

Identifizierung von neuen Peptidkandidaten für die Impfstoff- Entwicklung gegen die murine kutane Leishmaniasis

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Kirsten Schwonberg
geboren
in Hamburg

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfen und ausschließlich unter Berücksichtigung der in der Arbeit angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden sowie Angaben, die auf mündlichen Informationen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

- Kirsten Schwonberg -

INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Versicherung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
I Abbildungsverzeichnis.....	VII
II Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. A Zusammenfassung.....	1
1. B Summary.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1 Leishmaniasis.....	6
2.1.1 Lebenszyklus von <i>Leishmania (L.) major</i>	8
2.1.2 Experimentelle Infektion der murinen kutanen Leishmaniasis.....	11
2.1.3 Dendritische Zellen (DC) in der Leishmaniasis.....	13
2.1.4 CD8 ⁺ T-Zellen in der Leishmaniasis, priming und MHC Klasse-I Präsentation.....	14
2.1.5 Beispiele von Vakzinierung mit Leishmanien.....	16
2.2 <i>In silico</i> Analyseverfahren.....	18
2.2.1 Vom Protein zum immundominanten Epitop.....	18
2.2.1.1 SYFPEITHI: Bindungsaffinität von Peptiden an MHC I-Moleküle.....	18
2.2.2 Bindungsstabilität von Peptiden an MHC I-Moleküle.....	21
3. Ziel der Arbeit.....	24
4. Ergebnisse.....	25
4.1 Optimierung Peptid-spezifischer Restimulation von Leishmania-spezifischen T-Zellen... 25	
4.2 Testen einer überlappenden Peptid-Bibliothek <i>in vitro</i>	30
4.3 Testen von vorhergesagten CD8-Peptiden <i>in vitro</i>	34
4.4 Zusammenfassende Analyse der <i>in vitro</i> Daten.....	37
4.5 Immunisierungen mit ausgewählten CD8-Peptiden <i>in vivo</i>	41
4.5.1 Der Prime/Boost-Ansatz als Immunisierungs-strategie.....	42
4.5.2 Parasitenlasten in Woche 6 nach der Infektion.....	44
4.5.3 Peptid-Pools zur Verstärkung des Immunisierungseffekts.....	45
4.5.4 Immunisierungsversuche mit IL-4 ^{-/-} Mäusen.....	47

4.5.5	Der Prime/Boost/Boost-Ansatz als Immunisierungsstrategie.....	49
4.5.6	Intrazelluläres FACS nach Peptid-Restimulation.....	51
4.5.7	Zusammenfassende Analyse der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten.....	53
5.	Diskussion.....	55
6.	Ausblick.....	69
7.	Material.....	71
7.1	Parasiten.....	71
7.2	Verbrauchsmaterialien.....	71
7.3	Geräte.....	72
7.4	Reagenzien.....	73
7.5	Zusammensetzung der Puffer.....	75
7.6	MACS-Antikörper.....	76
7.7	FACS-Antikörper.....	76
7.8	ELISA-Kits.....	78
8.	Methoden.....	79
8.1	Zellbiologische Methoden.....	79
8.1.1	Isolation und Kultivierung von DCs.....	79
8.1.2	Isolation der Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen.....	80
8.1.3	Isolierte Zellen zählen.....	81
8.1.4	Kokultur aus Peptidbeladenen DC und geprimten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	81
8.1.5	Isolation und Aufreinigung von Amastigoten.....	82
8.1.6	Kultivierung und Aufreinigung von Promastigoten.....	83
8.1.7	Herstellung von soluble Leishmania antigen (SLA).....	83
8.1.8	Intradermale Infektion von C57BL/6 Mäusen.....	84
8.1.9	Subkutane Infektion von BALB/c Mäusen.....	84
8.1.10	Immunisierung von C57BL/6 Mäusen.....	85
8.1.11	Berechnung der Läsionsvolumina.....	86
8.1.12	Bestimmung der Parasitenzahl in den Ohren und in der Milz.....	87
8.2	Immunologische Methoden.....	88
8.2.1	BCA Assay.....	88
8.2.2	MACS.....	88

8.2.3 FACS.....	89
8.2.4 Intrazelluläres FACS.....	90
8.2.5 ELISA.....	92
8.3 Statistische Auswertung.....	92
9. Peptidverzeichnis.....	93
9.1 Peptide der LACK-Bibliothek.....	93
9.1.1 Peptidliste der LACK-Bibliothek.....	93
9.2 Peptide aus beiden Lebensformen von <i>L. major</i>	94
9.2.2 Peptidliste der Peptide aus beiden Lebensformen von <i>L. major</i>	94
III Literaturverzeichnis.....	XV
IV Danksagung.....	XXV
V Förderung.....	XXVI
VII Curriculum vitae.....	XXX

I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Weltweite Verbreitungsgebiete der kutanen Leishmaniasis.....	7
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>L. major</i>	8
Abbildung 3: Zelluläre Aktivierung nach einer Infektion mit <i>L. major</i>	10
Abbildung 4: Model der Th1-/Th2-Entwicklung während einer Infektion mit <i>L. major</i>	12
Abbildung 5: Epitopgenerierung und MHC Klasse-I Präsentation von Leishmania-Peptiden...	15
Abbildung 6: Darstellung der Peptidauswahl.....	20
Abbildung 7: Schematische Grafik des Dissoziationsdiagramms.....	22
Abbildung 8: Qualitäts-FACS der Oberflächenmoleküle der DC an Tag 6 nach der Isolierung aus dem Knochenmark (KM).....	25
Abbildung 9: Qualitäts-FACS der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	26
Abbildung 10: Zytokinprofile der Kokulturen bestehend aus CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ T-Zellen und unterschiedlich vorbehandelten DC.....	28
Abbildung 11: Die LACK-Bibliothek.....	31
Abbildung 12: CD4 ⁺ T-Zell-spezifisches Zytokinprofil nach Restimulation mit Peptiden aus der LACK-Bibliothek.....	32
Abbildung 13: CD8 ⁺ T-Zell-spezifisches Zytokinprofil nach Restimulation mit Peptiden aus der LACK-Bibliothek.....	33
Abbildung 14: Korrelation zwischen der Affinität und der Bindungsstabilität der Peptide gegenüber MHC I-Molekülen.....	35
Abbildung 15: Kokultur aus peptidbeladenen DC und CD8 ⁺ T-Zellen.....	36
Abbildung 16: Kreuzanalyse der Zytokine gegen den SYFPEITHI-Score und die Bindungsstabilität der Peptide.....	38
Abbildung 17: Kreuzanalyse der verschiedenen Zytokine IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10.....	40
Abbildung 18: Auswahl der Peptide für <i>in vivo</i> Versuche.....	41
Abbildung 19: Verschiedene Peptide als mögliche Vakzine im P/B-Ansatz.....	43
Abbildung 20: Parasitenlasten nach Immunisierung mit ausgewählten Peptiden.....	45
Abbildung 21: Verwendung von Peptid-Pools zur Verstärkung der Immunisierung.....	46
Abbildung 22: Immunisierung von C57BL/6 IL4 ^{-/-} Mäusen.....	48
Abbildung 23: Läsionsvolumina von C57BL/6 Mäusen im P/B/B-Ansatz.....	50
Abbildung 24: Intrazelluläres Zytokinprofil nach Restimulation mit p38, p54 und p69.....	52

Abbildung 25: Tabellarische Darstellung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten.....	53
Abbildung 26: Prime/boost Immunisierungsschema.....	85
Abbildung 27: Prime/boost/boost Immunisierungsschema.....	86

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1x	einfach konzentriert
10x	10-fach konzentriert
¹²⁵ I-	radioaktives Jod
-/-	engl.: <i>knock-out</i> ; ausgeschaltetes Gen
°C	Grad Celsius
α	anti-
β ₂ m	β ₂ -Mikroglobulin
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
π	phi: 1,61803399
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
aLM	amastigote Lebensform von <i>L. major</i>
APC	engl.: <i>antigen presenting cell</i> ; Antigenpräsentierende Zelle
APC-eFluor780	Tandem Fluorchrom; gemessen im roten Laser (780 nm)
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
bp	engl.: <i>basepairs</i> ; Basenpaare
BSA	Bovine-Serum-Albumin
CD	engl.: <i>Cluster of differentiation</i>
CFA	engl.: <i>complete Freund's Adjuvant</i> ; komplettes Freund's-Adjuvanz
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid

CpG	Oligodesoxynukleotide ODN1826
CR3	engl.: <i>complement receptor 3</i> ; Komplementrezeptor 3
Cu ⁺	Kupferion
d.h.	das heißt
DC	engl.: <i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
dLN	engl.: <i>draining lymphnodes</i> ; drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl-Suloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eFluor450	organischer Farbstoff, gemessen im violetten Laser (405 nm)
ELISA	engl.: <i>Enzyme linked Immuno-sorbent Assay</i>
et al.	et alii; und andere
FACS	engl.: <i>Fluorescence activated cell sorting</i> ; Fluoreszenzaktivierte Zellseparation
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	engl.: <i>forward-scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GM-CSF	engl.: <i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
gy	gray; Angabe der durch ionisierende Strahlung verursachten Energiedosis. Beschreibt die pro Masse absorbierte Energie.
h	engl.: <i>hour</i> ; Stunde(n)
H2-D ^b	Maus-spezifischer MHC-Haplotyp (Peptide als Nonamere)

H2-K ^b	Maus-spezifischer MHC-Haplotyp (Peptide als Oktamere)
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
ic FACS	engl.: <i>intracellular FACS</i> ; intrazelluläres FACS
IFA	engl.: <i>incomplete Freund's Adjuvant</i> ; inkomplettes Freund's-Adjuvanz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>in silico</i>	Vorgänge, die im Computer ablaufen
<i>in vitro</i>	Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden
<i>in vivo</i>	Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilo-Dalton
KM	Knochenmark
KSAC	rekombinantes <i>Leishmania</i> Protein
kV	Kilo-Volt
L	Liter
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LACK	<i>Leishmania homologue of receptors for activated C kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	engl.: <i>magnetic cell separation</i> ; magnetische Zellseparation
MΦ	Makrophage(n)
mean	Mittelwert
mg	Milligramm

MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> ; Major-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	molare Stoffmenge pro Liter (mol/L)
n	Anzahl unabhängiger Versuche
n.d.	nicht detektiert
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ PO ₄	Natriumhydrogenosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
ng/mL	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
nm/mL	Nanomolar pro Milliliter
NO	Stickstoffoxid
ODN	Oligodesoxynukleotide (ODN) 1826
p	p-Wert des studentischen t-Test
P/B	Prime/Boost-Ansatz (10 µg/10 µg)
P/B/B	Prime/Boost/Boost-Ansatz (20 µg/10 µg/10 µg)
PBS	engl.: <i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral Blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyan7
PFA	Paraformaldehyd
pg/mL	Pikogramm pro Milliliter

pH	potentia Hydrogenii; Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
pLM	promastigote Lebensform von <i>L. major</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Prof.	Professor
r ²	Bestimmtheitsmaß
RPMI	Kulturmedium für humane/tierische Zellen; Formulierung von G. E. Moore und Kollegen am „Roswell Park Memorial Institute“
s.c.	subkutan
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLA	engl.: <i>soluble Leishmania antigen</i> ; lösliches Leishmanien Antigen
SPF	engl.: <i>specific pathogen free</i>
spp.	Spezies
SSC	engl.: <i>sidewards-scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
SYFPEITHI	Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive
TAP	engl.: <i>transporter associated with antigen presentation</i>
TAT	transactivator Protein; aus HIV-1
Tc	engl.: <i>cytotoxic T cells</i> ; zytotoxische T-Zellen
TEA	Triethanolamin
Th	engl.: <i>T helpercells</i> ; T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
T-Zellen	T-Lymphozyten
U ^{-min}	Umdrehungen pro Minute

Univ. Prof.	Universitäts-Professor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1. A ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen mit dem Parasiten *Leishmania (L.) major* werden durch den Biss von Sandmücken hervorgerufen. Die Heilung der Leishmaniasis basiert auf der Sekretion von Interferon (IFN) γ durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Allerdings ist aktuell noch unklar, welche Proteine/Peptide des Parasiten für die Aktivierung der T-Helfer (Th)1-Zellen und somit für die Ausheilung der Erkrankung verantwortlich sind. Folglich existiert gegenwärtig noch kein adäquates Vakzin gegen die kutane Leishmaniasis. Da bisher nur ein einziges CD4⁺ T-Zell-spezifisches Peptid von *L. major* bekannt ist, das sogenannte LACK-Protein, ist die Identifikation weiterer Proteine und Peptide, die maßgeblich an der Heilung beteiligt sind, von großem Interesse.

Um zunächst Peptide zu identifizieren, die aus dem LACK-Protein stammen und während der Immunisierung vermehrt die Freisetzung von IFN γ induzieren, wurde eine überlappende Peptid-Bibliothek des 36 kDa schweren LACK-Proteins erstellt. Diese besteht aus 47 zu untersuchenden Peptiden und 3 Kontrollpeptiden. Eine erhöhte Sekretion von IFN γ durch CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen konnte durch keines der Peptide induziert werden. Allerdings wurde durch Peptid-spezifische Restimulation vermehrt IL-4 und IL-10 von beiden T-Zell-Populationen freigesetzt. Ein Th1/zytotoxische T-Zell (Tc)1-aktivierendes Peptid konnte in dieser Datenbank somit nicht identifiziert, die Th2 induzierende Eigenschaft des LACK-Proteins jedoch bestätigt werden.

Um aus dem Gesamtpool an Proteinen und Peptiden des Parasiten mögliche Vakzinkandidaten zu identifizieren, wurden basierend auf vorangegangenen *in silico* Versuchen 300 Peptide aus beiden Lebensformen von *L. major* ausgewählt. Diese Peptide wurden entsprechend ihrer vorhergesagten Bindungsaffinität gegenüber MHC I-Molekülen ausgesucht, um anschließend auf ihre Bindungsstabilität, d.h., wie lange sie an MHC I-Molekülen binden können, genauer untersucht zu werden. Ergebnis war, dass es zwischen den beiden Parametern Bindungsaffinität und Bindungsstabilität keine Korrelation gibt. Die Auswahl an Peptiden konnte durch diese Verfahren nicht weiter eingegrenzt werden konnte, wurden schließlich alle 300 Peptide in *in vitro* Versuchen auf ihr spezifisches Zytokinprofil hin untersucht. Dafür wurden dendritische Zellen

(DC) aus naiven C57BL/6 Mäusen generiert, die im Anschluss mit den jeweiligen Peptiden und MACS-aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen aus infizierten C57BL/6 Mäusen für 48 h kokultiviert wurden. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA auf die sekretierten Mengen an IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10 untersucht. 53 der analysierten Peptide induzierten bei den in der Kokultur vorhandenen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle ohne Antigen eine verstärkte IFN γ Sekretion. Basierend auf dem jeweiligen Zytokinprofil sind dann 15 verschiedene Peptide für weitere *in vivo* Versuche ausgewählt worden. Dafür sind C57BL/6 Mäuse zweimal intradermal in das eine Ohr - in einem sogenannten prime/boost (P/B)-Ansatz - mit je 10 μ g Peptid in Kombination mit CpG als Adjuvanz immunisiert worden. Zwei Wochen später sind dieselben Mäuse mit 10³ metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert worden. Die Läsionen wurden wöchentlich gemessen. Drei der ausgewählten Peptide waren in der Lage, die Mäuse partiell vor einer Infektion mit *L. major* zu schützen, da die Ohrläsionen im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe kleiner waren. Allerdings konnte dieser Effekt bei der genauen Analyse der Parasitenzahlen in der Milz und den Ohren nicht bestätigt werden. Die jeweilige Anzahl der Parasiten war stets vergleichbar mit der PBS-Kontrolle. Ebenso wenig konnten die Läsionen durch Verwendung von Peptid-Pools weiter reduziert werden. Daher wurde die Immunisierungsstrategie geändert. C57BL/6 Mäuse wurden nun in einem prime/boost/boost (P/B/B)-Ansatz zunächst mit 20 μ g Peptid und CpG als Adjuvanz, gefolgt von zwei weiteren Immunisierungsschritten mit jeweils 10 μ g Peptid intradermal in das eine Ohr immunisiert. Sieben Tage später wurden dieselben Mäuse mit 10³ metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert und die Läsionen wöchentlich gemessen. Das Peptid p54, das im P/B-Ansatz bereits die Ohrläsionen partiell reduzierte, konnte nun als mögliches Vakzin identifiziert werden, da es im Vergleich zu der PBS-Kontrolle die Läsionen signifikant über den gesamten Verlauf verkleinerte.

Als Konklusion zeigte sich, dass das Peptid p54 potenziell mitverantwortlich für die Heilung der Leishmaniasis ist. Folgerichtig müssen weiterführende Versuche zeigen, ob p54 als mögliches Vakzin gegen die murine kutane Leishmaniasis fungieren kann. Zusammengefasst konnte anhand der vorgenannten Versuche die Ausgangsbasis geschaffen werden, um

weiterführend an einem adäquaten Vakzin gegen dieses Humanpathogen zu forschen.

1. B SUMMARY

Parasite *Leishmania (L.) major* infections are caused by the bite of a sand-fly. Healing is based on interferon (IFN)- γ secretion by CD8⁺ and CD4⁺ T cells. It is nonetheless still unclear, which proteins/peptides finally promote protection and long-lasting immunity against infections with *L. major*. Up to date, no vaccine against this human pathogen exists and only one single CD4⁺ T cell-specific protein is known so far: the LACK-protein. Thus, there is a high interest in identifying peptides that mediate healing of *L. major* infections.

To allow the identification of potential peptides derived from the LACK-protein capable of inducing higher secretion of IFN γ and associated with activity during vaccination, an overlapping peptide-library of the 36 kDa LACK-protein consisting of 47 peptides and 3 control-peptides has been created. IL-4 and IL-10 secretion was enhanced when CD4⁺ and CD8⁺ T cells were stimulated with peptides whereas respective T cells did not secrete IFN γ when activated with any peptide.

Based on previous *in silico* experiments, 300 peptides from both life-forms were chosen to be analysed as possible vaccines. These peptides were selected based on their predicted affinity to bind towards MHC class-I molecules. Additionally, all peptides were analysed for their binding-stability towards MHC class-I molecules. A correlation between the predicted affinity and measured stability of the peptides towards MHC class-I molecules was not observed. Further, all 300 peptides were tested in *in vitro* assays. To this goal, peptide-loaded dendritic cells of naïve C57BL/6 mice were co-cultured with primed CD8⁺ T cells for 48 hrs. Afterwards, supernatants were analysed for their amounts of IFN γ , IL-17A, IL-4 and IL-10. Interestingly, 53 peptides with induction of high amounts of IFN γ and low levels of IL-17A, IL-4 and IL-10 were identified. Based on their cytokine profile, 15 peptides were randomly chosen for further *in vivo* experiments. C57BL/6 mice were immunized intradermally in one ear in a prime/boost (P/B)-approach, using 10 μ g peptide in combination with CpG as adjuvant twice. Two weeks later, same mice were infected with 10³ metacyclic promastigotes in the alternate ear. Surprisingly, three of the analysed peptides were able to partially protect mice against challenge, as they had reduced lesion

volumes compared to PBS control mice. By analysing the amount of parasites in ear and spleen in week 6 post infection, differences in parasite-numbers could not be observed compared to PBS-control-mice. To further reduce lesion volumes, C57BL/6 mice were immunized with peptide-pools consisting of at least three different peptides. But unfortunately, lesion volumes were not reduced compared to control. Using a different strategy, C57BL/6 mice were immunized in a prime/boost/boost (P/B/B)-approach. To reach this goal, mice were immunized once intradermally in one ear with 20 µg peptide in combination with CpG as adjuvant, followed by two immunization-steps with 10 µg peptide each time. One week later, mice were infected with 10³ metacyclic promastigotes in the alternate ear. Lesion volumes were assessed weekly. Remarkably, p54, which partially protected mice against challenge using the P/B-approach, reduced lesion volumes significantly when mice were immunized in the P/B/B-approach.

