDVNVHNTQTKMYIDVS</p>
Linf22	<p>PRLHLLPFVLSPPYIFVFPTRGSSSTSLPRCVWWWFASLV DSCSCRLVSNCFE</p> <p>SQACVLARLPWLLSLLRRLVADT SFR RLYLSFLR</p> <p>PRLHLLPFVLSPPYIFVFPTRGSSSTSLPRCVWWWFASLV DSCSCRLVSNCFE</p> <p>SQACVLARLPWLLSLLRRLVADT SFR RLYLSFLR</p>
Leishkin	<p>TEETLQETSAKLAD TEETLQETSAKLAD TEETLQETSAKLAD TEETLQETSAKLAD</p> <p>TEETLQETSAKLAD</p>

Tabelle 7. Aufstellung der zur Klonierung geeigneten potentiellen Antigene mit den maximal möglichen Wiederholungsraten und Variationen der Aminosäuresequenzen

Um auch diese Variationen zu erfassen wurden die Aminosäuresequenzen in unterschiedlichen Kombinationen synthetisiert und im ELISA ausprobiert. Manchmal waren für eine Modifikation der Aminosäuresequenz nicht die verschiedenen in Genbanken verfügbaren Varianten ausschlaggebend, sondern eine mangelnde Reaktivität im ELISA. In jedem Fall war es nicht möglich, die natürlich vorkommende Wiederholungsfrequenz auch synthetisch herzustellen. Ein Maximum von sich

wiederholenden Mustern wurde durch die für eine Aminosäure verfügbaren Codons vorgegeben. Eine zu hohe Anzahl sich wiederholender Codons würde vom *E. coli* Reparatursystem nicht toleriert werden.

Aufgrund der in den Datenbanken zugänglichen Sequenzdaten wurden überwiegend Proteine in *Leishmania infantum* gefunden, die das Krankheitsbild einer viszeralen Leishmaniose verursachen. Homologien von *Leishmania infantum* zu *Leishmania donovani* (viszerale Leishmaniose der Alten Welt) und *Leishmania chagasi* (viszerale Leishmaniose der Neuen Welt) sind jedoch sehr wahrscheinlich.

3.2.5 BEISPIEL EINER GEN-SYNTHESE ANHAND VON LINF27

Oligonukleotide:

Linf27-1	ATAAGATCT CCGGCGTCTGCAGTTGAGGCTCTGCCGCCAACTCCGGCGGAGTGCGCT	(57 nt)
Linf27-2	GGAAACAGGCGCTGCCTCGGAAGGTTGCCGCGCACCGTCGTAAGCGCACTCCGCCG	(56 nt)
Linf27-3	GGCAGCGCCTGTTTCCGCGGTGGAAGCTCTCCCTCCGACTCCTGCAGAGTGTGCCT	(56 nt)
Linf27-4	TCGCTGGTGCGGCCTCAGATGGCTGAGGAGCAGCTTCAGAGGCACACTCTGCAGGA	(56 nt)
Linf27-5	GGCCGCACCAGCGAGCGCGGTGGAAGCACTGCCACCTACTCCAGCCGAATGTGCGT	(56 nt)
Linf27-6	ACACCGGGGCTGCTTCGCTCGGTTGTGGAACCGCGTCGGACGCACATTGGGCTGGA	(56 nt)
Linf27-7	GAAGCAGCCCCGGTGTCTGCGGTTGAAGCGCTCCCGCCTACCCCTGCTGAATGCGC	(56 nt)
Linf27-8	ATAAAGCTT CGCGGCTTCGGACGGCTGCGGTGCCGCCTCGCTTGCGCATTACAGCAGGGG	(59 nt)

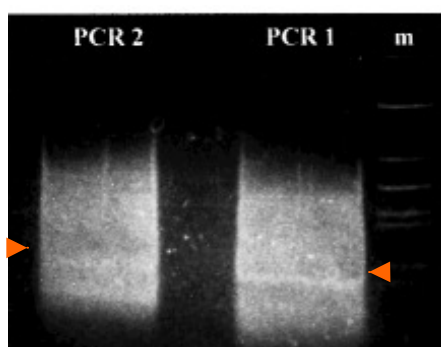
Erste und Zweite PCR

In diesem Fall ist eine Aufteilung in zwei Ansätze ratsam, da es sich um ein sehr langes Fragment von 334 Nukleotiden handelt. In der ersten PCR wird das Fragment Nr.1 aus den Oligonukleotiden Linf27-1 bis Linf27-4 (175bp) mittels der „Assembly“ Methode (siehe 3.2.1) synthetisiert. In der zweiten PCR wird aus den Oligonukleotiden Linf27-5 bis Linf27-8 (173bp) das Fragment Nr.2 synthetisiert.

Die PCR-Ansätze wurden im Biometra Thermocycler bei 94°C für 2 Minuten inkubiert und 0,6 µl Taq Polymerase (3 Units) hinzugefügt. Darauf folgten 3 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94°C und 30 Sekunden 60°C sowie 30 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94°C und 30 Sekunden 72°C für die Amplifikation. Zum Abschluss wurden die Ansätze noch 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

PCR2

3,0 µl 10 µM Linf27-5
 3,0 µl 10 µM Linf27-8
 0,5 µl 10 µM Linf27-6
 0,5 µl 10 µM Linf27-7
 3,0 µl 10 x Taq-Puffer
 3,0 µl dNTPs (2,5mM)
17 µl Wasser
 30 µl



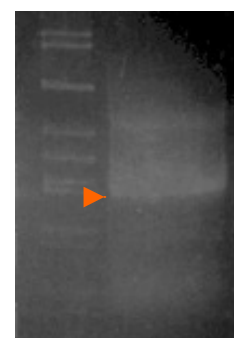
PCR1

3,0 µl 10 µM Linf27-1
 3,0 µl 10 µM Linf27-4
 0,5 µl 10 µM Linf27-6
 0,5 µl 10 µM Linf27-7
 3,0 µl 10 x Taq-Puffer
 3,0 µl dNTPs (2,5mM)
17 µl Wasser
 30 µl

Die Produkte aus den Ansätzen Nr.1 und 2 wurden über ein 2%iges Agarosegel gereinigt, die korrekten Banden ausgeschnitten mit NaI/SiO₂ eluiert, in 10 µl TE Puffer aufgenommen und in einer dritten PCR zu einem großen Fragment zusammengeführt.

PCR 3

3,0 µl 10 µM Linf27-1
 3,0 µl 10 µM Linf27-8
 1,0 µl eluiertes Fragment aus PCR NR. 1
 1,0 µl eluiertes Fragment aus PCR NR. 2
 3,0 µl 10 x Taq Puffer
 3,0 µl dNTPs (2,5mM)
16 µl Wasser
 30 µl



Die PCR-Ansätze wurden im Biometra Thermocycler bei 94 °C für 2 Minuten inkubiert und 1,0 µl Taq Polymerase (5 Units) hinzugefügt. Darauf folgten 4 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94 °C und 1 Minute bei 60 °C sowie 30 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94 °C und 1 Minute 72 °C für die Amplifikation. Zum Abschluss wurden die Ansätze noch mal 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Die verlängerten Inkubationszeiten bei 60 °C und 72 °C sind auf das nun längere Fragment zurückzuführen. Das entstandene Fragment (335bp) wurde wiederum über ein 2%iges Agarosegel gereinigt, mit NaI/SiO₂ eluiert und in TE-Puffer aufgenommen.

Restriktionsverdau des Linf27-Gesamtfragments

25 µl Linf27 Gesamtfragment
6,0 µl NEB2 Puffer
6,0 µl BSA (5mg/ml)
3,0 µl HindIII
3,0 µl BglII
17 µl Wasser
60 µl

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, dann mit Guanidinium/SiO₂ gereinigt und in 10 µl TE Puffer aufgenommen.

Ligation in das pQE-30 Vektorplasmid

Das Linf27-Fragment wurde aufgrund einer ursprünglich anderen Klonierungsstrategie am N-Terminus mit einem BglII-Schnitt synthetisiert. Wenn man nun, wie in diesem Klonierungsbeispiel einen BglII-Schnitt auf einen BamHI-Schnitt ligiert, kann das entstehende Plasmid an dieser Stelle nicht mehr durch die Restriktionsenzyme BamHI und BglII geschnitten werden.

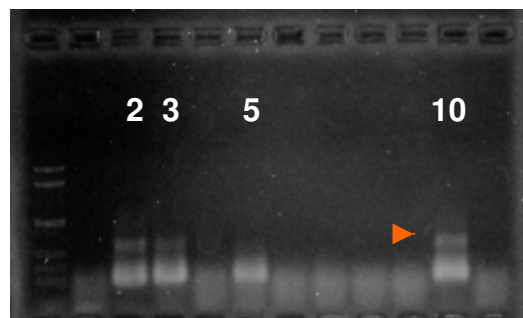
0,5 µl pQE-30 geschnitten mit BamHI/HindIII/KpnI
2,0 µl Linf27-Fragment
5,0 µl 2 x Ligasepuffer
2,2 µl Wasser
0,3 µl T4 Ligase
10 µl

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden inkubiert, mit Guanidinium/SiO₂ gereinigt und in 20 µl Wasser aufgenommen, um bei der anschließenden Transformation von *E. coli* XL-1 Blue/pREP-Zellen durch Elektroporation den Salzgehalt so gering wie möglich zu halten.

Analyse der transformierten Kolonien

Nach der Transformation von *E. coli* XL-1 Blue mit dem Linf27/pQE30pREP-Plasmid wurden die Zellen auf Standard 1 Agar mit Selektion auf Ampicillin (pQE30)/Kanamycin (pREP) plattiert. Die auf den über Nacht bei 37°C inkubierten Platten gewachsenen Kolonien wurden einzeln in 50 µl Wasser aufgenommen und im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Das Zellmaterial wurde bei 13.000 rpm pelletiert und mit 2 µl des Überstandes eine PCR durchgeführt, um die Aufnahme des Plasmids mit dem Fragment zu überprüfen.

1,0 µl dNTPs (2,5 mM)
 1,0 µl 10 x Taq Puffer
 0,5 µl pQE30 Vorwärtsprimer
 0,5 µl Linf27-8 als Rückwärtsprimer
 0,2 µl Taq Polymerase (1 Unit)
 2,0 µl Template DNA (Überstand)
4,8 µl Wasser
 10 µl



Die PCR Ansätze wurden im Biometra Thermocycler bei 94°C für 2 Minuten inkubiert. Darauf folgten 30 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei 60°C und 1 Minute 72°C für die Amplifikation. Zum Abschluss wurden die Ansätze noch 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

Das Erscheinen einer etwa 500bp-Bande, nachdem die Ansätze auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt wurden, signalisiert eine Kolonie, die das geforderte Plasmid besitzt.

Minipräparation

Da nun Kolonien gefunden wurden, die das Plasmid mit dem gewünschten Fragment besitzen, wurden sie dahingehend überprüft, ob sie das Protein Linf27 auch exprimieren. Aus 1 ml Übernachtskulturen in LB-Medium wurden 1ml LB-Kulturen 1:10 inokuliert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,9 mit 1mM IPTG eine Überexpression induziert. Nach einer Inkubationszeit von 4–5 Stunden bei 37 °C

wurden die Kulturen bei 10.000 rpm in der Kühlzentrifuge bei 4°C pelletiert, das Pellet in Protein-Lysepuffer gelöst und über eine Talonmatrix gereinigt. 10µl des gereinigten Proteins wurden auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Comassiefärbung sichtbar gemacht.

Expression in präparativem Maßstab

Die Kulturen, die das Protein in ausreichender Menge produzierten, wurden für eine 250ml Großkultur benutzt, die ebenfalls aus einer Übernachtskultur 1:10 angeimpft wurde. Nachdem die Kulturen eine OD₆₀₀ von etwa 0,9 erreicht hatten, wurden sie mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 bis 5 Stunden wurden die Kulturen bei 4°C und 10.000 rpm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in Protein-Lysepuffer aufgenommen. Nach der Resuspension in Protein-Lysepuffer wurden die Bakterien 2 x 30 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um die Zellen zu öffnen. Die Reinigung erfolgte nun über eine kleine Säule, welche die Talonmatrix enthielt. Das gereinigte Protein wurde in 250-500µl Fraktionen von der Säule eluiert und auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, um die Reinheit zu überprüfen und die Peakfraktion zu bestimmen.



3.2.6 ELISA ZUR ÜBERPRÜFUNG DER REAKTIVITÄT DER EINZELNEN KONSTRUKTIONEN

Die durch die oben beschriebenen Verfahren gewonnenen potentiellen Antigene wurden nun in einem ELISA auf ihre Reaktivität überprüft. Einige der früheren

ELISAs wurden mit einem Phosphatase-konjugierten zweiten Antikörper durchgeführt. Dieser zeigte gegenüber dem Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörper eine verminderte Sensitivität, so dass alle weiteren und hier gezeigten ELISAs mit den Peroxidase-konjugierten Antikörpern durchgeführt wurden.