As a conclusion, peptide p54 could be perchance partially responsible for healing Leishmaniasis. Consequently further studies need to elaborate if p54 can be verified as a possible vaccine against murine cutaneous leishmaniasis. Summarizing the above, the previously described actions build a foundation on basis of which further studies need to obtain a long desired vaccine against this human pathogen.

2. EINLEITUNG

2.1 LEISHMANIASIS

Mit aktuell 12 Millionen Infizierten und 2 Millionen Neu-Infektionen pro Jahr gehört die Leishmaniasis zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit (Sacks et al, 2002; Mauel, 2002; Murray et al, 2005; www.who.com). Täglich sind 350 Millionen Menschen dem Risiko, sich mit Leishmanien zu infizieren, ausgesetzt und jährlich sterben etwa 60.000 Menschen an dieser Krankheit (Mauel, 2002; Murray et al, 2005; www.who.com).

Auslöser der Erkrankung ist ein einzelliger Parasit der Gattung *Leishmania* (Familie *Trypanosomatidae*), der in erster Linie kleine Nager und andere Säugetierarten befällt, aber auch den Menschen - als sogenannten Fehlwirt - (Handman, 2001; Sacks et al, 2002) betreffen kann. Überträger des Parasiten sind Schmetterlings- oder Sandmücken (*Phlebotomen* der Familie *Psychodidae*). Das Hauptverbreitungsgebiet dieser Mücken sind vor allem tropische und subtropische Bereiche, wie Afrika, Süd- und Mittelamerika, Asien, aber auch der Mittelmeerraum (Sacks et al, 2002), wodurch sich auch das Verbreitungsgebiet der Leishmaniasis auf diese Gegenden begrenzt. Im Zuge der globalen Erwärmung und der verstärkten Reiselust des Menschen tritt die Leishmaniasis jedoch immer häufiger auch in unseren Breiten auf (von Stebut et al, 2007; von Stebut et al, 2012). Je nach durch die Mücke übertragenden Spezies von *Leishmania spp.* variiert die Art der Erkrankung von selbst-heilenden, auf die Haut beschränkten Läsionen (kutane Leishmaniasis) bis hin zu verschiedenen chronischen mukokutanen (mukokutane Leishmaniasis) und viszeralen (viszerale Leishmaniasis) Erkrankungsformen (Anderson et al, 2009; www.who.com).

Kutane Leishmaniasis | Bei der kutanen Form kommt es zur Bildung einer sogenannten Orientbeule, vor allem an nicht bedeckten Körperstellen - wie dem Gesicht, den Armen und Beinen. Die Läsionen heilen meist innerhalb von einigen Monaten unter Narbenbildung vollständig aus (von Stebut et al, 2007; von Stebut et al, 2012; www.who.com) und führen zu einer lebenslangen Immunität gegenüber dieser Subspezies (Sacks et al, 2002).

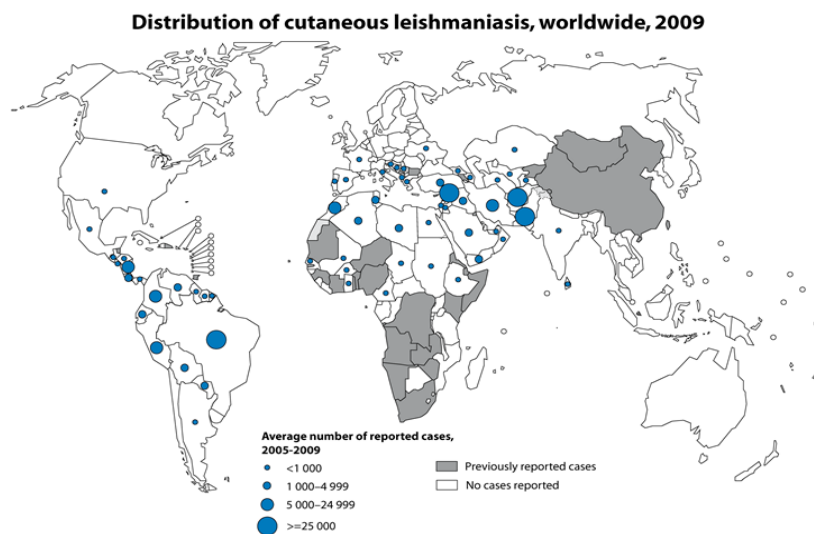


Abbildung 1: Weltweite Verbreitungsgebiete der kutanen Leishmaniasis. Das Verbreitungsgebiet der kutanen Leishmaniasis erstreckt sich von Süd- und Mittelamerika über Afrika und Südeuropa bis nach Asien. Dabei sind vor allem Asien und Südamerika Gebiete mit erhöhten Risiken für eine Infektion. Quelle: www.who.com

Mukokutane Leishmaniasis | Neben den oben beschriebenen Läsionen kommt es bei der mukokutanen Form der Leishmaniasis zu einem Befall und der damit einhergehenden Zerstörung der Mukosa in Nase-, Mund- und Rachenbereich (von Stebut et al, 2007; von Stebut et al, 2012; www.who.com).

Viszerale Leishmaniasis | Die viszerale Form der Erkrankung, auch bekannt als Kala Azar, ist charakterisiert durch Fieber, Gewichtsverlust, Anämie und starke Schwellung der Milz und Leber. Der Verlauf der Erkrankung ist bei Nicht-Behandlung innerhalb von 2 Jahren nahezu zu 100 % tödlich (von Stebut et al, 2007; von Stebut et al, 2012; www.who.com).

Als Therapieoptionen gegen die Leishmaniasis kommen zurzeit im Wesentlichen Antimone und Miltefosine (ein Alkylphospholipid) in Frage. Die Anwendung der Medikamente erweist sich allerdings aufgrund der verschiedenen Nebenwirkungen, wochenlangen Krankenhaus-Aufenthalten, hohen Kosten und der intravenösen Verabreichung als schwierig (Schmidt et al, 1938; Griewank et al, 2009). Vor allem für die vorwiegend von den Leishmaniasis betroffenen Einwohner der Dritte-Welt Länder, sind die benötigten Therapeutika nur schwer zugänglich. Ein kostengünstiges und effektives Vakzin für den Menschen, weder gegen die kutane noch gegen die mukokutane oder die viszerale Leishmaniasis, existiert bis heute nicht (Mauel, 2002; Scott et al, 2004; Murray et al, 2005).

2.1.1 LEBENSZYKLUS VON *LEISHMANIA (L.) MAJOR*

Leishmania spp. haben einen komplexen Lebenszyklus, der sich nicht nur im Darm der Sandmücke sondern auch im Gewebe und den Immunzellen des Wirts

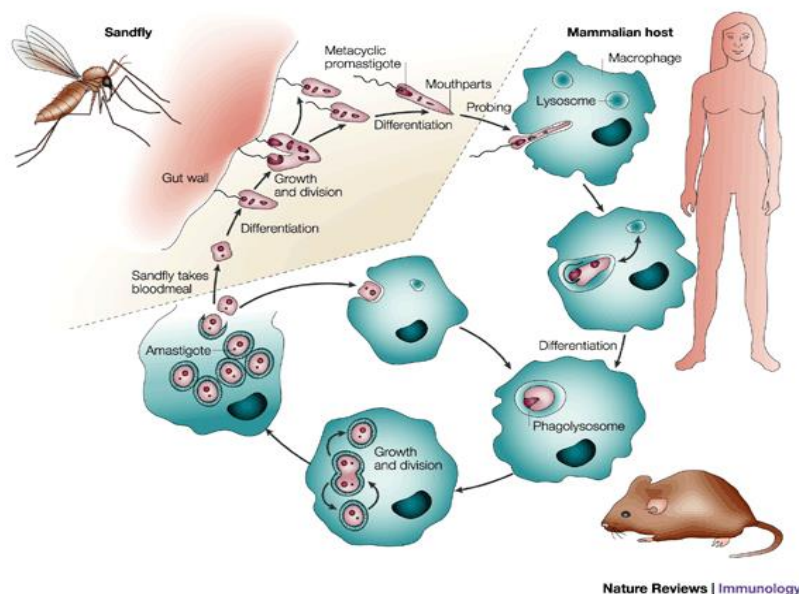


Abbildung 2: Lebenszyklus von *L. major*. Während der Blutmahlzeit überträgt die Sandmücke die promastigote Lebensform in das Hautgewebe des Wirts. Dort werden die Promastigoten von Makrophagen (MΦ) phagozytiert. Im Phago-Lysosom der MΦ wandeln sich die Promastigoten in die amastigote Lebensform um, diese vermehren sich stark und können, sobald sie den MΦ verlassen haben, andere Zellen des Immunsystems infizieren. Bei einer erneuten Blutmahlzeit der Sandmücke können Amastigote aus dem Gewebe aufgenommen werden und der Zyklus beginnt von vorne.
Quelle: Sacks et al, 2002

abspielt (Mojtahedi et al, 2008). Hierbei wandelt sich der Parasit von der 20 µm langen, begeißelten infektiösen Promastigoten, die sich im Darm der Sandmücke entwickelt, in die intrazelluläre, 2 µm große kugelige Amastigote um (Mauel, 2002), die sich im Wirt stark vermehrt und dort Ursache für die Immunreaktion und die Läsion ist. Innerhalb des Darms der weiblichen Sandmücke wächst die metazyklische Promastigote heran und wandert schließlich in den Saugapparat der Mücke (Mauel, 2002; Mojtahedi et al, 2008), bis diese während der Blutmahlzeit die Promastigoten auf einen Wirt überträgt (Reiner et al, 1995). In der Haut werden die Promastigoten dann von Phagozyten, wie Makrophagen (MΦ), aufgenommen (von Stebut, 2007). Im Phagolysosom der MΦ können sich die Promastigoten, trotz des niedrigen pH, vor weiterem Abbau schützen (Handman, 2001), und wandeln sich in die unbegeißelte Amastigote um, ohne eine Immunreaktion auszulösen (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007) [Abb. 2]. Innerhalb der folgenden 4-5 Wochen, während der sogenannten „stillen Phase“, replizieren die Amastigoten innerhalb der MΦ (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007) [Abb. 2]. Hieran anschließend, kommt es in der zweiten Phase zum klinischen Nachweis von Krankheitssymptomen: Es bilden sich Läsionen am Ort der Einstichstelle (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007). Von den MΦ freigesetzte Amastigote können nun auch von anderen Zellen, wie z.B. Dendritischen Zellen (DC), aufgenommen werden (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007). Dabei kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, wie Interleukin (IL)-12 durch die DC (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002; von Stebut, 2007) und damit zu einer Prägung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die daraufhin Interferon (IFN)-γ freisetzen [Abb. 3]. Die betroffenen MΦ regulieren, aktiviert durch das IFN_γ, iNOS (induzierbare NO-Synthase) hoch, was zur Bildung von Stickstoffoxid (NO) führt [Abb. 3]. Dies ist in der Lage, den intrazellulären Parasiten abzutöten, da NO für diesen toxisch ist (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002; von Stebut, 2007). Die chronische Phase schlussendlich zeichnet sich durch eine lebenslange Immunität gegenüber diesem einen Parasiten aus (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007). Sobald eine Sand- oder Schmetterlingsmücke an der durch den Parasiten infizierten Stelle erneut Blut saugt, beginnt der Lebenszyklus des Parasiten von vorn (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007).

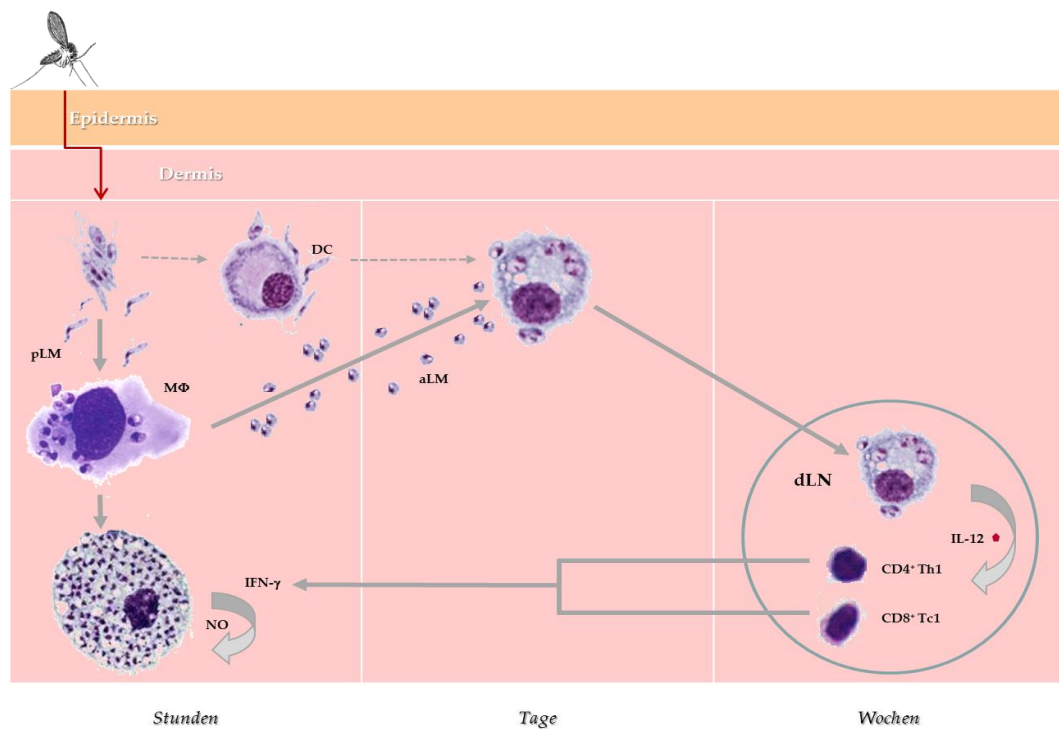


Abbildung 3: Zelluläre Aktivierung nach einer Infektion mit *L. major*. Bei dem Biss durch eine Sandmücke wird die promastigote Lebensform in die Haut des Wirts injiziert. Diese werden von Makrophagen (MΦ) phagozytiert. Im Phagolysosom der MΦ werden die Promastigoten nicht abgetötet, sondern wandeln sich in die amastigote Lebensform um, die sich dann repliziert. Sobald die MΦ platzen, können freigesetzte Amastigote weitere Immunzellen, unter anderem dendritische Zellen (DC), befallen. Infizierte DC sind dann in der Lage, zu den drainierenden Lymphknoten (dLN) zu wandern. Dort setzen sie IL-12 frei, was die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterstützt. Aktivierte T-Zellen wandern dann an den Ort der Infektion und helfen durch die Freisetzung von IFN γ iNOS in den infizierten MΦ hochzuregulieren, wodurch diese NO bilden, was schlussendlich zum Abtöten der Parasiten führt.

Quelle: Esther von Stebut

Als Auslöser der kutanen Leishmaniasis heilt eine Infektion mit *Leishmania (L.) major* innerhalb von wenigen Wochen oder Monaten spontan ab (von Stebut, 2007). Durch die vollständige Immunabwehr und die Tatsache, dass geringe Zahlen des Parasiten sehr lange, wenn nicht sogar für immer, im Organismus verbleiben (Handman, 2001), kommt es zu einer lebenslangen Immunität gegen diesen einen Erreger (Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007). Allerdings können sich die Erreger der kutanen Leishmaniasis unter Umständen auf andere Gewebe ausbreiten. Ursache hierfür ist in vielen Fällen eine nicht adäquate Immunantwort des Wirtes durch dessen supprimiertes Immunsystem, wie sie z.B. bei einer Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) vorkommt (Handman, 2001; www.who.com).

2.1.2 EXPERIMENTELLE INFEKTION DER MURINEN KUTANEN LEISHMANIASIS

Bei einem Biss durch die Sandmücke werden circa 10-1.000 Parasiten in die Haut des Wirts übertragen (Sacks et al, 2002). Um den Biss physiologisch im Labor nachzuempfinden, können die Parasiten mittels Spritze subkutan (s.c.) oder intradermal in die Haut inokuliert werden (Belkaid et al, 2002). Allerdings werden hierfür in der Literatur unterschiedliche Mengen an Parasiten beschrieben. Am häufigsten vertreten ist die subkutane Applikation von 10^4 - 10^7 Parasiten in die Hinterpfoten (Sacks et al, 2002) von Mäusen. Jedoch auch die Injektion in Ohren, Schwanzende oder ähnliches werden beschrieben (Nabors et al, 1995; Sacks et al, 2002; Belkaid et al, 2002; Brewig et al, 2009). Dabei konnte bereits durch *Belkaid et al* gezeigt werden, dass durch eine intradermale Injektion von 100 metazyklischen Promastigoten in die Ohren von C57BL/6 Mäusen die natürliche Infektion mit Leishmanien imitiert werden kann (Belkaid et al, 2000). Zusätzlich wird durch die Verwendung der Haut als Infektionsort die natürliche Angriffsstelle der Sandmücke nachgestellt. Das sogenannte Niedrigdosis-Modell, bei dem 10^3 Parasiten intradermal in die Ohren injiziert werden, ist daher am besten geeignet, um die natürliche Infektion mit *L. major* im Labor nachzustellen und wird aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit verwendet. Als Erregerstamm wird *L. major*, Klon VI (MHOM/IL/80/Friedlin), eingesetzt.

Um nach der Infektion mit *L. major* den Verlauf der Erkrankung besser untersuchen zu können, gibt es bereits gut etablierte Mausmodelle. So konnte anhand des Inzuchtstammes C57BL/6 gezeigt werden, dass dieser zwar an Leishmaniasis erkrankt, die Infektion nach einigen Wochen aber wieder ausheilt und die Tiere eine lebenslange Resistenz gegenüber dem Parasiten entwickeln (Sacks et al, 2002; Belkaid et al, 2002; von Stebut, 2007). Dies ist in erster Linie damit begründet, dass bei diesem Mausstamm eine T-Helfer 1 (Th1) und zytotoxische T-Zell (Tc) Immunantwort vorherrscht, wobei große Mengen an $IFN\gamma$ freigesetzt werden - [Abb. 4 A].

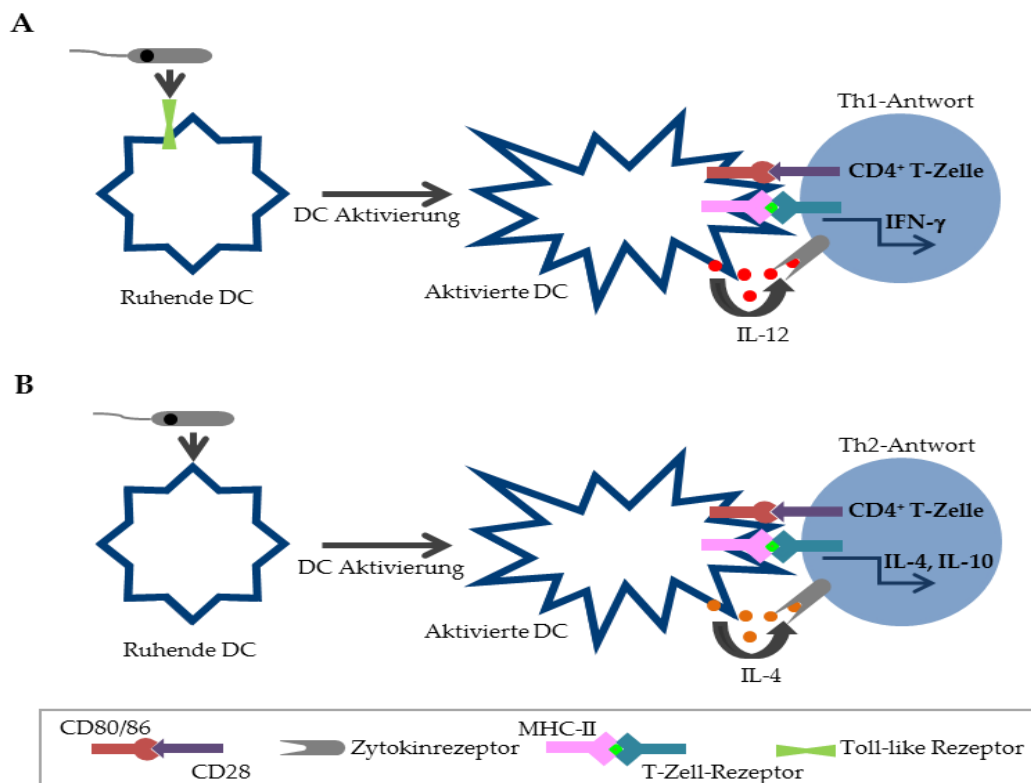


Abbildung 4: Model der Th1-/Th2-Entwicklung während einer Infektion mit *L. major*. Je nachdem welche Signalkaskade in den CD4⁺ T-Zellen durch den Kontakt mit den DC anläuft, kommt es zu einer Th1- oder Th2-Differenzierung der T-Zellen. Die so entstandenen differenzierten CD4⁺ T-Zellen sekretieren dann die entsprechenden Zytokine - IFN γ oder IL-4 - und es kommt entweder zu einem Abtöten der Parasiten durch eine Th1-Differenzierung der Zellen oder zur Viszeralisierung durch eine Th2-Differenzierung der T-Zellen.