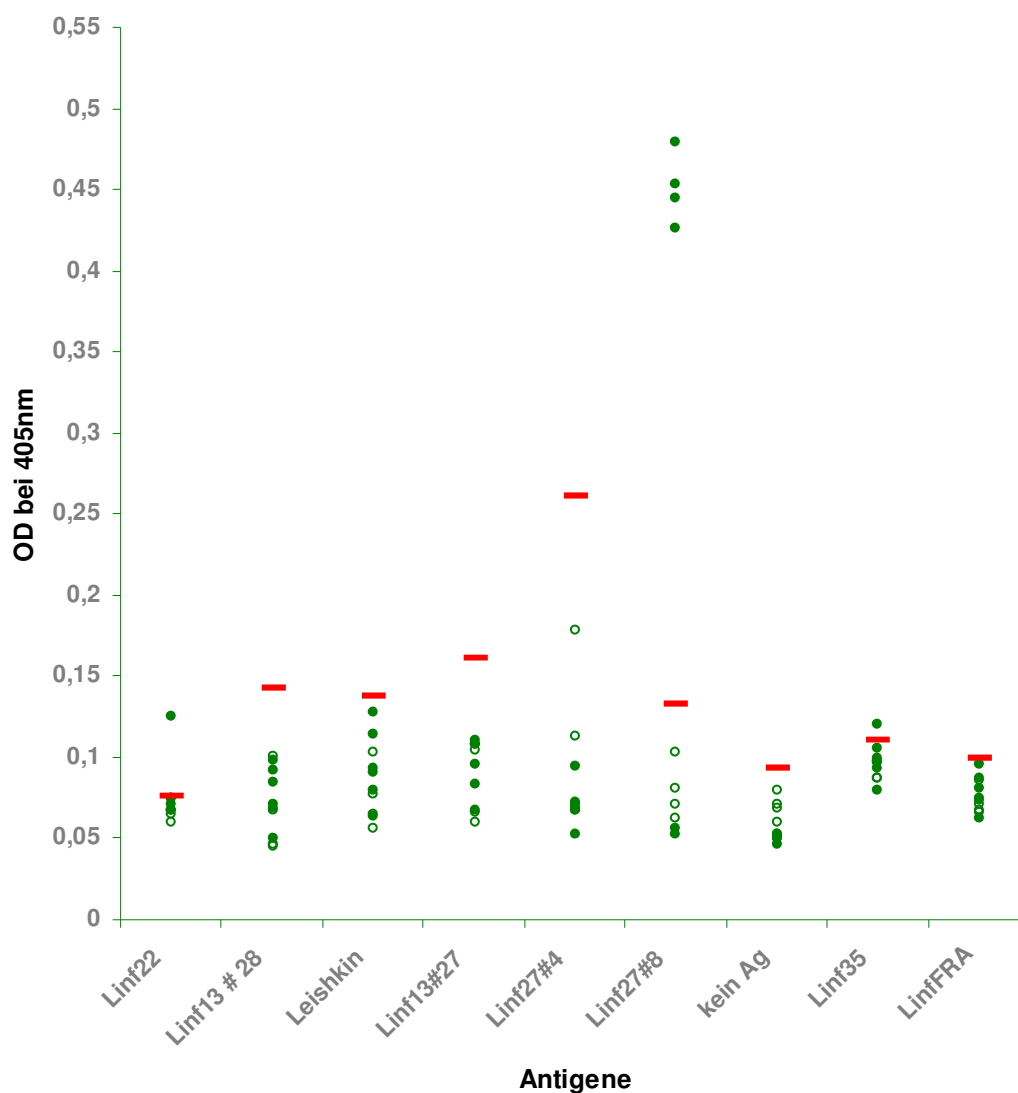


Abbildung 14. Reaktivität einzelner Antigene im ELISA. Ausgefüllte Kreise bezeichnen Seren mit viszeraler Leishmaniose, nicht ausgefüllte Kreise negative deutsche Kontrollen.

Eine unterschiedliche Reaktivität der Antigenkonstruktionen lässt sich in Abbildung 14 ablesen. Die Proteine Linf22, Linf13 Klon28 und Klon27 sowie Linf35, Leishkin und LinFRA mussten aufgrund mangelnder Reaktion auf Serum von Patienten, die an viszeraler Leishmaniose leiden, als Antigen für einen ELISA ausgeschlossen werden. Bei diesem ELISA stellte sich Linf27 als einzig weiter verwendbares Antigen heraus. Zu beachten ist hier auch die klare Trennung von negativen (repräsentiert

durch die offenen Kreise) und positiven (dargestellt durch grüne ausgefüllte Kreise) Seren. Diese Trennung ging auch als Kriterium in die Beurteilung der weiteren Verwendbarkeit der Proteine ein. LinFRA wurde außerdem wegen seiner stark homologen Sequenz mit Chagas-Patientenserum getestet [Hernandez-Pastor 2008] und aufgrund einer dabei beobachteten starken Kreuzreaktion aus den folgenden ELISA herausgenommen.

3.3 FUSION VON PROTEINEN

Mangelnde Sensitivität und Spezifität für Patientenserum aus bestimmten Regionen, wie sie z.B. mit dem rK39 Antigen zu beobachten waren, wurden dadurch umgangen, dass verschiedene potentielle, repetitive Aminosäuresequenzen enthaltende Antigene gemeinsam in einem Test eingesetzt wurden. Um Kosten und Aufwand zu reduzieren, wurden die Antigene fusioniert. Proteine, die sich im ELISA als wirksam zur Diagnose von viszeraler Leishmaniose erwiesen hatten, wurden über einen Adapter miteinander fusioniert, so dass als Endprodukt ein Protein aus mehreren fusionierten Antigenen entstand, welches dann für die ELISA Tests eingesetzt wurde. Die eingesetzten Adapter besitzen eine HindIII, eine BamHI-Schnittstelle und in der Mitte die Nukleotidsequenz für die Aminosäure Prolin, die hier die Funktion eines Gelenks übernimmt und somit möglicherweise für eine ausreichenden Exposition der Epitope sorgt.

Das die Nukleotidsequenz für ein Antigen enthaltende Vektorplasmid pQE30 wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten und somit linearisiert. An die HindIII-Schnittstelle wurde über Nacht bei 12°C ein Adapter ligiert und das Plasmid am nächsten Morgen mit PvuI geschnitten. Das daraus resultierende Fragment, bei dem durch die Adapterligation ein HindIII-Schnitt in einen BamHI-Schnitt umgewandelt

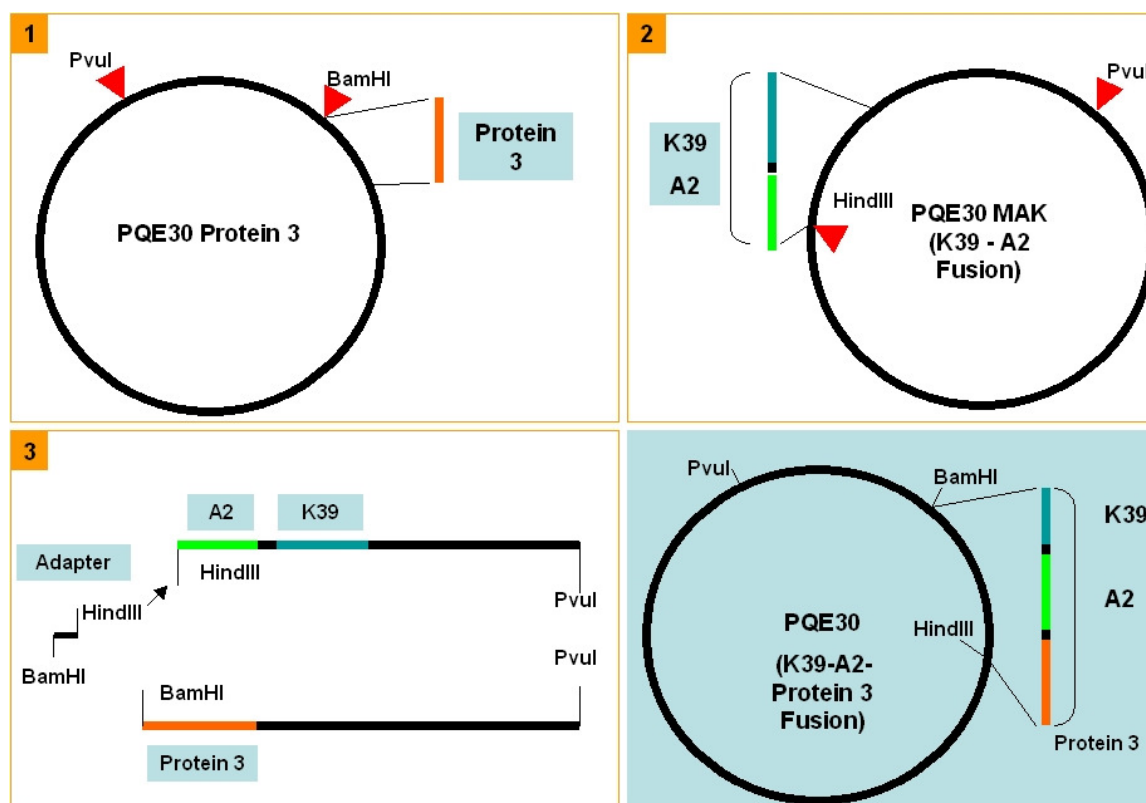


Abbildung 15. Schematische Darstellung der Fusion eines hypothetischen Proteins 3 an eine bestehende Fusion aus K39 und A2. 1. Schneiden des Vektors pQE30 mit dem darin enthaltenen Protein 3 mit PvuI und BamHI. 2. Schneiden des Vektors pQE30 mit der darin enthaltenen Fusion aus K39 und A2 (MAK) mit HindIII und PvuI. 3. Ligation der Fragmente über einen Adapter. 4. Fertige Fusion aus drei potentiellen Antigenen im pQE30-Vektor. (Eigene Darstellung)

wurde, wurde über ein Agarosegel ausgeschnitten und mit NaI/SiO₂ gereinigt. Das Vektorplasmid, welches das zu fusionierende Fragment enthielt, wurde mit BamHI und PvuI geschnitten und mit dem vorherigen Fragment über Nacht bei 12°C zu einem vollständigen Plasmid mit zwei aneinander fusionierten Nukleotidsequenzen für zwei Antigene ligiert. Alle weiteren Antigene wurden auf die gleiche Art und Weise an diese Konstruktion ligiert.

Hind-Bam-AD1-F	AGCT Gccgagcctgagca	(18)
Hind-Bam-AD1-R	gatc tgctcaggctcggC	(18)
Hind-Bam-AD2-F	AGCT attccgctgagca	(17)
Hind-Bam-AD2-R	gatc tgctcagcggaat	(17)

Hind-Bam-AD1:

(HindIII und BamHI im gleichen Leseraster)

HindIII	Hind-Bam AD1	BamHI
5' XXX A	AGCT G ccg agc ctg agc a	ga tcc XXX 3'
3' YYY TTC GA	C ggc tcg gac tcg tct ag	g YYY 5'
X K L	L P S L S R	S X

Abbildung 16. Verwendete Adaptersequenzen (Anzahl der Nukleotide in Klammern) und Darstellung der Funktionsweise mit Aminosäuresequenz für Adapter 1.(Eigene Darstellung)

3.3.1 BEISPIEL EINER FUSION

Die Fusion von K39 und A2 wurde vorher nach dem Standardverfahren durchgeführt und das entstandene Protein als MAK bezeichnet. Die Fusion von MAK und Linf27 stellte sich als etwas schwieriger heraus, da das Fragment, welches für Linf27 codiert, nicht über die Schnittstelle BamHI/HindIII in den pQE30-Vektor (siehe Beispiel) ligiert worden war, sondern über BgIII/HindIII. Die Ligation von einer BgIII-Sequenz auf eine BamHI-Sequenz führt zu einer für beide Enzyme nicht mehr schneidbaren Restriktionsstelle. Das Linf27-Fragment musste also so umkloniert werden, dass eine Ligation in einen BamHI und HindIII geschnittenen Vektor möglich wurde. Dazu wurde das Linf27/pQE30-Plasmid mit EcoRI und HindIII geschnitten, das 400 bp Fragment welches die Linf27-Sequenz enthält aus einem 2%igen Agarosegel ausgeschnitten und mit NaI/SiO₂ gereinigt. Dieses Fragment wurde mit Sau3A nachgeschnitten, um die BgII/BamHI– Schnittstelle aufzuschneiden. Die dabei durch zusätzliche Sau3A-Schnitte außerhalb der benötigten Sequenz entstandenen kleinen Fragmente wurden mit Guanidinium/SiO₂ entfernt. Das übrig gebliebene Sau3A/HindIII-Fragment wurde in einen zuvor mit BgIII/HindIII geschnittenen pQE70-Vektor ligiert.

Vorbereitung des Linf27-Fragments für eine Fusion mit MAK

pQE30-Linf27 x EcoRI x HindIII

50 µl pQE30-Linf27 Plasmidpräparation

8 µl NEB3

8 µl BSA (5mg/ml)

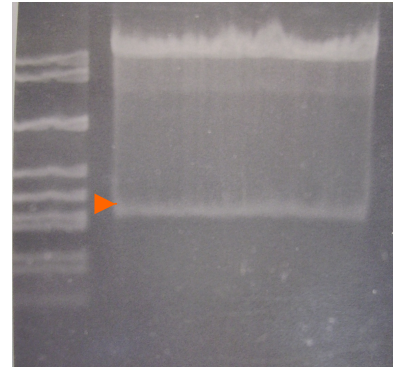
3 µl HindIII

3 µl EcoRI

14 µl Wasser

80 µl

2 Stunden Inkubation bei 37 °C, Ausschneiden eines 400bp Fragments.



pQE70 x BglIII x xHindIII

20 µl pQE70

5 µl NEB2

5 µl BSA (5mg/ml)

3 µl BglIII

3 µl HindIII

14 µl Wasser

50 µl

Inkubation bei 37 °C

über Nacht

Reinigung mit SiO₂.

400bp Linf27-Fragment x Sau 3

40 µl eluiertes Linf27-Fragment

6 µl NEB1

6 µl BSA (5mg/ml)

2 µl Sau3A

6 µl Wasser

60 µl

Inkubation bei 37 °C

über Nacht

Reinigung mit SiO₂.

Ligation 400bp Linf27Fragment

1 µl pQE70 x BglIII/HindIII

1 µl Linf27 Sau3A/HindIII

5 µl 2 x Ligasepuffer

2,7 µl Wasser

0,3 µl T4 Ligase

10 µl

Inkubation bei 10 °C

über Nacht .

Fusion von pQE30-MAK und pQE70-Linf27

Bei dieser Fusion sollte der N-terminale Teil von Linf27 mit dem HindIII-Schnitt an den C-terminalen Teil von MAK fusioniert werden. Dafür muss am C-Terminus von MAK ein HindIII-Schnitt durch Ligation eines Adapters in einen BamHI-Schnitt umgewandelt werden.

Schneiden von pQE30-MAK mit HindIII

20 µl pQE30-MAK
 5 µl NEB2
 5 µl BSA (5mg/ml)
 3 µl HindIII
17 µl Wasser
 50 µl

Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.

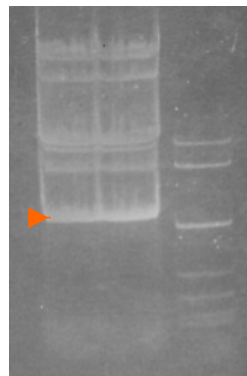
Ligation des Adapters 3

15 µl 2 x Ligasepuffer
 2 µl AD3 Vorwärts
 2 µl AD3 Rückwärts
 0,3 µl T4 Ligase
0,7µl Wasser
 20 µl

Inkubation für 2 Stunden bei 10°C.

Schneiden von pQE30-MAK mit PvuI

10 µl pQE30-MAK+Adapter 3
 2 µl NEB2
 2 µl BSA (5mg/ml)
 2 µl PvuI
4 µl Wasser
 20 µl

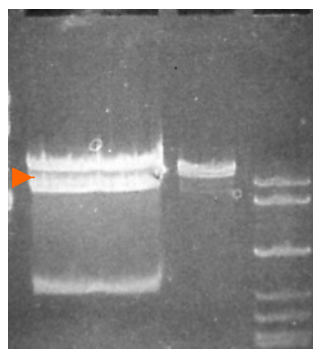


Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.

1300 bp Fragment aus 2%igem Agarosegel ausschneiden, mit NaI und SiO₂ reinigen und in TE-Puffer aufnehmen.

Schneiden von pQE70-Linf27

20 µl pQE70-Linf27
 5 µl NEB2
 5 µl BSA(5mg/ml)
 3 µl BglII
 3 µl PvuI
14 µl Wasser
 50 µl



Inkubation für 2 Stunden bei 37°C

Ligation von pQE70Linf27 und pQE30-MAK

5 µl 2 x Ligasepuffer
 2 µl pQE30-MAK + Adapter 3
 1 µl pQE70-Linf27 xBglIIx HindIII
 1 µl AD 3 Rückwärts
 0,2 µl T4 Ligase
0,8 µl Wasser
 10 µl

Inkubation über Nacht bei 10°C

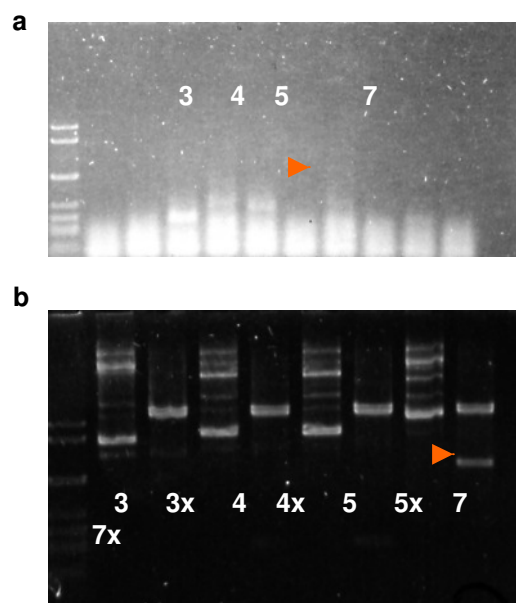
2500 bp Fragment aus 2%igem Agarosegel ausschneiden, mit NaI und SiO₂ reinigen und in 10 µl TE-Puffer aufnehmen.

Transformation und Kontrolle

Die Transformation von E.coli XL-1 Blue wurde nach der Standardmethode durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die auf Kanamycin/Ampicillin positiv selektionierten Kolonien wurden durch eine Standard-PCR (siehe Material und Methoden) auf das geforderte Insert geprüft.

PCR

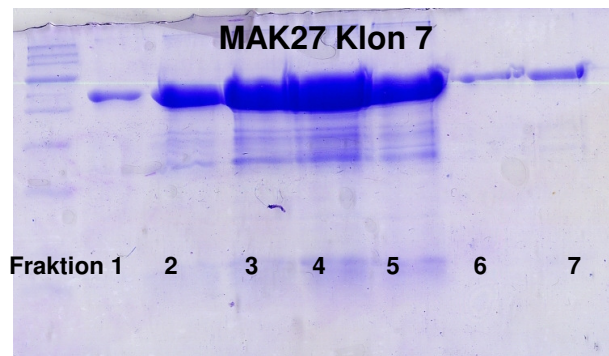
1,0 µl dNTPs (2,5 mM)
 1,0 µl 10 x Taq Puffer
 0,5 µl pQE30 Vorwärtsprimer
 0,5 µl Linf27-8 als Rückwärtsprimer
 0,2 µl Taq Polymerase (1 Unit)
 2,0 µl Template DNA (Überstand)
4,8 µl Wasser
 10 µl



Eine Bande von ca. 1000bp zeigt eine Kolonie an, die das vollständige Plasmid mit der Fusion von K39/A2/Linf27 (MAK27) besitzt (a). Zur Kontrolle wurde eine Miniplasmidpräparation von den Klonen 3,4,5 und 7 gemacht und mit BamHI und HindIII geschnitten (b). Einzig Klon Nr. 7 enthielt das geforderte Fragment .

Expression in präparativem Maßstab

Von Klon MAK27 Nr. 7 wurde eine Übernachtskultur angesetzt und damit eine 250 ml Kultur 1:10 angeimpft. Nachdem die Kultur OD₆₀₀ 0,9 erreicht hatte, wurde sie mit 1mM IPTG induziert und nach 4-5 Stunden bei 4°C für 20 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Guanidiniumlysispuffer aufgenommen, für 2 x 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und über eine Talonmatrix mit Proteinwaschpuffer gereinigt und 300mM Imidazol in 500µl Fraktionen eluiert.



3.3.2 OPTIMIERUNG VON PROTEINEN DURCH FUSION

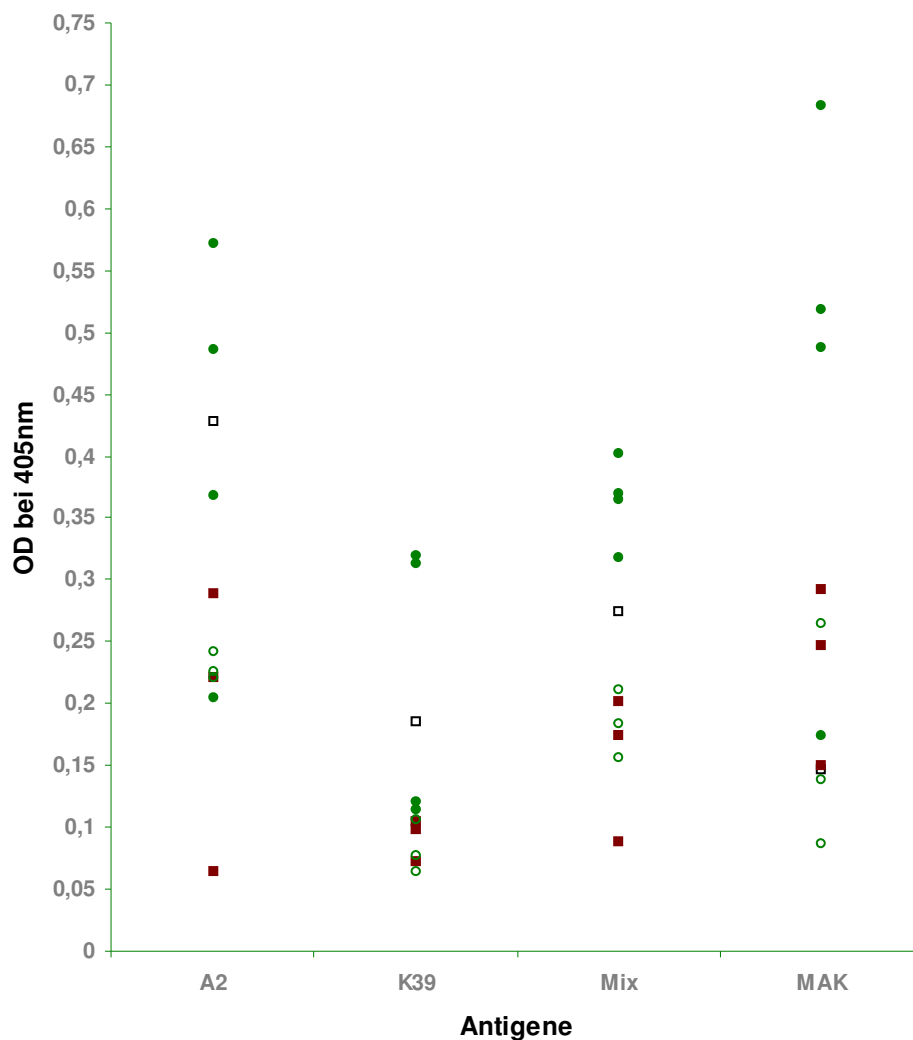


Abbildung 17. ELISA zur Reaktivität der Antigene A2 und K39, einer Mischung (Mix) der beiden Antigene, sowie einer Fusion aus beiden (MAK). Viszerale Seren sind durch einen ausgefüllten Kreis und deutsche Negativkontrollen durch leere Kreise dargestellt. Rote Quadrate repräsentieren kutane Seren, nicht ausgefüllte schwarze Quadrate jemenitische Negativkontrollen.

Die optimale Konstruktion der Proteine bezüglich der Reihenfolge der Wiederholungsmuster der Aminosäuresequenzen stellte sich oftmals erst empirisch heraus.

So wurden z.B. von A2 zwei Versionen und von rK39 sogar drei Versionen synthetisiert, bis sich die optimale Konstellation herausgestellt hatte. Auch auf der Ebene der Fusion der einzelnen Proteine konnte eine Optimierung erreicht werden. Die unterschiedliche Anordnung der Proteine in der Fusion führte manchmal zu einer erhöhten Reaktivität des Gesamtkonstrukts. Dabei war z.B. zu beobachten, dass ein einfacher Mix aus den zwei Proteinen A2 und K39 schwächer im ELISA reagierte als eine Fusion der beiden Antigene (Abbildung 17).

3.4 DAS ANTIGEN AK2708

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Proteinfusion AK2708 im ELISA mit Peroxidase-konjugiertem zweitem Antikörper. Getestet wurden jeweils 12 Seren von deutschen Kontrollpatienten (DK), von jemenitischen Patienten mit kutaner Leishmaniose (KL), jemenitischen Kontrollseren (JK) und jemenitischen Patienten mit diagnostizierter viszeraler Leishmaniose (VL). Die rote Linie repräsentiert den CutOff-Wert für die jemenitischen Kontrollseren, die schwarze den CutOff-Wert für die deutschen Kontrollseren. Der CutOff-Wert wurde aus den Mittelwerten der Messreihen plus doppelter Standardabweichung berechnet. Zu sehen ist hier, dass über 90% der Seren mit viszeraler Leishmaniose über beiden CutOff-Werten liegen und somit als positiv von diesem Antigen erkannt werden. Legt man den CutOff-Wert, der aus jemenitischen Kontrollseren berechnet wurde, zugrunde, so werden die Seren von Patienten mit diagnostizierter kutaner Leishmaniose zu 90% nicht erfasst. Eine Unterscheidung von kutaner und viszeraler Leishmaniose ist mit diesem Antigen möglich. Um dieses eingehender zu prüfen, wurde als Referenztest ein ELISA mit Rohextrakt aus *L. infantum* (LSA, siehe Material und Methode) durchgeführt und die Ergebnisse mit dem AK2708-ELISA verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. In diesem Test wurden 20 der zur Verfügung stehenden Patientenseren benutzt, die im Jemen auf viszerale Leishmaniose positiv diagnostiziert wurden.

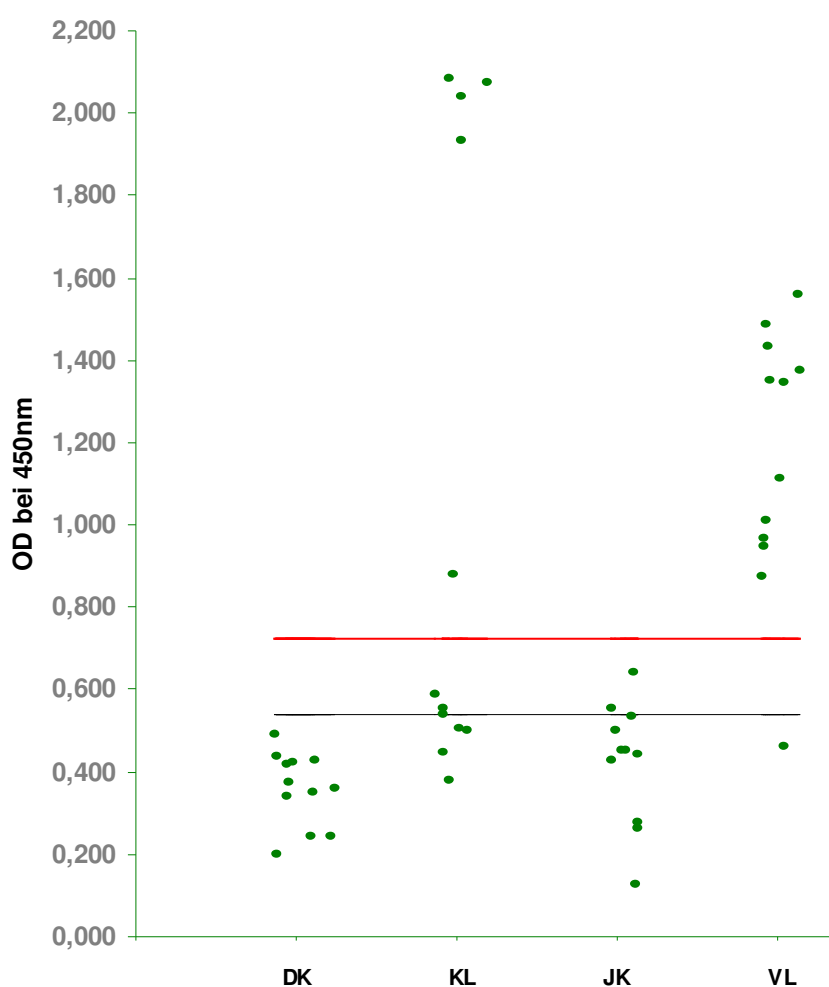


Abbildung 18. Test von AK2708 im ELISA mit deutschen Kontrollseren (DK), mit kutanen Leishmanioseseren (KL), jemenitischen Kontrollseren (JK) und viszerale Leishmanioseseren (VL). Die obere rote Linie gibt den CutOff-Wert basierend auf jemenitischen Kontrollseren, die schwarze Linie den CutOff-Wert basierend auf deutsche Kontrollseren an.