Quelle: vereinfacht nach Sacks 2002

Im Gegensatz dazu verläuft die Leishmaniasis z. B bei BALB/c Mäusen deutlich gravierender. Hier breitet sich der Parasit systemisch über den gesamten Organismus aus, und der Krankheitsverlauf endet bei diesem Stamm immer tödlich (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002). Infizierte DC aktivieren zwar ebenfalls CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, allerdings handelt es sich hierbei um T-Helfer 2 (Th2)-Zellen, die hauptsächlich Interleukin (IL)-4 und IL-10 freisetzen - [Abb. 4 B] - was einen progressiven Verlauf der Erkrankung nicht verhindern kann (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002). Durch Freisetzung von IL-4 und IL-10 wird in infizierten M Φ iNOS und damit auch NO herunterreguliert, was das berleben des Parasiten begünstigt und den progressiven Verlauf der Leishmaniasis fördert (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002).

2.1.3 DENDRITISCHE ZELLEN (DC) IN DER LEISHMANIASIS

DC stammen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (KM). Als Antigenpräsentierende Zelle (APC) stellen sie eine Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort dar (Sato et al, 2007). Als adaptive Immunität wird die Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen bezeichnet, wozu auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gehört (von Stebut et al, 2000). Im Gegensatz dazu steht die angeborene Immunität, bei der eine Vielzahl von angeborenen Resistenzmechanismen einen Krankheitserreger erkennt und auf seine Anwesenheit reagiert. Die Aufnahme eines Pathogens durch eine naive DC gehört zur angeborenen Immunantwort. Durch die Aufnahme des Pathogens reift die naive DC zu einer effektiven APC, die in der Lage ist, T-Zellen zu aktivieren und damit die adaptive Immunantwort auszulösen (Sato et al, 2007). DC verhalten sich sowohl phagozytisch als auch makropinozytisch, indem sie neben Zellen auch große Mengen der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit aufnehmen. Sobald sie im lokalen Gewebe auf ein Pathogen treffen, reifen sie und lösen eine Immunreaktion aus. An ihrer Oberfläche tragen die unreifen DC Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen. Diese Rezeptoren, wie Toll-like-Rezeptoren oder Fc-Rezeptoren (Sato et al, 2007), erkennen z.B. Proteoglykane der Bakterienzellwand. Durch die Bindung eines Erregers an den entsprechenden Rezeptor wird die DC dazu gebracht, das Pathogen aufzunehmen und intrazellulär abzubauen. IgG-Moleküle auf den Zelloberflächen der Amastigoten werden von den Fc γ I/III-Rezeptoren der DC erkannt, gebunden und anschließend ins Zellinnere transportiert (Wölbing et al, 2006). Diese aufgenommenen antigenen Strukturen werden in der Folge prozessiert und sehr effizient im Kontext mit MHC-Molekülen der Klasse I und II auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Funktion der DC besteht primär nicht in der Zerstörung von Krankheitserregern, sondern darin, die Antigene von Pathogenen zu den sekundären lymphatischen Organen wie den drainierenden Lymphknoten (dLN) zu transportieren. Aktivierte DC setzen Zytokine frei, die weitere immunkompetente Zellen an den Ort der beginnenden Immunreaktion rekrutieren (Sato et al, 2007).

Im Gegensatz dazu nehmen MΦ, die sich aus Monozyten von Stammzellen im KM entwickeln, vorwiegend die promastigote, aber auch die amastigote Lebensform von *L. major* (Locksley et al, 1988; Blank et al, 1993; von Stebut et al, 1998; Wölbing et al, 2006) mithilfe des Komplementrezeptors 3 (CR3) (Wölbing et al, 2006) auf. Amastigote werden in den MΦ nicht durch die zelleigenen Enzyme abgebaut, sondern vermehren sich im Phagolysosom. MΦ spielen aber auch eine große Rolle bei der Zerstörung der intrazellulären Parasiten (Belkaid et al, 2002; Sacks et al, 2002; von Stebut et al, 2007).

2.1.4 CD8⁺ T-ZELLEN IN DER LEISHMANIASIS, PRIMING UND MHC KLASSE-I PRÄSENTATION

Bei der Bekämpfung einer Leishmanien-Infektion spielen neben CD4⁺ Th1 auch CD8⁺ Tc1 eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Erkrankung (Belkaid et al, 2002). Durch Depletionsversuche bei suszeptiblen BALB/c Mäusen mit α -CD4 und α -CD8 Antikörpern konnte bereits die Wichtigkeit der CD8⁺ T-Zellen während der Infektion mit *L. major* gezeigt werden. Dabei wurde BALB/c Mäusen zu Beginn der Infektion α -CD4 Antikörper appliziert, was zum Ausheilen der Erkrankung und einer Resistenz gegenüber einer Reinfektion mit *L. major* führt (Müller et al, 1991; Herath et al, 2003). Durch das Fehlen der CD4⁺ T-Zellen kommt es im Organismus zu einer erhöhten Frequenz an CD8⁺ T-Zellen, wodurch die Heilung initiiert wird, da die Läsionen im Experiment im Vergleich zu Kontrolltieren über den gesamten Verlauf deutlich kleiner waren (Müller et al, 1991; Herath et al, 2003). Die kontinuierliche Applikation von α -CD8 Antikörpern zeitgleich zu der α -CD4 Behandlung der BALB/c Mäuse führte jedoch zur Umkehrung des Effektes (Müller et al, 1991; Herath et al, 2003). Der tödliche Verlauf der Leishmaniasis bei den BALB/c Mäusen war dann wieder unabwendbar.

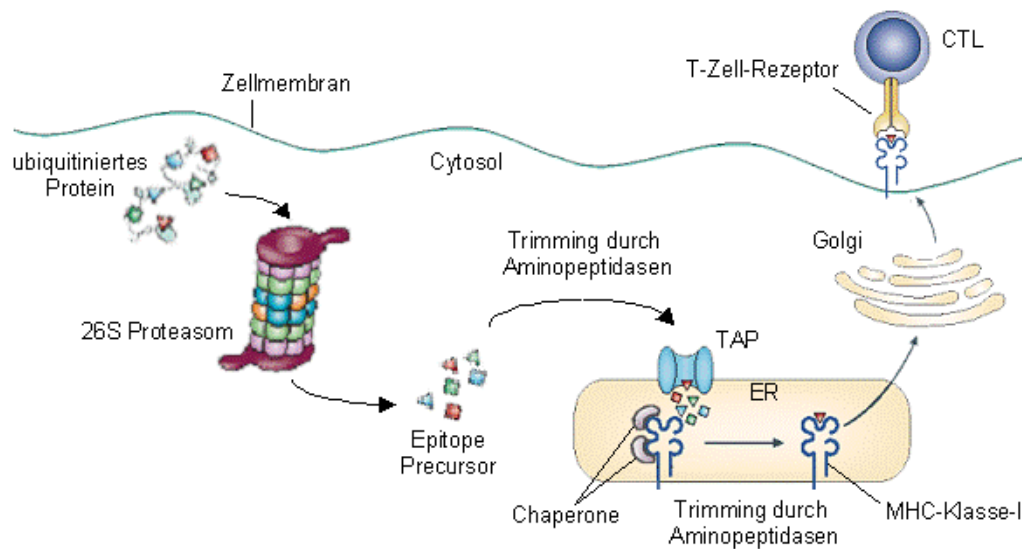


Abbildung 5: Epitopgenerierung und MHC Klasse-I Präsentation von Leishmania-Peptiden. Aufgenommene Amastigote von *L. major* gelangen über Fc γ RI/III in das Zytoplasma der DC. Dort werden die Leishmanien-Proteine durch das 26S Proteasom zu Peptiden abgebaut. TAP (*transporter associated with antigen processing*) transportiert die Epitope anschließend in das endoplasmatische Retikulum, wo nach eventuell weiterem Trimming die Epitope an MHC I-Moleküle gebunden werden. Die beladenen MHC I-Moleküle werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, an der sie dann die Epitope den CD8⁺ T-Zellen präsentieren.
Quelle: Kloetzel 2004, Pamer 2004

Die Präsentation der Leishmanien-Antigene mittels MHC-Moleküle gegenüber den T-Zellen erfolgt über die verschiedenen APC. In Abb. 5 ist die Degradierung und anschließende Präsentation der Amastigoten in DC zu sehen. Die Degradierung der Proteine erfolgt durch das Proteasom (Kloetzel, 2001). Die daraus resultierenden Peptide werden anschließend mittels TAP (*transporter associated with antigen presentation*) an das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an neu-synthetisierte MHC I-Moleküle gebunden werden. Diese werden schlussendlich an die Zelloberfläche befördert (Kloetzel, 2001). Die Peptide der degradierten Amastigoten in DC werden dann in einem endogenen Präsentationsweg mittels MHC I-Molekülen CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass DC zusätzlich in der Lage sind, exogene, zell-assoziierte Antigene im Kontext von MHC I-Molekülen zu präsentieren, ein Prozess, der Crosspräsentation genannt wird (den Haan et al, 2000). Somit sind DC in der Lage, Leishmanien-spezifische Peptide, die entweder endogen oder exogen prozessiert wurden, über MHC I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren.