Es ist zu sehen, dass nur etwa 50% der Seren in beiden Tests als positiv erkannt werden. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf eine ungenaue Diagnosemethode im Jemen. Die meisten dieser Patienten wurden mit dem Formol-Gel-Test diagnostiziert. Die Nachteile dieses Tests wurden in der Einleitung dargestellt. Auffällig ist, dass die AK2708-Fusion für alle positiven Seren wesentlich höhere Werte zeigt, die Unterscheidung ist hier also eindeutiger als im ELISA mit Rohextrakt. In diesem und allen weiteren ELISAS wurde der CutOff-Wert nur noch aus jemenitischen Kontrollseren berechnet. Er liegt etwas höher als mit deutschen

Kontrollseren, entspricht dafür aber einem Gebiet, in dem Leishmaniose endemisch ist und stellt somit eine genauere Negativkontrolle dar.

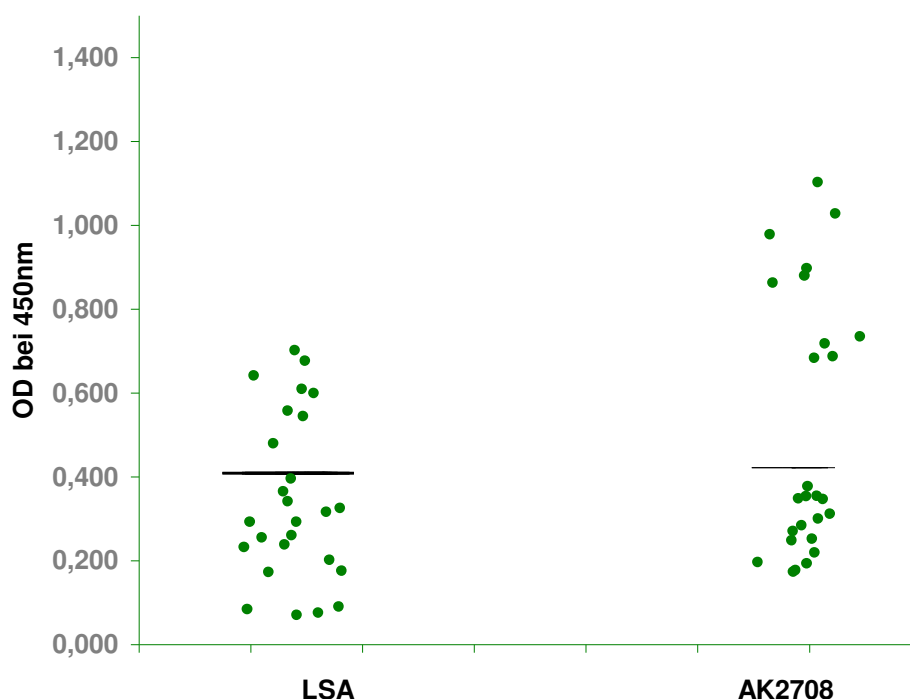


Abbildung 19. Vergleich eines Rohextrakts aus *Leishmania infantum* (LSA) und AK2708 im ELISA mit Seren von Patienten mit viszeraler Leishmaniose. Die schwarze Linie gibt den CutOff-Wert an, berechnet aufgrund von negativen jemenitischen Kontrollseren.

Die verfügbaren Seren von Patienten mit kutaner Leishmaniose wurden durch Mikroskopie einer genauen Methode zur Bestimmung kutaner Leishmaniose unterzogen. In Abbildung 20 sieht man jedoch eine Gruppe von vier Seren, (Nr.8 bis Nr. 10) die sehr stark mit AK2708, aber nur sehr schwach mit dem Rohextrakt aus *Leishmania infantum* (LSA) oder der Fusion aus K39, A2 und Linf27 reagieren. Diese eindeutig stark positive Reaktion legt die Vermutung nahe, dass es sich um Patienten mit zumindest einer Doppelinfektion oder einer nicht erkannten viszeralen Leishmaniose handelt. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit einer Kreuzreaktion mit einer anderen Erkrankung oder einer Verunreinigung der Seren. Auf der Basis der verfügbaren Möglichkeiten wird eine PCR als Referenz herangezogen, um diesen Befund zu klären.

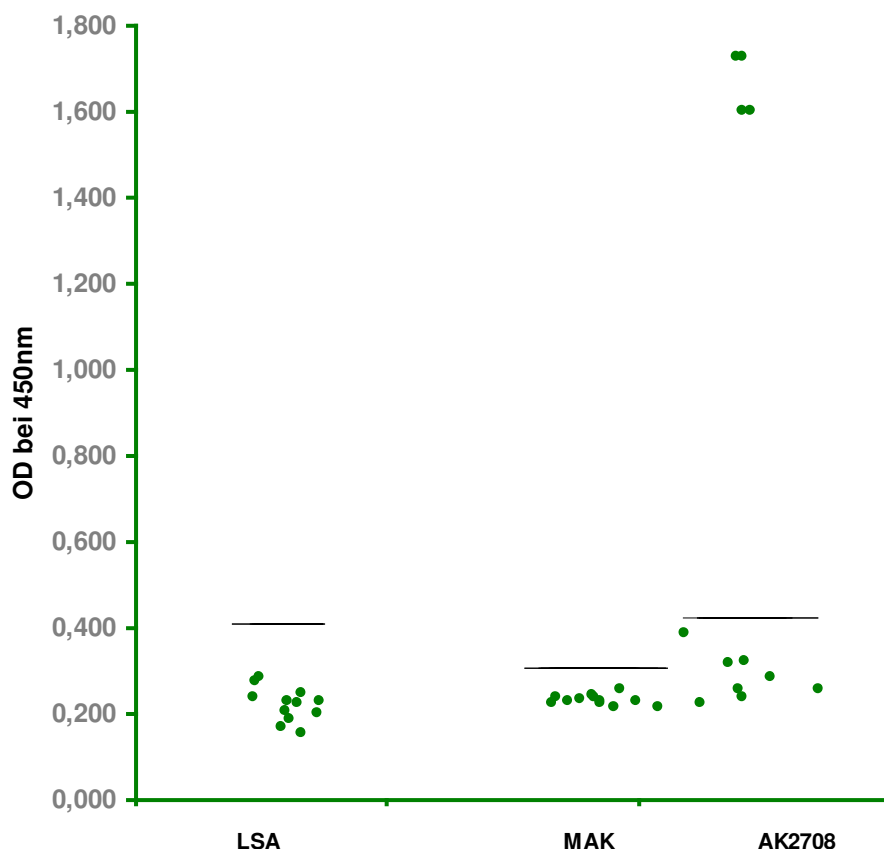


Abbildung 20. Vergleich kutaner Leishmanioseseren in einem ELISA mit Rohextrakt aus *Leishmania infantum* (LSA), der Fusion aus K39 und A2 (MAK) und AK2708. Die schwarze Linie gibt den CutOff-Wert an, berechnet aufgrund der Ergebnisse jemenitischer Kontrollseren.

3.4.1 PCR MIT UNKLAREN SEREN AUS DEM JEMEN

Bei dem verwendeten PCR-Test handelt es sich um eine „nested“-PCR, d.h., das primär amplifizierte Fragment dient in einer weiteren PCR als Matrize. Dementsprechend benötigt man ein weiteres Paar Primer, dessen Zielsequenz sich innerhalb der Zielsequenz der ersten PCR befindet. Der Einsatz einer solchen „nested“-PCR erhöht die Sensitivität und kann damit sehr gut beim Nachweis eines Erregers eingesetzt werden. Hierbei muß erwähnt werden, dass bei den verfügbaren Patientenproben ein Teil des Blutes für die Gewinnung von Antiserum und ein zweiter Teil für die Herstellung von „buffy coat“ herangezogen worden war [Ali, in Vorbereitung]. Als Ausgangsmaterial für die erste PCR wurde aus dem „buffy coat“ isolierte DNA verwendet. Der sogenannte „buffy coat“ bezeichnet die nach der

Zentrifugation des Vollblutes auf dem Pellet zurückbleibende dünne gelbliche Schicht, die Leukozyten, Makrophagen etc. enthält. Dies ist also ein geeigneter Schritt DNA-Material des Erregers, der sich in Makrophagen aufhält, anzureichern. Die PCR-Primer wurden von Abdulatif Ali zur Verfügung gestellt [Ali in Vorbereitung].

<u>Bezeichnung</u>	Sequenz	Tm
Leish18S-out-F	TCAGTCCATTTGGATTGTCA (20)	67°C
Leish18S-out-R	AGTACGTTCTCCCCGAACT (20)	
Leish18S-inn-F	CAGGTTTGTTCCTGGTCGTC (20)	72°C
Leish18S-inn-R	GAGTTGAAAAGGCATTACGG (20)	

Abbildung 21. Primersequenzen für die Leishmania “nested”-PCR

Die Ansätze wurden für die erste PCR bei 94°C für 2 Minuten inkubiert. Darauf folgten 30 Zyklen mit 20 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei 67°C und 1 Minute 72°C für die Amplifikation. Zum Abschluss wurden die Ansätze noch 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

Für die zweite PCR wurden 2 µl aus dem ersten Ansatz als Matrize für eine Amplifikation mit dem Satz innerer Primer verwendet. Im Unterschied zur ersten PCR lag diesmal die Annealingtemperatur bei 72°C.

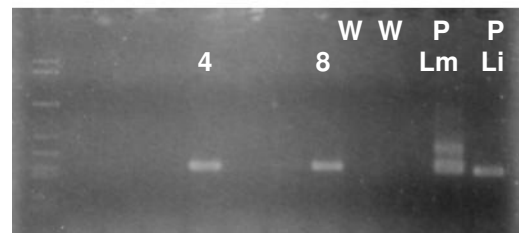
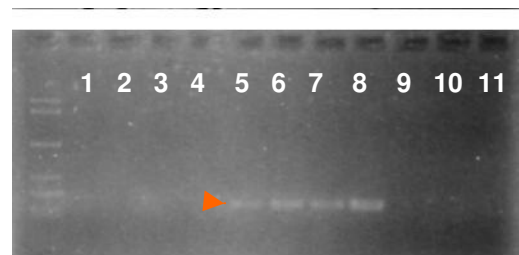
1. PCR

- 1,0 µl dNTPs (2,5 mM)
- 1,0 µl 10 x Taq Puffer
- 0,5 µl **Leish18S-out-F**
- 0,5 µl **Leish18S-out-R**
- 0,2 µl Taq Polymerase (1 Unit)
- 2,0 µl Template DNA (aus „buffycoat“)
- 4,8 µl Wasser
- 10 µl

94°C 2 Minuten , 30 Zyklen mit je 94°C für 20 Sekunden, 67°C für 1 Minute und 1 Minute bei 72°C

2. PCR

1,0 µl dNTPs (2,5 mM)
 1,0 µl 10 x Taq Puffer
 0,5 µl **Leish18S-inn-F**
 0,5 µl **Leish18S-inn-R**
 0,2 µl Taq Polymerase (1 Unit)
 2,0 µl Template DNA (1. PCR)
4,8 µl Wasser
 10 µl



94°C 2 Minuten , 30 Zyklen mit je 94°C für 20 Sekunden, 72°C für 1 Minute und 1 Minute bei 72°C

Die PCR-Ansätze wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Wie auf der Fotografie des Gels zu sehen ist, sind die ersten vier Spuren leer. Hier wurden Ansätze mit den DNA-Präparationen der kutanen Seren 1 bis 4 aufgetragen. Die Spuren 5 bis 8, auf denen die verdächtigen kutanen Leishmaniosefälle Nr. 8 –11 aufgetragen wurden, zeigen eine Bande, die mit der Bande der Positivkontrolle für *Leishmania infantum* (PLi) im unteren Gel an letzter Stelle übereinstimmt. Als Negativkontrolle sind in den letzten 3 Spuren (9 bis 11) des oberen Gels DNA-Extraktionen aus negativen jemenitische Seren aufgetragen. Weitere Negativkontrollen mit destilliertem Wasser finden sich auf dem unteren Gel, bezeichnet mit W. In den zwei Spuren des unteren Gels, die mit 4 und 8 überschrieben sind, befinden sich die PCR-Ergebnisse aus den DNA-Präparationen der Patientenproben mit viszeraler Leishmaniose Nr. 4 und 8 als weitere positive Kontrolle. Die für *L. infantum* charakteristische Bande in den Spuren für die vier vermeintlich kutanen Seren ist ein Beweis für eine viszerale Leishmaniose. *Leishmania infantum* kann als primäres Symptom eine Läsion an der Einstichstelle auslösen, die der kutanen Leishmaniose ähnlich sieht, was die Diagnose in diesem Fall erschwert. Wenn jedoch im Blut zirkulierende Erreger gefunden werden, wie es

hier durch PCR geschehen ist, kann von einer Viszeralisierung von *Leishmania infantum* ausgegangen werden.

Die Seren Nr. 8 bis 11 der jemenitischen kutanen Seren sind also viszerale Leishmaniosefälle. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine höhere Sensitivität des auf dem AK2708-Antigen basierenden ELISA gegenüber dem Rohextrakt-ELISA ableiten.

3.4.2 REAKTION VON AK2708 MIT MEDITERRANER VISZERALER LEISHMANIOSE

Idealerweise sollte ein guter ELISA auch viszerale Leishmaniosen anderer Endemiegebiete erkennen und von kutaner Leishmaniose unterscheiden können. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich Seren von spanischen Patienten mit viszeraler Leishmaniose getestet, um die Wirksamkeit von AK2708 auch im mediterranen Raum zu testen. Diese Seren wurden zwar mit einem ELISA vordiagnostiziert, bei dem allerdings Rohextrakt aus promastigoten *Leishmania donovani*-Kulturen verwendet wurde und dadurch nicht als optimale Diagnosemethode für viszerale Leishmaniose angesehen werden kann.

In Abbildung 22 sieht man in der Auswertung des ELISAs mit den Patienten, die in Spanien positiv auf viszerale Leishmaniose getestet wurden, dass jeweils nur etwa 50% der Seren mit *Leishmania infantum*-Rohextrakt bzw. AK2708 erkannt werden. Zwei der Seren reagieren außergewöhnlich stark mit AK2708. Abschließend konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den negativ getesteten Seren um Fehldiagnosen handelt, da Material für eine Referenz-PCR nicht vorhanden war. Da sie jedoch auch im *Leishmania infantum*-Rohextrakt-ELISA negativ getestet wurden, ist es wahrscheinlich, dass es sich um Patienten handelt, die keine viszerale Leishmaniose haben.

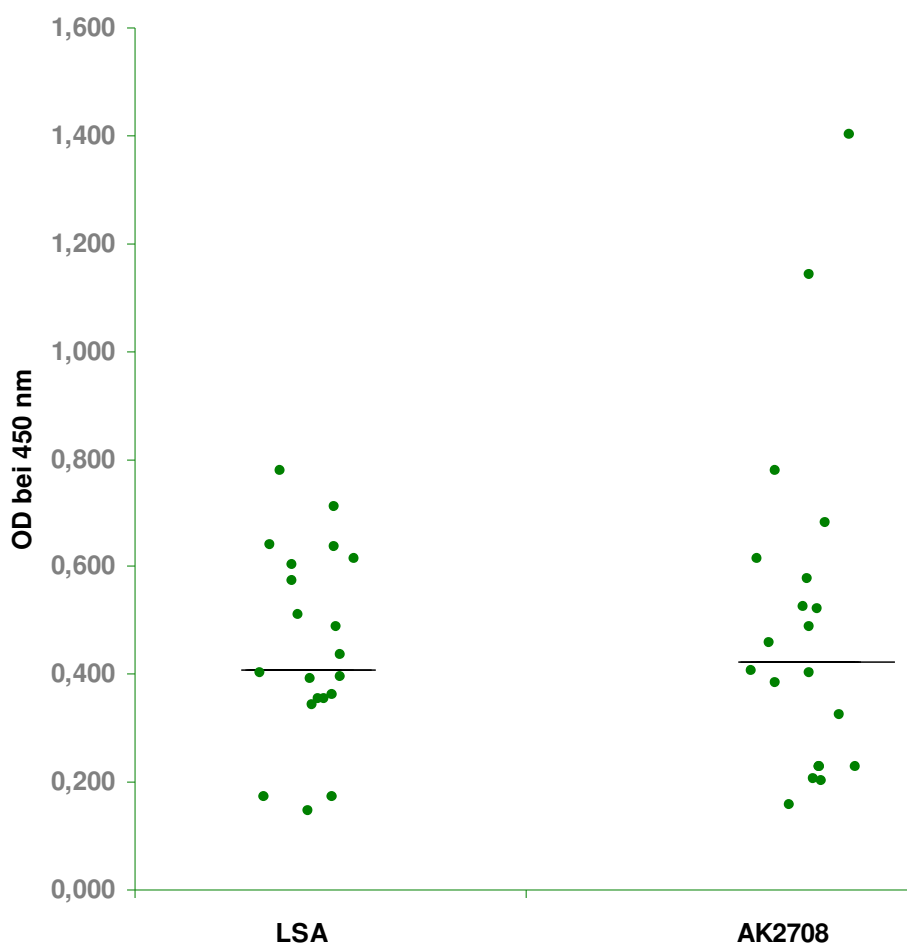


Abbildung 22. Vergleich von Patienten aus Spanien mit viszeraler Leishmaniose. ELISA mit *Leishmania infantum* Rohextrakt (LSA) und AK2708. Die schwarze Linie gibt den CutOff-Wert basierend auf den Werten von jemenitischen Kontrollseren an.

3.4.3 KREUZREAKTION MIT *TRYPANOSOMA CRUZI* (CHAGAS) UND KUTANER LEISHMANIOSE AUS PANAMA (*L. PANAMENSIS*)

Zu einer zuverlässigen Diagnose gehört auch der Ausschluss möglicher Kreuzreaktion mit nahe verwandten Erregern. In Lateinamerika ist als Ursache für eine mögliche Kreuzreaktion *Trypanosoma cruzi* zu nennen, der Erreger der Chagas-Krankheit .

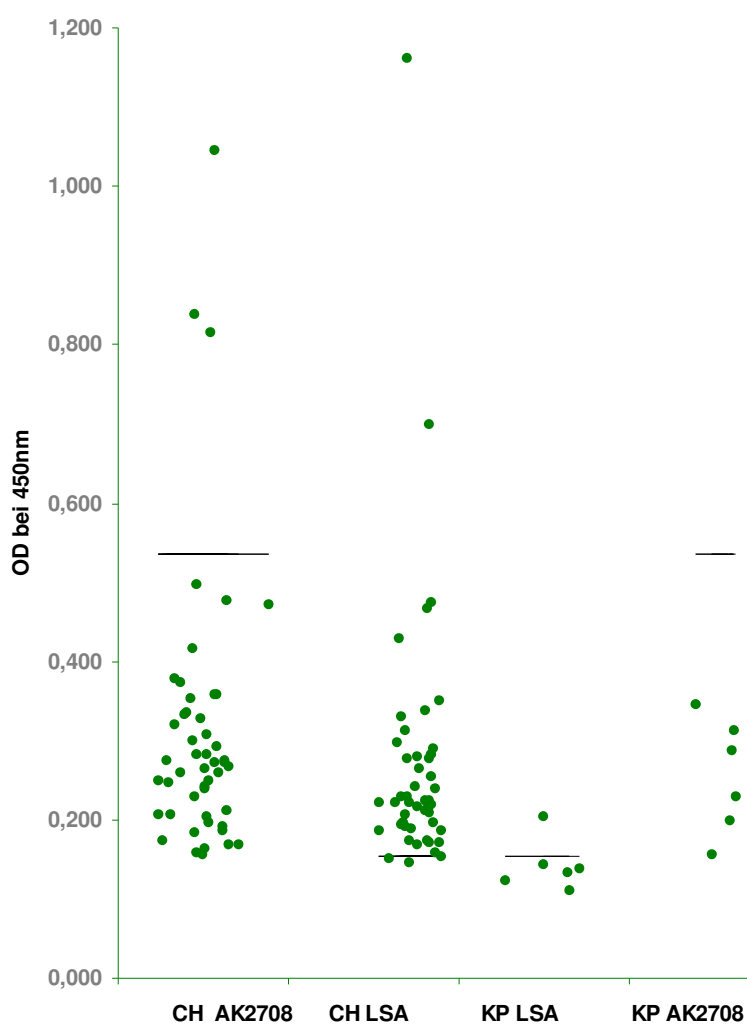


Abbildung 23. Vergleich der Seren von Patienten aus Lateinamerika, die an der Chagas-Krankheit (CH) oder an kutaner Leishmaniose (KP) leiden im ELISA mit AK2708, und mit *Leishmania infantum* Rohextrakt (LSA).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 in Spalte 1 (CH AK2708) und 2 (CH LSA) dargestellt. In dem ELISA mit AK2708 sind von den 48 diagnostizierten Chagaspatientenseren drei als positiv auf viszerale Leishmaniose zu bezeichnen, der Rest bleibt klar unter dem CutOff-Wert. Im *Leishmania infantum* Rohextrakt ELISA sind alle Chagasseren über dem CutOff-Wert, d.h. positiv. Ein ELISA mit Rohextrakt aus *L. infantum* erscheint daher nicht geeignet zur Unterscheidung von Leishmaniose und Chagas-Krankheit. Die Kreuzreaktion von AK2708 ist dem gegenüber minimal. Es kann sogar nicht ausgeschlossen werden, dass die drei

positiv getesteten Seren Antikörper gegen Erreger der viszeralen Leishmaniose haben. Weitere Tests waren aufgrund limitierter Probenmenge leider nicht möglich. Kreuzreaktionen mit den Seren aus Panama sind bei dem ELISA mit AK2708 nicht zu sehen. Alle Seren bleiben klar unter dem CutOff-Wert und sind somit negativ. Der CutOff-Wert ist jedoch aufgrund jemenitischer Negativproben erstellt worden. Ein Wert basierend auf Negativseren aus Panama würde ein noch genaueres Bild ergeben. Zum Vergleich sind die Werte im Rohextrakt-ELISA nahe beim CutOff-Wert bzw. darüber. Eine Diagnose zur Unterscheidung von viszeraler und kutaner Leishmaniose ist also mit einem Rohextrakt aus *Leishmania infantum* problematisch, mit AK2708 jedoch möglich.

4. DISKUSSION

Die geschätzte Zahl von ca. 59.000 Toten jährlich und die in der Einleitung erwähnten Schwierigkeiten einer genauen Diagnose von viszeraler Leishmaniose, sowie die toxischen Nebenwirkungen der Medikamente, macht die Notwendigkeit der Entwicklung präzisen Diagnosemethoden für viszerale Leishmaniose ersichtlich.

Verfügbare Diagnosemethoden sind unzureichend in der Sensitivität und Spezifität oder werden nicht genutzt, weil sie zu teuer oder in Entwicklungsländern mit einfacher Laborausstattung nicht durchführbar sind. Anzustreben ist aus diesen Gründen eine Diagnosemethode die sensitiv, spezifisch und günstig in Herstellung und Anschaffung ist. Gleichzeitig sollte sie einfach in der Handhabung und mit minimalem Laboraufwand auszuführen und weltweit einsetzbar sein.

Einfach zu handhabende und billige Tests, wie z.B. der Formol Gel Test oder der Rohextrakt-ELISA, sind schon jetzt zu erwerben und werden auch größtenteils zur Diagnose von Leishmaniose allgemein, aber auch speziell zur Diagnose der viszeralen Leishmaniose angewendet. Neben dem Vorteil günstiger Anschaffungskosten, zeigen sich jedoch gravierende Nachteile dieser Tests in der Sensitivität und Spezifität (Tabelle 2).

Gute, jedoch teure Tests, wie der ELISA mit dem rekombinanten Antigen K39, zeigten Sensitivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Foci für viszerale Leishmaniose in Asien (Indien) und Afrika (Sudan) [Sundar S. et al. 2002]. Dennoch stellte sich der ELISA als die sensitivste und unter bestimmten Voraussetzungen auch kostengünstigste Methode heraus.

Mittels eines standardisierten Verfahrens, basierend auf die im Internet verfügbare Datenbank für Sequenzinformation von *Leishmania* und dem Programm „Tandem Repeat Finder“ wurden Antigene gefunden, die sich durch tandemartig wiederholt angeordnete Aminosäuresequenzen auszeichneten. Diese Sequenzen wurden ausgehend von den Erfahrungen von *Plasmodium* und *Trypanosoma* als Indiz für Immundominanz gewertet. Die ausgewählten Antigene wurden über ein flexibles Spacerelement fusioniert und unter dem Namen AK2708 für einen ELISA zur Diagnose von viszeraler Diagnose verwendet. Das Antigen AK2708 erwies sich als wirksam zur Unterscheidung von viszeraler und kutaner Leishmaniose.

4.1 AUSWAHL UND KLONIERUNG POTENTIELLER ANTIGENE

Als Voraussetzung für einen diagnostischen Test für viszerale Leishmaniose ist die Unterscheidung von kutaner Leishmaniose und von anderen Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik zu sehen. Zusätzlich ist besonders in Südamerika eine Differentialdiagnose bzgl. der Chagaskrankheit wichtig, deren Erreger *Trypanosoma cruzi* eine nahe Verwandtschaft zu den Erregern der viszeralen Leishmaniose besitzt. Ein Beispiel ist hier das LinFRA-Antigen, welches aufgrund starker Kreuzreaktion mit Seren von Chagas-Patienten nicht geeignet ist für einen ELISA zur Diagnose von viszeraler Diagnose. Zur Optimierung der Effektivität eines solchen ELISA-Tests wurde eine Kombination von Antigenen verschiedener Arten von Erregern der viszeralen Leishmaniose benutzt. Als Besonderheit wiesen diese Antigene tandemartige Wiederholungsmuster in ihrer Aminosäuresequenz auf, die sich als immundominante Epitope herausstellten. Die Annahme, dass diese Wiederholungsmuster eine stark erhöhte Immunantwort im Wirt auslösen, wurde für *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma cruzi* schon bewiesen [Frasch A.C.C. 1991; Anders R.F. et al. 1986; Corradine G. et al. 2007; Nardin et al. 1992]. Dies war jedoch nicht generell der Fall, und so mussten die potentiellen Antigene für viszerale Leishmaniose in verschiedenen Vorversuchen im ELISA getestet werden.

Die Auswahl der potentiellen Antigene wurde durch systematisches Durchsuchen der Sequenzdaten von *Leishmania infantum* getroffen. Unterschiede in der immunologischen Reaktivität der potentiellen Antigene, wie sie in Abbildung 14 zu sehen sind, können sicherlich auch auf die Konzentration der Suche auf diesen einen Erreger zurückgeführt werden. Nur von *Leishmania infantum* waren alle Sequenzinformationen zugänglich. Soweit verfügbar, wurden Sequenzdaten von *Leishmania donovani* mit einbezogen, welcher ebenfalls eine viszerale Leishmaniose auslösen kann. Zur Abgrenzung zu Erregern der kutanen Leishmaniose wurde die Datenbank von *Leishmania major* benutzt, die inzwischen ebenfalls vollständig ist. Als Informationsquelle wurden Datenbanken der Sanger Welcome Trust und des NCBI und zum Sequenzvergleich deren BLAST-Funktionen genutzt. Große Homologien der Nukleotidsequenzen von *Leishmania infantum* zu *Leishmania chagasi*, dem Erreger von viszeraler Leishmaniose in Lateinamerika, machten es möglich, auch diesen Teil der Welt mit einzubeziehen. Da aber auch von *Leishmania chagasi* keine umfassenden Sequenzdaten zugänglich waren und keine

lateinamerikanischen Seren zur Verfügung standen, blieb die Wirksamkeit der potentiellen Antigene mit Seren lateinamerikanischen Ursprungs nur eine theoretische Annahme.