2.1.5 BEISPIELE VON VAKZINIERUNG MIT LEISHMANIEN

Bis heute gibt es kein adäquates Vakzin gegen eine Infektion mit Leishmanien (Mauel, 2002; Scott et al, 2004; Murray et al, 2005). Auf dieser Basis und der steigenden Anzahl an HIV-Koinfizierten Patienten (Handman, 2001; www.who.com), bei denen eine „harmlose“ kutane Leishmanien-Infektion zu einer viszeralen und damit tödlichen Leishmaniasis werden kann, gab es bereits verschiedene Ansätze für die Entwicklung eines Vakzins. Unter anderem wird in vielen endemischen Gebieten die sogenannte „Leishmanization“ vorgenommen. Hierbei werden nicht-exponierte Körperstellen aktiv einer Infektion ausgesetzt, um einer späteren Reinfektion mit dem gleichen Erreger vorzubeugen (Mauel, 2002).

Einige Vakzine sind bereits in verschiedenen Mausmodellen, aber auch im Menschen getestet worden. Dabei kamen ganze getötete, definierte Proteine oder Teilfragmente des Parasiten (Okwor et al, 2009), zum Teil in Kombination mit Adjuvanzen, genetisch veränderte Leishmanien, Leishmanien-spezifische Peptide, die in veränderten Organismen synthetisiert wurden, oder DNA-basierte Vakzine als Impfstoffe zum Einsatz (Vanloubbeeck et al, 2004). Ebenso wird die Inokulation viabler Parasiten als Impfstoff eingesetzt (Greenblatt et al, 1980; Kellina et al, 1981; Nadim et al, 1983; Handman, 2001), was aufgrund der nicht gleichbleibenden Qualität des Parasiten und der Möglichkeit, den Verlauf der Erkrankung in immunsupprimierten Individuen nicht kontrollieren und beeinflussen zu können, nicht weiter zum Einsatz kommen sollte (Handman, 2001; Peters et al, 2009). Allerdings sind die genannten Impfstoffe aufgrund von geringer Effektivität und potenziellen massiven Nebenwirkungen - wie mögliche Kreuzreaktionen zwischen dem Wirt und den Parasiten-Antigenen, Verschlechterung der Erkrankung durch nicht effektives Hitzeabtöten der Parasiten oder der Ausbruch der Krankheit in immunsupprimierten Personen (Handman, 2001; Kronenberg et al, 2010) - nicht bei Menschen anzuwenden.

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen *L. major* (Belkaid et al, 2002). Als einzig bekanntes CD4⁺ T-Zell aktivierendes Protein aus Leishmanien ist das LACK (*Leishmania homologue*

of receptors for activated C kinase) bekannt. Hierbei handelt es sich um ein 36 kDa großes *Leishmania*-Protein, das in beiden Lebensformen - Amastigote und Promastigote - von *Leishmania spp.* gleichermaßen exprimiert wird (Mougneau et al, 1995). Ein Epitop von 158-173 bp des LACK-Proteins - das sogenannte CD4-LACK-Peptid - wird von spezifischen CD4⁺ T-Zellen erkannt (Mougneau et al, 1995), die daraufhin proliferieren und zu T-Effektorzellen werden. Dadurch kommt es zur Freisetzung von frühem IL-4, welches in BALB/c Mäusen einen progressiven Verlauf der Leishmaniasis initiiert (Sacks et al, 2002). Das CD4-LACK-Peptid wird von MHC II-Molekülen auf den APC präsentiert und anschließend von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Diese T-Zellen haben den V β 4 V α 8 T-Zell-Rezeptor. CD4⁺ T-Zellen, die einen solchen Rezeptor tragen, schützen damit den Wirt nicht vor der Erkrankung mit *L. major* (Julia et al, 1996; Sacks et al, 2002). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass infizierte V β 4-defiziente BALB/c Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren in der Lage sind, den Verlauf der Leishmaniasis aufgrund einer verstärkten Th1-Immunantwort zu kontrollieren (Himmelrich et al, 2000). In verschiedenen Ansätzen konnte das LACK-Protein bereits erfolgreich im murinen System getestet werden. Unter anderem konnte mittels TAT - einem Hüllprotein des HI-Virus - und dem LACK-Protein ein Fusionsprotein generiert werden, das in Anwesenheit eines Adjuvanz in der Lage ist, C57BL/6 Mäuse erfolgreich zu immunisieren. Wobei das TAT dabei als Transporter fungiert, damit das LACK-Protein in die Zelle gelangen kann. Im Vergleich zu Kontrolltieren wiesen die immunisierten C57BL/6 Mäuse signifikant kleinere Ohrläsionen auf (Kronenberg et al, 2006). Zusätzlich konnten auch BALB/c Mäuse erfolgreich mit dem Leishmanien-spezifischen LACK-Protein vakziniert werden, wenn zusätzlich ein Adjuvanz, wie z.B. IL-12, verabreicht wurde (Mougneau et al, 1995; Gurunathan et al, 1997; Gurunathan et al, 1998; Gurunathan et al, 2000).

Da es zurzeit noch kein vergleichbares Leishmanien-spezifisches Peptid gibt, das die CD8⁺ T-Zellen stimuliert und damit eine Tc1 Immunantwort *in vitro* und schlussendlich auch *in vivo* initiiert, ist die Identifizierung solcher Peptide von hoher Priorität und würde damit auch die Entwicklung eines Vakzins maßgeblich vorantreiben.

2.2 IN SILICO ANALYSEVERFAHREN

2.2.1 VOM PROTEIN ZUM IMMUNDOMINANTEN EPITOP

Neben den oben aufgeführten Vakzinierungsstrategien besteht auch die Möglichkeit, Leishmanien-spezifische Proteine als Vakzine einzusetzen. Im Jahr 2005 wurde das Genom von *L. major*, welches für über 8.000 Proteine kodiert, vollständig sequenziert (Ivens et al, 2005) und ermöglicht damit die Identifizierung von spezifischen Proteinen, die an der Immunantwort gegen *L. major* beteiligt sind und dadurch als mögliches Vakzin geeignet wären. Dabei spielt jedoch nicht unbedingt das gesamte Protein eine Rolle bei der Immunantwort, sondern nur sogenannte Epitope. Dabei handelt es sich um Peptide, die spezifisch an den T-Zell-Rezeptor binden und damit eine adäquate Immunreaktion initiieren. Um die Auswahl an immundominanten Proteinen oder Peptiden überhaupt einzugrenzen, besteht die Möglichkeit, die Proteine mittels Computer-gestützter Verfahren auf ihre Bindungsaffinität gegenüber definierter MHC-Moleküle zu berechnen. Anschließend werden die Peptide nach ihren vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeiten in einer Rangliste zusammengetragen.

2.2.1.1 SYFPEITHI: BINDUNGS-AFFINITÄT VON PEPTIDEN AN MHC I-MOLEKÜLE

Ein möglicher Computer-basierter Algorithmus, mit dem die Bindungsaffinität von Peptiden gegenüber MHC-Molekülen berechnet werden kann, ist SYFPEITHI. Hierbei handelt es sich um eine Datenbank, anhand derer definierte MHC-Liganden, wie Peptid-Motive, identifiziert werden können. Neben den Daten für den Mensch enthält sie auch noch ausführliche Informationen über MHC-Motive und Liganden anderer Spezies, wie Affe, Maus, Rind und Huhn. Mit Hilfe dieser Datenbank können nicht nur MHC-Liganden, sondern unter anderem auch MHC-Allele und T-Zell-Epitope als z.B. immundominante Peptide und damit als mögliche Vakzine identifiziert werden (Rammensee et al, 1999). Der Name SYFPEITHI ist in Anlehnung an das erste MHC-eluierte Peptid, das direkt sequenziert worden ist (Falk et al, 1991; Rammensee et al, 1999), ausgewählt worden. Da es sich bei SYFPEITHI um einen

Algorithmus handelt, der die theoretische Bindung von Peptiden an MHC-Moleküle bestimmt, kann keine Aussage über die reale Bindung oder Nicht-Bindung getroffen werden. Bei den Vorhersagen geht es in erster Linie um Zeit. Dabei soll wahlloses Synthetisieren von Peptiden vermieden werden, die anschließend in verschiedenen Versuchen genauer auf ihre Immundominanz hin untersucht werden müssen (Rammensee et al, 1999). Durch solche Vorselektionen möglicher immundominanter Peptide - sogenannte Untereinheiten der antigenen Determinanten, die am einfachsten vom Immunsystem erkannt werden und somit den größten Einfluss auf die Spezifität der Antikörper haben - können diese dann intensiver untersucht werden, da die Anzahl an zu analysierenden Peptiden deutlich herabgesenkt werden kann (Rammensee et al, 1999). Die Vorhersagen möglicher immundominanter Epitope erleichtert damit die Suche potenzieller Vakzinkandidaten.

Bei der Suche geeigneter Vakzinkandidaten gegen die Leishmaniasis sollten somit nicht nur Peptide, die auf der Zelloberfläche des Parasiten vorkommen, sondern auch Proteine und Peptide aus dem Zellinneren, die ebenso entscheidend (Bertholet et al, 2005) sein können für eine adäquate Immunantwort, mit berücksichtigt werden. Zusätzlich stellt sich die Frage, von welcher Lebensform - Amastigote oder Promastigote - die Proteine und Peptide sein sollten, um die Immunantwort nicht in Richtung einer Th2-Reaktion, sondern einer Th1-Reaktion und damit Heilung zu steuern. Aus diesem Grund flossen in die Auswahl der Proteine für die Identifikation möglicher Peptide als potenzielle Vakzine nicht nur Promastigoten-spezifische, sondern auch Amastigoten-spezifische Proteine mit ein. Die in Abb. 6 dargestellten Kriterien für die Auswahl der Peptide waren Bestandteil der Dissertationen von *Sven Brosch* (Dissertation Brosch, 2010) und *Beatrix Grewe* (Dissertation Grewe, 2011). Zunächst wurden mittels Massenspektrometrie die häufigsten Proteine beider Lebensformen - Promastigote und Amastigote - von *L. major* identifiziert. Dies ergab für die promastigote Lebensform 286 Proteine, bei den Amastigoten waren es 62 Proteine und in beiden Lebensformen gleichermaßen vorkommend waren es 203 Proteine [A]. Diese Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Computer-basierten Algorithmus - SYFPEITHI - auf ihre Affinität gegenüber MHC I-Molekülen untersucht.