Das verwendete Online-Programm „Tandem Repeat Finder“ zur systematischen Durchsuchung der Datenbanken wurde nur anfänglich benutzt. Eine manuelle systematische Durchsuchung durch einfache farbliche Markierung einzelner Aminosäuren brachte bessere Ergebnisse in der Erkennung von Wiederholungsmustern in Aminosäuresequenzen und war einfacher durchzuführen. Es gab Versuche anderer Autoren [GOTO et al. 2006] mit Hilfe von „Tandem Repeat Finder“ Datenbanken zu durchsuchen, die jedoch nur wenige nützliche Antigene hervorbrachten, die auch nicht in Kombination eingesetzt wurden und deren Sequenz für die Klonierung nicht optimiert wurde.

Die gefundenen potentiellen Antigene wurden mit Sequenzvergleichssoftware unter <http://www.bioinformatics.org/sms2> („Sequence manipulation suite“) oder mit der BLAST- Funktion der „Sanger Welcome Trust“-Datenbank mit anderen Sequenzen auf Homologien geprüft. Dabei zeigte sich, dass viele Sequenzen unerwünschte Homologien zu Sequenzen anderer nahe verwandter Erreger aufwiesen. Diese wurden daher aussortiert (z.B. das LinFRA-Antigen, siehe Tabelle 6). Von den übrigen wurden diejenigen Sequenzen als aussichtsreichste Kandidaten für immundominante Antigene angesehen, die besonders lange und hoch repetierte Aminosäuresequenzen beinhalteten. Hohe Wiederholungsraten sorgen vermutlich am Ehesten für eine ausreichende Stimulation des Immunsystems und somit für eine große Anzahl an spezifischen Antikörpern. Aus der Information der Sequenzvergleiche, besonders aus den Ergebnissen der NCBI-Datenbank, ließen sich auch Variationen von diesen Sequenzen innerhalb der gleichen Art von Erregern finden. Dabei handelte es sich um verschiedene Isolate von *Leishmania infantum* oder *Leishmania donovani*. Möglichst viele Variationen wurden in der maximal möglichen Anzahl an Kopien hintereinander synthetisiert, in pQE30-Vektoren kloniert und in *E. coli* exprimiert.

Die Klonierung dieser Sequenzen war zunächst problematisch, da sich wiederholende Nukleotidtripletts vom *E. coli*-Reparatursystem nicht toleriert werden. Dies zeigte sich in ersten Versuchen, die in unvollständiger Expression der Proteine mündeten. Diese Schwierigkeit ließ sich durch gezieltes Design der Oligonukleotide umgehen. Die Online-Software DNAWORKS 2.4 leistete hierbei gute Dienste in der

Variation der Codons für die einzelne Aminosäure, um die Wiederholungsraten so gering wie möglich zu halten. Außerdem wurden möglichst Codons verwendet, die von *E. coli* bevorzugt benutzt werden. Dies bot enorme Vorteile in der Geschwindigkeit des Designs neuer Oligonukleotide für die Synthese von Nukleotidsequenzen für potentielle Antigene. Der Automation waren aber wiederum Grenzen gesetzt, da DNAWORKS 2.4 dem Anwender eine Fülle von Vorschlägen präsentiert, die nach den gewünschten Kriterien manuell durchsucht werden mussten, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Dies erfordert ein gewisses Maß an Erfahrung.

Die zur Klonierung benutzten „Oligo Assembly“- und „Fill in and Ligation“-Methoden wurden in den Resultaten beschrieben. Als die praktikabelste der beiden Methoden stellte sich aufgrund der Schnelligkeit und des geringeren Aufwands die auf der Methode von Xiong und Gao [Xiong et al. 2004; Gao et al. 2003] basierende „Oligo Assembly“-Methode heraus. Zusätzlich dazu konnten mit dieser Methode deutlich zuverlässiger Gene synthetisiert werden als durch die „Fill in and Ligation“-Methode. Die Länge der zur Synthese benötigten Oligonukleotide bewegte sich zwischen 40 und 60 Nukleotiden, wobei die Länge der überlappenden Enden 15 bis 20 Nukleotide betrug. Die Annealingtemperatur variierte mit der Länge der überlappenden Enden. Bei mehr als 6 Oligonukleotiden wurde die PCR in zwei Reaktionen geteilt. Dies geschah zum einen, weil die Sequenz sonst zu lang für eine zuverlässige Synthese durch die Taq Polymerase wurde und zum anderen weil bei zunehmender Länge auch die Wahrscheinlichkeit einer Wiederholung in der Nukleotidsequenz stieg und somit Mispriming der Oligonukleotide ermöglichte.

Die Länge der gewonnenen Gene betrug ca. 300 bis 600 Nukleotide, die daraus resultierende Größe der Proteine hatte vermutlich Auswirkungen auf die Reaktivität, da größere Proteine höhere OD_{600} -Werte zeigten als kleinere. Dieser Umstand begünstigte unter anderem die Entscheidung für eine spätere Fusion der Proteine. Größere Proteine erzielten wahrscheinlich bessere Ergebnisse, weil sie besser an der Kunststoffoberfläche der ELISA-Mikrotiterplatte haften blieben und die immunreaktiven Epitope besser exponiert werden konnten.

4.2 ANTIGENE

Mit dem Antigen k39 wurde ein Protein mit repetitiven Aminosäuresequenzen gefunden, welches allgemein als ein aussichtsreicher Kandidat für eine Immundiagnose gesehen wird. Es wird schon seit längerem in ELISAs und Dipstick-Tests erfolgreich angewendet. Berichte über mangelnde Reproduzierbarkeit der guten Ergebnisse in unterschiedlichen Endemiegebieten relativieren die an sich gute Reaktivität dieses Antigens. Besonders auffällig sind die Unterschiede zwischen indischen und afrikanischen Endemiegebieten, die eventuell durch unterschiedliche Varianten von *L. donovani* zu erklären sind und dadurch, dass K39 ursprünglich aus *L. chagsi* kloniert wurde, welches die größeren Homologien zu *L. infantum* aufweist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde rK39 als Grundlage für die Entwicklung einer Antigenkombination gewählt, die solche Mängel ausgleichen sollte. Eine Kombination verschiedener Antigene ist vor dem Hintergrund der verschiedenen bekannten Arten von *Leishmania*, die viszerale Leishmaniose hervorrufen und deren Varianten, sinnvoll. K39 liefert sowohl gute Ergebnisse bei immunsuprimierten Patienten, die z.B. an HIV/AIDS leiden, als auch bei akuten und chronischen Infektionen [Burns, J.M. et al., 1993; Rosati S. et al. 2003]. Da bei keinem der verfügbaren Seren Daten dieser Art erhoben wurden, kann über die Reaktivität in einzelnen Stadien der Krankheit hier nichts ausgesagt werden. Es war jedoch schon in Vorversuchen zu sehen, dass durch einen ELISA mit K39 dessen Aminosäuresequenz, wie oben beschrieben, optimiert worden war, nur etwa 30% der Seren aus dem Jemen als positiv zu bezeichnen waren (Daten nicht veröffentlicht). Dies bestätigte sich größtenteils bei den später durchgeführten Tests mit dem Gesamt-Fusions-Antigen AK2708 (Abbildung 19).

Ein weiteres interessantes Antigen für die Diagnose viszeraler Leishmaniose ist A2 [Zhang et al. 1996]. Es zeigt ebenfalls eine hoch repetitive Struktur und wird ausschließlich in amastigoten Leishmanien exprimiert, die viszerale Leishmaniose hervorrufen. In anderen *Leishmania*-Arten ist das A2-Gen zwar auch vorhanden, jedoch nicht hochrepetitiv und wird auch nicht exprimiert [Zhang et al. 2003]. Auch dieses Antigen reagiert gut mit Seren von Patienten mit viszeraler Leishmaniose, aber mit unterschiedlichen Sensitivitäten in unterschiedlichen Tests (ELISA und Immunpräzipitation). Bei einem ELISA-Test mit Seren aus dem Sudan und Indien [Ghedini et al. 1997] zeigte sich, dass dieses Antigen sensitiver für Seren aus dem

Sudan ist und somit eine gute Ergänzung zu k39 darstellt. Einzelergebnisse mit A2 im ELISA zeigten höhere OD₆₀₀ Werte als mit K39, was nach Sichtung der verfügbaren Literatur nicht zu erwarten war, aber auf die optimierte Sequenz zurückzuführen sein könnte. Dies und die klare Unterscheidung des A2-Antigens von viszeralen und kutanen Patientenseren (Daten nicht veröffentlicht) war ausschlaggebend für die Weiterverwendung von A2.

Für die weiteren Antigene Linf 27 und Linf 0809, die zur Kombination mit K39 und A2 ausgewählt wurden, sprachen die Länge der Aminosäuresequenz, die hohen Wiederholungsraten und nicht zuletzt die Reaktivität im ELISA (für Linf 27 Abbildung 14). Linf27 lieferte im Gegensatz zu den anderen potentiellen Antigenen hohe OD₆₀₀-Werte, was mit der hohen natürlichen Wiederholungsrate der Aminosäuresequenz, also mit einem hohen Antikörpertiter gegen dieses Epitop zusammenhängen könnte und als Hinweis für eine Immundominanz hoch repetitiver Aminosäuresequenzen gesehen werden kann. Bei Linf 0809 handelt es sich um eine Fusion aus einer Variation der K39-Sequenz und einer hoch repetitiven 12er Aminosäuresequenz (Tabelle 7). Diese zeigte im ELISA sehr gute OD₆₀₀ Werte (Daten nicht veröffentlicht).

4.3 ANTIGEN-FUSIONEN

Um den Aufwand an Material und Zeit zu minimieren und somit auch kostensenkend zu arbeiten, wurden die ausgewählten Proteine fusioniert. Dies hatte den zusätzlichen Effekt der besseren Anhaftung des Gesamtkonstrukts an der Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte. Ein Beispiel eines solchen Effekts könnte das Ergebnis des ELISAs in Abbildung 17 sein. Die Fusion der zwei beteiligten Antigene K39 und A2 (MAK) zeigt höhere Werte in der OD₆₀₀ als die bloße Mischung der zwei Proteine. Zu erklären ist dies auch unter anderem durch die Verwendung von flexiblen Spacerelementen (Adaptoren, Abbildung 16), die für eine optimale Faltung und Exposition der Epitope innerhalb der Gesamtkonstruktion sorgen.

4.4 DIAGNOSE MIT AK2708 ELISA

Die Fusion aller vier ausgewählten Proteine zu AK2708 zeigte höhere Werte im ELISA gegenüber dem Rohextrakt-ELISA. Außerdem ist die Trennung von klar negativen und klar positiven Seren beim ELISA mit AK2708 eindeutiger als beim Rohextrakt-ELISA (Abbildung 18 und 19). Ein exponentieller Effekt, wie er aufgrund der Ergebnisse von z.B. *Trypanosoma cruzi* [Hernandez 2008] zu erwarten war, trat nicht ein. Allenfalls war ein kumulativer Effekt zu beobachten. Ob das Wiederholungsmuster und die eingesetzten Varianten der Aminosäuresequenzen optimal sind, kann nur durch weitere systematische Studien belegt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies für das Ausbleiben eines exponentiellen Anstiegs in der Reaktivität verantwortlich sein könnte. Es bleibt aber auch offen, ob so ein Effekt bei *Leishmania* überhaupt zu erzielen ist, da bei den Untersuchungen zu *Trypanosoma cruzi* nicht eindeutig zu klären war, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist. Wäre es ein einzelnes Epitop, welches seine Wirkung erst innerhalb einer Fusion z.B. durch optimale Faltung erzielt, wäre dies nicht auf einen Erreger zu übertragen, der die Hauptmasse der Antikörperproduktion aufgrund einer Vielzahl von Stimulationen verschiedener Antigene hervorruft. Weder bei *Leishmania* noch bei *Trypanosoma cruzi* ist geklärt, ob ein solches immundominantes Epitop existiert.

Eine Verbesserung bestehender ELISAs ist bei der Unterscheidung der Seren mit kutaner von Seren mit viszeraler Leishmaniose gelungen. Die vier in Abbildung 20 als Ausreißer bezeichneten kutanen Leishmanioseseren stellten sich bei der Überprüfung durch PCR als viscerale Leishmanioseseren heraus. Dies wurde nicht durch die Fusion aus K39 und A2 (MAK) erkannt (Abbildung 20). Daraus ist zu schließen, dass eines der später zur Fusion hinzugefügten Proteine (Linf 0809 oder Linf 27) dafür verantwortlich ist. Auch der Rohextrakt-ELISA war nicht in der Lage, diese Seren positiv auf viszerale Leishmaniose zu testen. Die PCR-Primer haben die 18S rRNA von *Leishmania infantum* als Zielsequenz und wurden in der Arbeit von Ali (in Vorbereitung 2008) als diagnostische Primer etabliert.

Als ein Faktor für die Güte eines Tests für viszerale Leishmaniose wurde die Verwendung in verschiedensten Endemiegebieten definiert. Die verwendeten Seren waren vorher durch Rohextrakt-ELISA (spanische Seren), Formol Gel Test oder Mikroskopie (jemenitische Seren) getestet worden. Trotzdem wurden nur etwa 30%

der jemenitischen und 50% der spanischen Seren durch den ELISA mit AK2708 erkannt, was nicht für ein Defizit des hier entwickelten Tests sprechen muss, da auch der zur Kontrolle verwendete Rohextrakt ELISA tendenziell gleiche Ergebnisse zeigte (Abbildung 22). Die oben beschriebenen Testmethoden mit Rohextrakt-ELISA und Formol-Gel-Test sind, wie in der Einleitung schon beschrieben, unsicher. Im Gegensatz zu anderen Krankheiten ist es nicht unbedingt besser einen Patienten falsch positiv auf viszerale Leishmaniose zu testen als eine mögliche Erkrankung zu übersehen, da die Therapie mit den zur Zeit verfügbaren Medikamenten ernste Nebenwirkungen hat, die u.U. schlimmer sein können als die Krankheit selber.

Um mögliche Kreuzreaktionen, besonders mit Krankheiten in Lateinamerika auszuschließen, wurde der AK2708-ELISA mit Seren von Patienten, die an der Chagaskrankheit leiden und Patienten mit kutaner Leishmaniose aus Panama durchgeführt und mit den Ergebnissen aus einem Rohextrakt-ELISA verglichen. Nahezu alle Seren der Chagas-Patienten mussten mit dem Rohextrakt-ELISA als positiv bezeichnet werden, wobei der CutOff-Wert sehr niedrig war im Gegensatz zum CutOff-Wert beim AK2708 ELISA. Dies spricht für einen hohen Background des AK2708 Antigens, eventuell zurückzuführen auf LPS-Rückstände in der Antigenlösung. Ein zusätzlicher Reinigungsschritt in der Proteinextraktion würde den CutOff-Wert wahrscheinlich senken. Bei diesem Antigen waren jedoch fast alle Chagas-Patientenseren negativ. Drei deutlich positive Seren im AK2708 ELISA bedürfen einer eindeutigen Abklärung durch eine PCR. Da kein DNA-Material vorhanden war, konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Wie sich bei der Überprüfung der kutanen Leishmaniose-Seren aus dem Jemen gezeigt hat, ist jedoch nicht auszuschließen, dass die auffälligen Chagas-Seren eigentlich viszerale Leishmaniose-Seren sind oder zumindest eine Doppelinfektion vorliegt. Diese Annahme wird zusätzlich durch die beobachtete Kreuzreaktivität von Chagas Seren mit dem Rohextrakt-ELISA bestärkt. Der überaus niedrige CutOff-Wert bei diesem Rohextrakt-ELISA konnte durch Wiederholung bestätigt werden, ist jedoch nach wie vor im Gegensatz zu den anderen durchgeführten Rohextrakt-ELISAs auffällig. Es wurden für die Kalkulation des CutOff-Werts jemenitische Negativseren benutzt, da keine Leishmaniose-negativen Seren aus Lateinamerika verfügbar waren. Um ein genaueres Bild über Kreuzreaktionen mit Chagasseren zu bekommen, ist natürlich die Verwendung von lateinamerikanischen Negativseren nötig.

Die Seren von panamaischen Patienten, die an kutaner Leishmaniose leiden, waren im ELISA mit AK2708 alle deutlich negativ, hier war also keine Kreuzreaktion nachzuweisen. Im Rohextrakt-ELISA waren fünf von sechs Seren negativ, lagen aber nur knapp unter dem Cutoff-Wert, was die Ergebnisse mit dem Ak2708-ELISA tendenziell bestätigt. Somit unterscheidet das AK2708-Antigen zwischen kutaner und viszeraler Leishmaniose in der Alten und Neuen Welt.

Um diagnostische Tests auch für Entwicklungsländer verfügbar zu machen, sollten sie günstig in der Anschaffung bzw. in der Herstellung sein. Dadurch, dass die Antigene für diesen ELISA selbst synthetisiert wurden, können die Kosten minimiert werden. Die technische Ausstattung dafür und auch für die Durchführung dieses Tests ist minimal. Eine Möglichkeit, das AK2708-Antigen auch für die Anwendung im Feld zu nutzen, wäre die Entwicklung eines Dipstick-Tests, der nach dem Lateral-Flow-Prinzip funktioniert. Bei der Verwendung eines Dipstick-Tests entfällt eine Laborausstattung, da er direkt im Feld angewendet werden kann. Dies sorgt für eine weitere Reduktion der Kosten. Für das K39-Antigen gibt es bereits einen solchen Test. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist es möglich, dies auch mit AK2708 zu verwirklichen.

4.5 FAZIT

Die dargestellten Techniken und verwendeten Online-Programme zur Synthese von Antigenen sind geeignet, kostengünstig Antigene für einen ELISA herzustellen. DNAWorks stellt dabei eine wirkliche Erleichterung in der Oligosynthese dar. Die Verwendung des „Tandem Repeat Finder“ war nicht unbedingt erforderlich und wurde später eingestellt. Das für ein gutes Antigen aufgestellte Kriterium der hohen Wiederholungsrate der Aminosäuresequenzen konnten nicht eindeutig experimentell belegt werden. Belege gab es jedoch dafür, dass größere Proteine besser im ELISA reagieren als kleinere. Dies und die Verwendung einer Kombination aus Proteinen, die durch ihre Eigenschaften ein möglichst breites Spektrum an Erregern der viszeralen Leishmaniose und deren Varianten erkennen sollte, trugen dazu bei, dass insgesamt ein gegenüber Rohextrakten besseres Antigen gefunden wurde. Viszerale Leishmaniose wurde bei Patienten aus dem Jemen und Spanien gefunden und konnten klar von kutanen Fällen aus dem Jemen und Panama unterschieden

werden. Dies deutet auf eine mögliche Verwendung in unterschiedlichen Endemiegebieten hin. Ob die Problematik mit dem K39-Antigen viszerale Leishmaniose in sudanesischen Seren erkennen zu können mit dem Antigen AK2708 überwunden werden kann, bleibt mangels sudanesischer Seren offen. Die Nähe des Jemen zum ostafrikanischen Festland und somit zum Sudan, lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den Erregern von viszeraler Leishmaniose in diesen Gebieten um nahe verwandte Leishmanien-Arten handelt und die Verwendung des AK2708-Antigens somit möglich scheint.

Ein Einsatz des AK2708 Antigens in Südamerika ist aufgrund nicht auftretender Kreuzreaktionen mit Chagas-Patientenseren möglich. Zu klären bleibt, ob die geringe Anzahl der als positiv erkannten viszeralen Leishmaniosefälle in spanischen und jemenitischen Seren auf die ungenügende Vordiagnose zurückzuführen ist, wie die Ergebnisse mit dem Rohextrakt nahelegen, oder eine andere Ursache haben. Eine Möglichkeit, dieses neue Antigen günstig zu nutzen, ist die Entwicklung eines Dipsticks-Test auf der Grundlage der Lateral-Flow-Technik, wie er für K39 schon erhältlich ist. Die Verwendung des Ak2708-Antigens im ELISA erfordert immer noch ein minimal ausgestattetes Labor und geschultes Personal. Die Auswahl- und Klonierungsmethoden helfen die Kosten für die Entwicklung eines solchen Tests, wie dem in dieser Arbeit beschriebenen, zu reduzieren. Die beschriebenen Methoden können auf andere Krankheitserreger übertragen werden und zur Entwicklung kostengünstiger neuer Testverfahren genutzt werden.

5. LITERATUR

- Akilov ,O. E.; Kasuboski, R. E.; Carter, C. R.; McDowell, M. A. (2007).” The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis.” *Journal of Leukocyte Biology* Volume 81, May .
- Alexander, J.; Satoskar, A. R.;Russ, D. G. (1999).” *Leishmania* species: models of intracellular parasitism.” *Journal of Cell Science* 112, 2993-3002.
- Anders, R.F.; Shi, P.T.; Scanlon, D.B.; Leach, S.J.; Coppel, R.L.; Brown, G.V.; Stahl, H.D.; Kemp, D.J.; (1986).“ Antigenic repeat structures in proteins of *Plasmodium falciparum*” *Ciba Found Symp.*;119:164-83.
- Attar, Z. J.; Chance, M. L.; El-Safi, S.; Carney, J.; Azazy, A.; El-Hadi, M.; Dourado, C.; Hommel, M. (2001).” Latex agglutination test for detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis.” *Acta Tropica* 78 11- 16.
- Aytekin, A. M.; Alten, B. ; Caglar, S. S.; Ozbel, Y.; Kaynas, S.; Simse, F. M.; Kasap, O. E.; Belen A. (2007).” Phenotypic variation among local populations of phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in southern Turkey.” *Journal of Vector Ecology* December .
- Bañuls, A.-L.; Hide, M.; Prugnolle, F. (2007).” *Leishmania* and the Leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.” *Advances in Parasitology* Vol. 64.
- Barak, E.; Amin-Spector, S.; Gerliak, E.; Goyard, S.; Holland, N.; Zilberstein, D. (2005).“ Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response.” *Molecular & Biochemical Parasitology* 141 99–108.
- Baschong, W.; Hasler, L.; Häner, M.; Kistler, J.; Aebi, U. (2003). „Repetitive versus monomeric antigen presentation: direct visualization of antibody affinity and

- specificity." *Journal of Structural Biology* Volume 143, Issue 3, September , Pages 258-262.
- Bates, P. A. (2007).“ Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies.” *International Journal for Parasitology* 37 1097–1106.
- Belen, A. and Alten, B. (2005).“ Variation in life table characteristics among populations of *Phlebotomus papatasi* at different altitudes.” *Journal of Vector Ecology* Vol. 31, no. 1.
- Benson, G. (1999).“ Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.” *Nucleic Acids Research* Vol. 27, No. 2, pp. 573-580.
- Besteiroa, S.; Williamsa, R. A. M.; Coombs, G. H.; Mottrama J. C. (2007).“ Protein turnover and differentiation in *Leishmania*.” *Int J Parasitol.* August ; 37(10): 1063–1075.
- Bimboim, H. C. and Doly, J. (1979).“ A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA”. *Nucleic Acids Research*, Vol. 7, No. 6 1513-1523.
- Bogdan, C. and Röllinghoff, M. (1999).“ How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages?” *Parasitology Today*, vol. 15, no. 1.
- Brittingham, A.; Chen, G.; McGwire, B. S.; Chang, K-P.; Mosser, D. (1999).“ Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin.” *Infection and Immunity*,Sept. p. 4477–4484.
- Brittingham, A.; Morrison, C.; McMaster, W. R.; McGwire, B. S.; Chang, K-P.; Mosser, D. M. (1995).“ Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis.” *The Journal of Immunology*.
- Burchmore, R. J. S.; Barrett, M. P. (2001).“ Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes.” *International Journal for Parasitology* 31 1311–1320.

- Burns, J. M.; Wayne, J. R.; Shreffler, G.; Benson, D. R.; Ghalib, H. W.; Badaro, R.; Reed, S. G. (1993).” Molecular characterization of kinesin-related antigen of *L. chagasi* that detects specific antibody in african and american visceral leishmaniasis.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, pp 775-779, January.
- Chappuis, F. ; Mueller, Y. ; Nguimfack, A.; Rwakimari, J. B.; Couffignal, S. B. M. ; Cavaller, P. ; Loutan, L. ; Piola, P. (2005).“ Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. J Clin Microbiol. Dec;43(12):5973-7.
- Chappuis, F.; Rijal, S. ; Soto, A. ; Menten, J. ; Boelaert, M. (2006).“ A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis.” BMJ. 2006 Oct 7;333(7571):723. Epub Aug 1.
- Choudhry, A.; Guru, P.Y.; Saxena, R. P.; Tandon, A.; Saxena, K.C. (1990).” Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India. Trans R Soc Trop Med Hyg. May-Jun;84(3):363-6.
- Corradin, G.; Villard, V.; Kajava, A. V. (2007).” Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against Malaria and other pathogens.” Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets(Formerly Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders), Volume 7, Number 4, December , pp. 259-265(7).
- Cross, E. R.; Hyams, K. C. (1996).” The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia.” Volume 104, Number 7, July, Environmental Health Perspectives.
- Daar, A. S.; Thorsteinsdóttir, H.; Martin, D. K.; Smith, A. C.; Nast, S.; Singer, P. A. (2002).” Top ten biotechnologies for improving health in developing countries.” Nat Genet. Oct;32(2):229-32.
- De Colmenares, M.; Portus, M.; Riera, C.; Gallego, M.; Aisa, M. J.; Torras, S.; Munoz, C. (1995).” Short report: detection of 72-75 kD and 123 kD fractions of

- Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg. May;52(5):427-8.
- Debrabant, A.; Joshib, M. B.; Pimentac, P. F. P.; Dwyer, D. M. (2004)." Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics." International Journal for Parasitology 34 205–217.
- Descoteaux, A.; Turco, S. J. (1999)." Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity." Biochimica et Biophysica Acta 1455 341-352.
- Desjardins, M. (2003)." ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions." Nature Reviews Immunology 280 April, Volume 3.
- Do Nascimento, J. C.; De Pavia, B. R.; Dos Santos Malafrente, R.; Fernandes, W. D.; Bianchi, G. E. A. (2007)." Natural Infection of Phlebotomines (*Diptera: Psychodidae*) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso Do Sul, Brasil." Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 49(2):119-122, March-April.
- Dobson, D. E.; Scholtes, L. D.; Valdez, K. E.; Sullivan, D. R.; Mengeling, B. J.; Cilmi, S.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. (2003)." Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required for species-specific modifications of the lipophosphoglycan adhesin controlling *Leishmania major*-sandfly interactions." The Journal of Biological Chemistry Vol. 278, No. 18, Issue of May 2, pp. 15523–15531, 2003.
- Domínguez, M.; Moreno, I.; Aizpurua, C., Toraño, A. (2003)." Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood." Microbes and Infection 5, 507–513.
- Englund, P. T.; Guilbride, L. S.; Hwa, K. Y.; Johnson, C. E.; Li, C.; Rocco, L. J.; Torri, A. F. (1996)." Kinetoplast DNA: structure and replication." Biology of parasitic protozoa, Oxford Press Oxford , England.
- Fehr, T.; Bachmann M. F.; Bucher, E.; Kalinke, U.; Padova, F. E.; Lang, A. B.; Hengartner, H.; Zinkernagel, R. M. (1997)." Role of repetitive antigen patterns for

- induction of antibodies against antibodies." J. Exp. Med. Volume 185, Number 10, May 19, 1785–1792.
- Ferguson, M. A. J. (1997)." The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites." Phil.Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1295-1302.
- Freire de Melo Ximenes, M. d. F.; De Souza, M. d. F.; Castellón, E. G. (1999)." Density of sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(4): 427-432, Jul./Aug. .
- Gao, X.; Yo, P.; Keith, A.; Ragan, T. J.; Harris, T. K. (2003)." Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: a novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences." Nucleic Acids Res. November 15; 31(22).
- Ghedini, E.; Zhang, W. W.; Charest, H.; Sundar, S.; Kenney, R. T.; Matlashewski, G. (1997)." Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis." Clin Diagn Lab Immunol. Sep;4(5):530-5.
- Global Forum for Health Research (2000)." 10/90 Report on health research 2000." Published by the Global Forum for Health Research SBN 2-940286-16-7.
- Goto, Y.; Coler, R. N.; Guderian, J.; Mohamath, R.; Reed, S. G. (2006)." Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins." Infection and Immunity, July, p.3939-3945 Vol. 74 No. 7
- Goto, Y.; Coler, R. N.; Reed, S. G. (2007)." Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex." Infection and Immunity, Feb., p. 846–851.