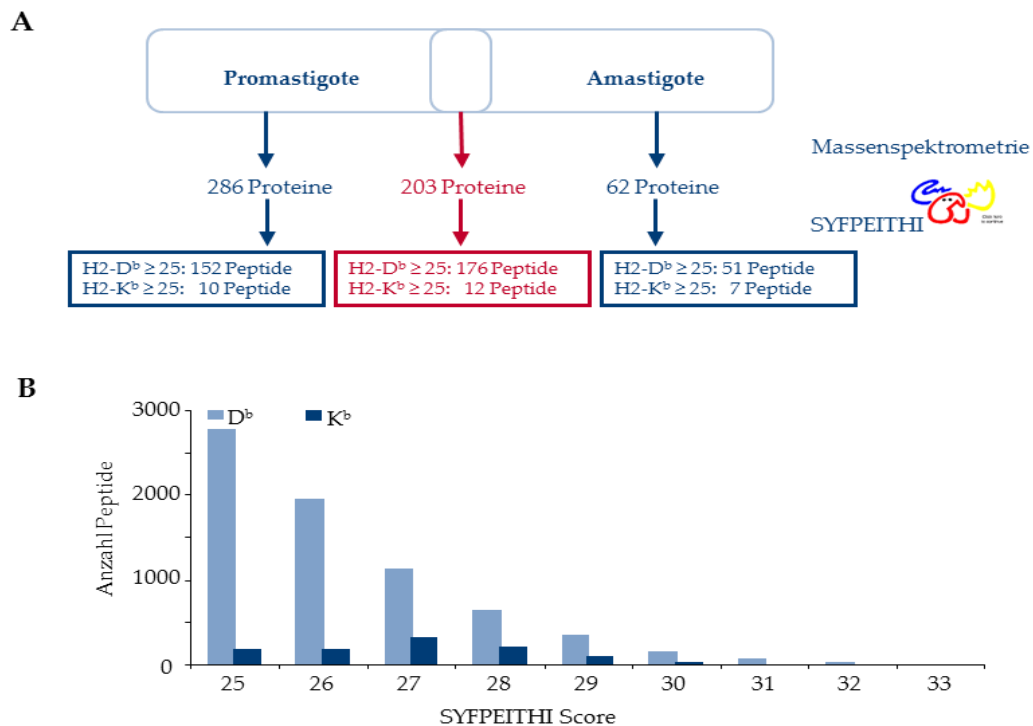


Abbildung 6: Darstellung der Peptidauswahl. [A] Mittels Massenspektrometrie wurden die in beiden Lebensformen am häufigsten vorkommenden Proteine identifiziert. Dies ergab 286 Promastigoten-, 62 Amastigoten-spezifische Proteine und 203 Proteine, die in beiden Lebensformen exprimiert werden. [B] Um die Auswahl möglicher Peptidkandidaten gering zu gestalten, wurde der Cut-off für den SYFPEITHI-Score bei 25 gesetzt. Die Anzahl der H2-D^b-Peptide ist bei einem Score von 25 am höchsten und sinkt mit wachsendem Score kontinuierlich. Im Gegensatz dazu erreicht die Anzahl der H2-K^b-Peptide bei einem Score von 27 ihr Maximum und sinkt anschließend wieder ab. Von allen Peptide mit einem Score ≥ 25 wurden die Top-300 Peptide für weitere Analysen ausgewählt. Quelle: Basierend auf den Dissertationen Brosch, 2010 und Grewe, 2011

Je höher die theoretische Affinität gegenüber MHC I-Molekülen ist, desto größer ist die vom System vergebene Score-Nummer. In [B] ist die Score-Verteilung der Peptide zu sehen. Zusätzlich wurden die Peptide spezifisch in H2-K^b (Oktamere) und H2-D^b (Nonamere) aufgetrennt. H2-K^b und H2-D^b bezieht sich hierbei auf die Einteilung in MHC I-spezifische Moleküle, deren Allele sich bei C57BL/6 Mäusen auf Chromosom 17 befinden. Der MHC-Haplotyp bei C57BL/6 Mäusen ist H2^b. Die Bezeichnung K oder D bezieht sich wiederum auf unterschiedliche MHC I-Moleküle (New Science Press, 2007). Somit besagen H2-K^b und H2-D^b mittels welcher MHC I-Moleküle die verschiedenen Peptide gegenüber CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden.

Da, wie in [B] zu sehen ist, deutlich mehr H2-D^b-Peptide vorhergesagt wurden, sind am Ende auch mehr H2-D^b-Peptide, im Vergleich zu H2-K^b-Peptiden, für genauere Analysen ausgewählt worden. Die Anzahl an Peptiden sank mit zunehmendem SYFPEITHI-Score stetig ab. So gab es nur 20 H2-D^b-Peptide, die einen Score von 32 haben, aber 2700 H2-D^b-Peptide mit einem Score von 25 [B]. Bei den H2-K^b-Peptiden verlief das Profil anders. Hier stieg die Anzahl an Peptiden bei einem Score von 27 auf 250. Danach fiel die Anzahl an Peptiden wieder ab und ab einem Score von 31 kamen gar keine H2-K^b-Peptide mehr vor. Um nicht alle Peptide zu analysieren, wurden anschließend in erster Linie die Peptide ausgewählt, die einen hohen SYFPEITHI-Score haben. Schlussendlich wurden die Top-300 Peptide (Dissertation Brosch, 2010), basierend auf dem SYFPEITHI-Score, für eine genaue Analyse ausgewählt. Darunter sind 20 H2-K^b-Peptide, 15 Peptide, die aus dem LACK-Protein stammen, und 265 H2-D^b-Peptide. In den 300 Peptiden sind 58 Amastigoten-, 38 Promastigoten-spezifische Peptide und 203 Peptide, die in beiden Lebensformen gleichermaßen vorkommen, enthalten (Dissertation Brosch, 2010). Die hier dargestellte Peptid-Datenbank wurde für die vorliegende Dissertation verwendet.

2.2.2 BINDUNGSSTABILITÄT VON PEPTIDEN AN MHC I-MOLEKÜLE

Neben der Affinität von Peptiden gegenüber MHC I-Molekülen spielt bei der Generierung einer spezifischen Immunantwort auch die Bindungsstabilität eine entscheidende Rolle (van der Burg et al, 1996; Busch et al, 1998). Denn die Immunogenität von Peptiden ist nicht nur bedingt durch deren Präsentation auf den APC, sondern auch abhängig von der Tatsache, wie stabil diese Peptide auf den MHC-Komplexen gebunden bleiben, bis es zu einer entsprechenden Immunantwort kommt (Harndahl et al, 2011). Damit die in den DC generierten Peptide auch lange genug an den MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche gebunden bleiben, um den entsprechenden T-Zellen präsentiert werden zu können, ist es notwendig, dass diese Bindung stabil genug ist. Denn bis eine spezifische T-Zelle auf ihr Antigen, gebunden an MHC-Moleküle auf der DC, trifft, kann einige Zeit vergehen (Harndahl et al, 2011).

Für die Analyse, wie stabil Peptide an MHC-Moleküle binden, sollten ideale Voraussetzungen, wie Homogenität, Unzerstörbarkeit der einzelnen Bestandteile und deren „reine“ Oberflächen, herrschen. Um all diese Punkte gewährleisten zu können, gleichzeitig aber auch effektiv viele verschiedene Peptide auf deren Bindungseigenschaften gegenüber MHC I-Molekülen analysieren zu können, haben *Harndahl et al* eine Methode entwickelt, die all dies miteinander verbindet (*Harndahl et al*, 2011). Das Prinzip beruht auf einem Dissoziations-Assay von *Parker et al*, bei dem im kleinen Stil bereits erste Versuche mit radioaktiv-beladenem β_2m (β_2 -Mikroglobulin; lösliche Protein-Untereinheit des MHC I-Moleküls) gemacht wurden (*Parker et al*, 1994). Hierbei wurde die schwere Kette des MHC I-Komplexes, ein Peptid und das radioaktive β_2m dazu benutzt, um die Dissoziationseigenschaften des Peptids genauer zu untersuchen (*Parker et al*, 1994). Auf Basis dieser Daten wurde das Prinzip durch *Harndahl et al* erweitert und zusätzlich die Möglichkeit geschaffen, mehrere Peptide zeitgleich auf deren Dissoziationseigenschaften hin zu analysieren (*Harndahl et al*, 2011). Durch die Tatsache, dass bei dem Protokoll nach *Harndahl et al* keine weiteren Schritte notwendig sind, kann die Dissoziation der Peptide real gemessen werden. Zum Schluss entsteht eine Rangliste, in der die Peptide nach ihrer Zeit, wie lange der MHC I-Peptid-Komplex gebunden war, abgebildet sind (*Harndahl et al*, 2011).