- Gregory, D. J., Sladek, R.; Olivier, M.; Matlashewsk, G. (2008).” Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression.” *Infection and Immunity*, March, p. 1186-1192, Vol. 76, No. 3.
- Handman, E.; Bullen, D. V. R. (2002).” Interaction of *Leishmania* with the host macrophage.” *Trends in Parasitology* Vol.18 No.8 August.
- Handman, E. (1999).“ Cell biology of *Leishmania*.” *Adv Parasitol.*; 44:1-39. Review.
- Hassan, M. Q.; Ghosh, A.; Ghosh, S. S.; Gupta, M.; Basu, D.; Mallik, K. K.; Adhya, S. (1993).” Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis.” *Parasitology*. Dec;107 (Pt 5):509-17.
- Hernández-Pastor, P. (2008).” Affordable diagnosis for Chagas disease.” Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Hertz-Fowler, C.; Peacock, C. S.; Wood, V.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Mooney, P., Tivey, A.; Berriman, M.; Hall, N.; Rutherford, K.; Parkhill, J.; Ivens, A. C.; Rajandream, M. A.; Barrell, B. (2004).” GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms.” *Nucleic Acids Res.* Jan 1;32_(Database issue) :D339-43.
- Hochuli, E. (1990).“ Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent.” *Genet Eng (N Y)*;12:87-98. Review.
- Hoover, D.M.; Lubkowski, J. (2002).” DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis.” *Nucleic Acids Res.* May 15;30(10):e43.
- Ilg, T. (2000).“ Proteophosphoglycans of *Leishmania*.” *Parasitology Today*, vol. 16, no. 11.
- Johnson, R. N.; Lawyer, P. G.; Ngumbi, P. M.; Mebrahtu, Y. B.; Mwanyumba, P. J.; Mosonik, N. C.; Makasa, J. S.; Githure, J. I.; Roberts, C. R. (1999).” Phlebotomine

- sandfly (*Diptera:Psychodidae*) seasonal Distribution And Infection Rates In A Defines Focus of *Leishmania Tropica*." Am. J. Trop. Med. Hyg., 60(5), pp. 854–858.
- Körner, U.; Fuss, V.; Steigerwald, J. and Moll H. (2006).“ Biogenesis of *Leishmania major*-harboring vacuoles in murine dendritic cells.”Infection And Immunity, Feb., p. 1305–1312 Vol. 74, No. 2.
- Kumar, R.; Pai, K.; Pathak, K.; Sundar, S. (2001).” Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis.” Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Nov;8(6):1220-4.
- Liew, F.Y.; Millott ,S. M. and Schmidt J. A. (1990).” A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T-helper type 2 cells and enhance disease progression.” J. Exp. Med. Volume 172 November p. 1359-1365
- Malchiodi, E. L.; Chiaramonte, M.G.; Taranto, N.J.; Zwirner, N.W. and A. Margni (1994).” Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6).” Clin Exp Immunol. September; 97(3): 417–423.
- Marfurt, J . (2003).“ Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP.” Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Volume 46 , Issue 2 ,Pages 115 – 124.
- McConville, M. J.; Schnur, L. F.; Jaffet, T. C. and Schneider, P. (1995).“ Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species.” Biochem. J. 310, 807-818.
- McConville, M. J.; Mullin, K. A.; Ilgoutz, S. C. and Teasdale, R. D. (2002).” Secretory pathway of trypanosomatid parasites.” Microbiology And Molecular Biology, Mar., p. 122–154.

- Mellenthin, K. (2003).“ Identifizierung tropismus-relevanter gene aus *Leishmania donovani* (ROSS, 1903) durch genetische komplementation.“ Dissertation, Bremen.
- Melo, M.N.; Mayrink W.; Da Costa, C.A.; Magalhaes, P.A.; Dias, M.; Williams, P.; Araujo, F.G.; Coelho, M.V.; Batista, S.M. (1977).“ Standardization of the Montenegro antigen.” *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. May-Jun;19(3):161-4.
- Mettler, M.; Grimm, F.; Capelli, G.; Camp, H. and Deplazes, P. (2005).“ Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs.” *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. p. 5515–5519.
- Mohammed, E. A. R.; Wright, P. A.; Kager, P. A.; Laarman, J. J. & Pondman, K. W. (1985).“ ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar.” *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79, 344–350.
- Moral, L., Rubio, E.M. and Moya, M. (2002).“ A leishmanin skin test survey in human population of I ‘Alacantí Region (Spain): Implications for epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96, 129-132.
- Mosser, D. M. and Edelson, P. J. (1987).“ The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*.” *Nature* Vol. 327 28 May.
- Mosser, D. M.; Springer T. A. and Diamond, M. S. (1992).“ *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1(CD11b/CD18).” *The Journal of Cell Biology*, Volume 116.
- Naderer, T. and McConville, M. J. (2008).“ The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective.” *Cellular Microbiology* 10(2), 301–308.

- Nardin, E., Munasinghe, Y.D.; Moreno, A.; Clavijo, P.; Calle, M.C.; Edelman R.; Davis, J., Herrington, D.; Nussenzweig, R.S. (1992).“ T cell responses to repeat and non-repeat regions of the circumsporozoite protein detected in volunteers immunized with *Plasmodium falciparum* sporozoites.” Mem Inst Oswaldo Cruz.; 87 Suppl 3:223-7. Review.
- Noyes, H.; Chance, M.; Ponce, C.; Ponce, E. and Maingon, R. (1997).” *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans.” Experimental Parasitology 85, 264–273.
- Olivier, M.; Gregory, D. J. and Forget, G. (2005).” Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.” Clinical Microbiology Reviews, Apr., p. 293–305.
- Passos, V.M.; Barreto, S.M.; Romanha, A.J.; Krettli, A.U.; Volpini, A.C.; Lima e Costa, M.F.. (2000).” American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment.” Bull World Health Organ.;78(8):968-74.
- Pimenta, P. F. P.; Saraiva, E. M. B.; Rowton, E.; Modi, G. B.; Garraway, L. A.; Beverly, S. M.; Turcos, S. J.; Sacks, D. L. (1999).” Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91, pp. 9155-9159, September Medical Sciences.
- Ponte-Sucre, A. (2003).” Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy.” Kinetoplastid Biology and Disease, 2:4.
- Porrozzi, R.; Santos da Costa, M. V.; Teva, A.; Falqueto, A.; Ferreira, A. L.; Dos Santos, C. D.; Fernandes, A. P.; Gazzinelli, R. T.; Campos-Neto, A. and Grimaldi, G., (2007).” Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs.” Clin Vaccine Immunol. May; 14(5): 544–548.

- Rittig, M. G. and Bogdan, C. (2000).” *Leishmania*–host-cell Interaction: complexities and alternative views.” *Parasitology Today*, vol. 16, no. 7, 2000.
- Rittig, M.G.; Schröppel, K.; Seack, K.H.; Sander, U.; N’Diaye, E. N.; Maridonneau-Parini, I.; Solbach, W.; Bogdan, C. (1998).” Coiling phagocytosis of Trypanosomatids and fungal cells.” *Infection and Immunity* Sept., p. 4331–4339 Vol. 66, No. 9.
- Robinson, M.,;Lilley, R.; Little, S.; Emtage, J.S.; Yarranton, G.; Stephens, P.; Millican, A.; Eaton, M.; Humphreys, G. (1984).” Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*.” *Nucleic Acids Res.* 19 Sep 11;12(17):6663-71.
- Ronet, C.,; Voigt, H.; Himmelrich, H.; Doucey, M.-A.; Hauyon-La Torre, Y.; Revaz-Breton, M.; Tacchini-Cottier, F.; Bron, C.; Louis, J. and Launois, P. (2008).” *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice.” *The Journal of Immunology*, 180: 4825-4835.
- Rodriguez, A.; Samoff, E.; Rioult, M. G.; Chung, A. and Andrews, N. W. (1996).” Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport.” *The Journal of Cell Biology*, Volume 134, Number 2, July 1996 349-362.
- Rogers, M. E.; Chance, M. L. and Bates, P. A. (2002).” The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*.” *Parasitology*, 124, 495-507. 2002 Cambridge University Press.
- Rogers, M. E.; Bates, P. A. (2007).” *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission.” *PLoS Pathogens*, June, Volume 3, Issue 6.

- Rogers, M. E.; Ilg, T.; Nikolaev, A. V.; Ferguson, Michael A. J. and Bates, P. A. (2004).” Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG.” *Nature* Vol430, 22 July.
- Rosário, E. Y.; Genaro, O.; Franca-Silva, J. C.; da Costa, R. T.; Mayrink, W.; Reis, A. B.; Carneiro, M. (2005).” Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis.” *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Apr;100(2):197-203.
- Rosati, S.; Ortoffi, M.; Profiti, M.; Manelli, A.; Mignone, W.; Bollo, E. and Gradoni, L. (2003).” Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis.” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Nov., p. 1153-1156.
- Rotureau, B.; Gaborit, P.; Issaly, J.; Carinci, R.; Fouque, F. and Carne, B. (2006).” Diversity and ecology of sand flies (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) in coastal French Guiana.” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(1), pp. 62–69.
- Russel, D. G.; Xu, S. and Chakraborty, P. (1992).“ Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages.” *Journal of Cell Science* 103, 1193-1210.
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001).” Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis.” *Annu. Rev. Microbiol.* 55:453–83.
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N. (2002).” The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.” *Nature Reviews, Immunology* Volume 21 November.
- Sacks, D. L.;Pimenta, P. F. P.; McConville, M. J.;Schneider, P. and Turco, S. J. (1995).” Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface

- lipophosphoglycan." *The Journal of Experimental Medicine* 9 Volume 181 February 685-697.
- Salotra, P.; Singh, R. (2005)." Rapid & reliable diagnostic tests for visceral leishmaniasis." *Indian J Med Res. Dec*;122(6):464-7.
- Santarem, N.; Silvestre, R.; Tavares, J.; Silva, M.; Cabral, S.; Maciel, J. and Cordeiro-da-Silva, A. (2007)." Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume.
- Schlein, J.; Jacobson, R. L. and Messer, G. (1992)." *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp. 9944-9948, October.
- Simsek, F. M.; Alten, B.; Caglar, S. S.; Ozbel, Y.; Aytekin, A. M.; Kaynas, S.; Belen, A.; Kasap, O. Erisoz; Y. M. and Rastgeldi, S. (2007)." Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous Leishmaniasis." *Journal of Vector Ecology* Vol. 32, no. 2.
- Singh, S.; Gilman-Sachs, A.; Chang, K.P.; Reed, S.G. (1995)." Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis." *J Parasitol. Dec*;81(6):1000-3.
- Singh, S. (2006)." New developments in diagnosis of Leishmaniasis." *Indian J. Med. Res.* 123, March, pp 311-330
- Smrkovski, L. L.; Larson, C. L. (1977)." Antigenic cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* (BCG) and *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* Nov;18(2):561-2.
- Smyth, A. J.; Ghosh A.; Hassan, M. Q.; Basu, D.; De Bruijn, M. H.; Adhya, S.; Mallik, K. K.; Barker, D. C. (1992)." Rapid and sensitive detection of *Leishmania*

- kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients.” *Parasitology*. Oct;105 (Pt 2):183-92.
- Soares, R. P.P.; Macedo; M. E.; Ropert, C.; Gontijo, N. F.; Almeida, I. C.; Gazzinelli, R.T.; Pimenta, P.F.P.; Turco, S. J. (2002).” *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*.” *Molecular & Biochemical Parasitology* 121 213/224.
- Sundar, S. and Rai, M. (2002).” Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis.” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Sept., p. 951–958.
- Sutherst, R. W. (2004).” Global change and human vulnerability to vector-borne diseases.” *Clinical Microbiology Reviews*, Jan., 136-173.
- Van Eys, G. J.; Schoone, G. J.; Kroon, N. C.; Ebeling, S. B. (1992).” Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites.” *Mol Biochem Parasitol*. Mar;51(1):133-42.
- Vannier-Santoz, M. A.; Martiny, A.; De Souza, W. (2002).” Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading.” *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 8, No. 4.
- Vinayak, V. K.; Mahajan, D.; Sobti, R. C.; Singla, N.; Sundar, S. V. (1994).” Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis.” *Indian J Med Res*. Mar;99:109-14.
- Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979).“ Preparative and analytical purification of DNA from agarose.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb;76(2):615-9.
- Waki, K; Duatta, S.; Ray, D.; Kolli, K. B.; Akman, L; Kawazu, S.-I.; Lin, C.-P.; Chang K.-P. (2007).”Transmembrane molecules for phylogenetic analysis of pathogenic protists: *Leishmania*-specific informatic sites in hydrophilic loops of trans-endoplasmatic reticulum N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase.” *Eukaryotic Cell*, Feb.

- Wakid, M. H. and Bates, P. A. (2004).” Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film in vitro.” *Experimental Parasitology* 106 173–178.
- Waller, R. F.; McConville, M. J. (2002).“ Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites.“ *International Journal for Parasitology* 32 1435–1445.
- Wickstead B.; Ersfeld, K. and Gull, K. (2003).” Repetitive elements in genomes of parasitic protozoan.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept., p. 360-375 Vol. 67, No. 3.
- Xiong, A.-S.; Yao, Q.-H.; Peng, R.-H.; Li, X.; Fan, H.-Q.; Cheng, Z.-M. and Li, Y. (2004).” A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences.” *Nucleic Acids Res.*; 32(12).
- Yao, C.; Donelson, J. E. and Wilson, M. E. (2007).” Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania spp.* and their differential release from promastigotes.” *Eucaryotic Cell* Oct., p. 1905-1912.
- Zhang, W. W.; Charest, H.; Ghedin, E.; Matlashewski, G. (1996).” Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* Jun;78(1-2):79-90.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten

Giessen im Juni 2008