In Abb. 7 sind die Bildung des MHC I-Peptid-Komplexes und deren anschließende Auflösung dargestellt. Dabei werden die zu untersuchenden

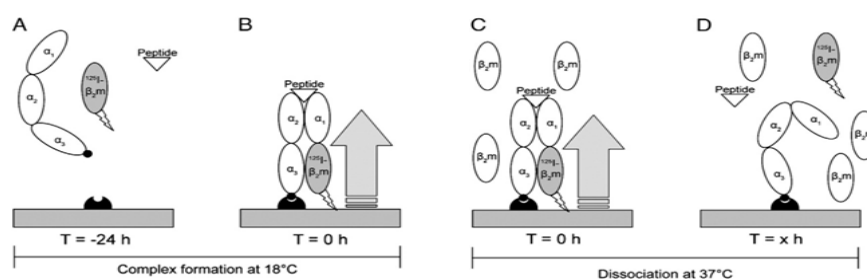


Abbildung 7: Schematische Grafik des Dissoziationsdiagramms. Komplexbildung bei 18 °C. [A] Die schwere Kette des MHC I-Moleküls wird mit dem jeweiligen Peptid und ^{125}I -gelabeltem β_2m auf die Szintillationsplatte pipettiert. [B] In Gegenwart eines bindenden Peptids, bindet das radioaktive β_2m an die schwere Kette des MHC I-Moleküls. Durch die Bindung des radioaktiven Moleküls, wird der MHC I-Peptid-Komplex in einen niedrigeren Zustand überführt, es kommt zu einem Lichtsignal auf der Platte, was als Signal gemessen werden kann. **Auflösen des Komplexes bei 37 °C.** Mit anheben der Temperatur auf 37°C wird die Dissoziation des Peptides eingeleitet. [D] Durch auseinanderfallen des MHC I-Peptid-Komplexes, verliert das radioaktive β_2m den Kontakt zur Platte und das Signal verschwindet
Quelle: Harndahl 2011

Peptide einzeln mit ^{125}I -gelabelten $\beta_2\text{m}$ und der schweren Kette des MHC I-Komplexes in eine mit Streptavidin bedeckte Szintillations-Mikroplatte pipettiert. Bei 18 °C formen die beteiligten Moleküle einen Komplex [Abb. 7 A und B]. Durch Bindung des radioaktiven $\beta_2\text{m}$ im MHC I-Peptid-Komplex wird dieser in einen niedrigeren Energiezustand überführt, und es kommt zu einem messbaren Lichtsignal auf der Szintillations-Mikroplatte (Harndahl et al, 2011). Wird die Umgebungstemperatur auf 37 °C erhöht, kann das Auflösen des MHC I-Peptid- $\beta_2\text{m}$ -Komplexes beobachtet werden. Durch Auseinanderfallen des Komplexes kann das radioaktive $\beta_2\text{m}$ den MHC I-Peptid-Komplex nicht mehr in einen niedrigeren Energiezustand überführen, und das zu messende Signal verschwindet (Harndahl et al, 2011). Die Komplexbildung kann auch bei 37 °C erfolgen, was für die Analyse der Peptide, die *in vivo* getestet werden, von größerer Bedeutung ist, da dies den physiologischen Bedingungen entspricht.

3. ZIEL DER ARBEIT

Da es bis heute noch kein adäquates Vakzin gegen eine Infektion mit Leishmanien gibt, ist die Suche und Identifikation möglicher Epitope/Antigene von entscheidender Bedeutung. Mit der Sequenzierung des gesamten Genoms von *L. major* wurden neue Möglichkeiten geschaffen, Proteine oder Peptide als geeignete Vakzin-Kandidaten zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist nun die Identifizierung geeigneter Peptidkandidaten, die als mögliche Vakzine gegen die murine kutane Leishmaniasis eingesetzt werden können. Dafür sind auf Basis von *in silico* Analysen 300 Peptide aus dem Gesamtpool von Peptiden aus beiden Lebensformen von *L. major* ausgesucht worden. Diese Peptide werden in *in vitro* Versuchen auf ihr spezifisches Zytokinprofil hin untersucht, um dann im Anschluss in *in vivo* Versuchen einen oder mehrere geeignete Peptidkandidaten zu ermitteln, die einerseits als mögliche Vakzine gegen die murine kutane Leishmaniasis eingesetzt werden können und andererseits die Grundlage für die weitere Impfstoffgenerierung gegen dieses Humanpathogen darstellen können.

4. ERGEBNISSE

4.1 OPTIMIERUNG PEPTID-SPEZIFISCHER RESTIMULATION VON LEISHMANIA-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN

Um die Leishmanien-spezifischen Peptide in späteren *in vitro* Versuchen untersuchen zu können, mussten zunächst die optimalen Bedingungen für eine Kokultur bestimmt werden. Hierbei wurden speziell die zu verwendende Peptidkonzentration, die Vorbehandlung der DC mit LPS und eine mögliche Bestrahlung der DC vor Beginn der Kokultur untersucht. Die folgenden Versuche wurden zunächst mit dem einzigen bekannten Leishmanien-Peptid des LACK-Proteins durchgeführt, dem CD4-LACK-Peptid. Neben CD4⁺ T-Zellen, die durch dieses Peptid aktiviert werden, wurden auch CD8⁺ T-Zellen isoliert und parallel zu den CD4⁺ T-Zellen mit peptidbeladenen DC kokultiviert. Bei jedem Versuch wurde an Tag 6 nach der Generierung der DC aus dem KM ein Qualitäts-FACS gemacht. Dabei sollte der prozentuale Anteil der Oberflächenmoleküle MHC I, MHC II und CD86 bestimmt werden, um so die Fähigkeit der Peptidpräsentation gegenüber den T-Zellen in der Kokultur durch die DC zu gewährleisten.

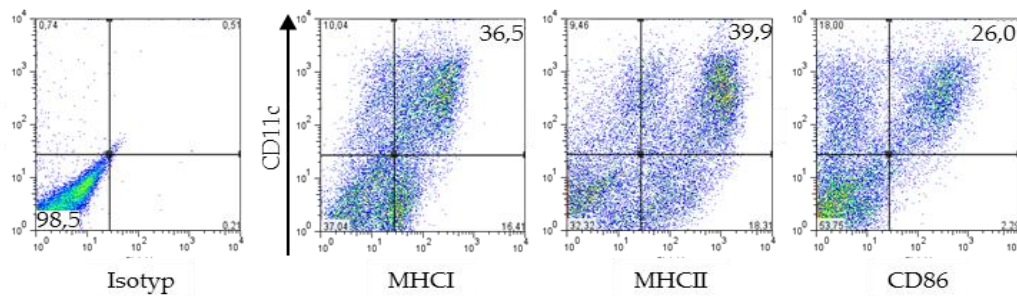


Abbildung 8: Qualitäts-FACS der Oberflächenmoleküle der DC an Tag 6 nach der Isolierung aus dem Knochenmark (KM). Exemplarisch dargestellt ist ein Qualitäts-FACS der DC auf ihre Oberflächenmoleküle MHC I, MHC II und CD86 an Tag 6 nach der Isolierung aus dem KM.

Wie in Abb. 8 zu sehen ist, waren die Oberflächenmoleküle MHC I, MHC II und CD86 auf den DC hochreguliert. Demnach waren die DC in der Lage, die Antigene den CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in der Kokultur zu präsentieren.

Ebenso wurde am Tag der Aufreinigung der T-Zellen ein T-Zell-Qualitäts-FACS angefertigt. Dabei wurde neben der Analyse der Gesamt-LN-Zellen auf die jeweilige Menge an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch die Reinheit der jeweiligen T-Zell-Population nach der MACS-Aufreinigung und eine Verunreinigung durch die jeweils andere T-Zell-Population geprüft.

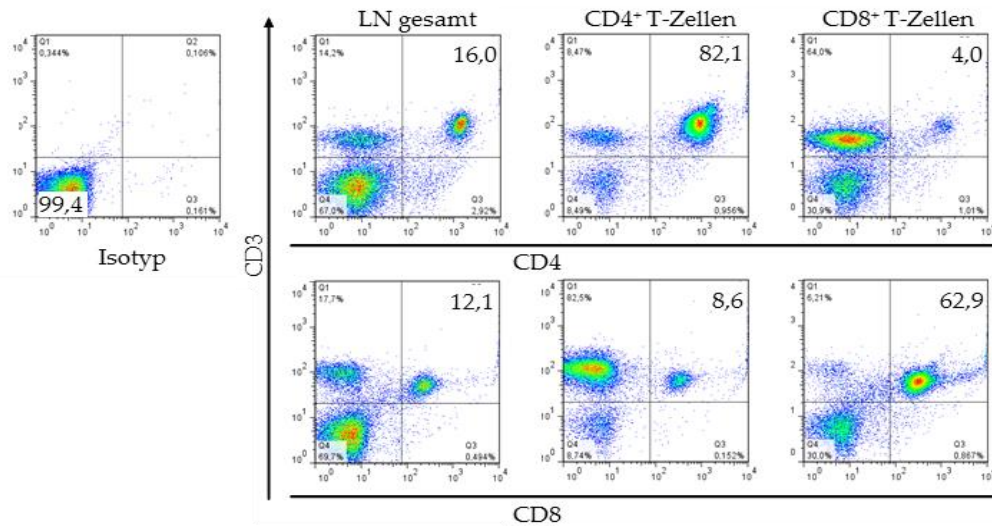


Abbildung 9: Qualitäts-FACS der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Exemplarisch dargestellt ist das Qualitäts-FACS der T-Zellen vor (LN gesamt) und nach der jeweiligen Aufreinigung (CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen). Es wurden jeweils die CD3/CD4 doppelt-positiven und die CD3/CD8 doppelt-positiven Zellen angefärbt, um einerseits die Gesamtzellzahl der entsprechenden T-Zell-Population und andererseits eine mögliche Verunreinigung mit der jeweils anderen Population bestimmen zu können.

Wie in Abb. 9 beispielhaft zu sehen ist, lag der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen im Gesamt-LN bei $16 \pm 0,7 \%$ ($n=7$), und der Anteil CD8⁺ T-Zellen bei $12,1 \pm 0,6 \%$ ($n=7$). Die Reinheit der CD4⁺ T-Zell-Population nach der MACS-Aufreinigung lag bei $82,1 \pm 11,3 \%$ ($n=8$), wobei hier zusätzlich eine Verunreinigung mit CD8⁺ T-Zellen von $8,6 \pm 11,4 \%$ ($n=8$) vorlag. Die Reinheit der CD8⁺ T-Zellen hingegen lag nach der Aufreinigung bei $62,9 \pm 6,3 \%$ ($n=17$), die Verunreinigung durch CD4⁺ T-Zellen bei $4,0 \pm 1,5 \%$ ($n=17$). Somit waren die jeweiligen T-Zell-Populationen nach der jeweiligen Aufreinigung nahezu rein, und eine Verschleppung der jeweils anderen T-Zell-Population wurde möglichst gering gehalten.

Zunächst wurde die Fähigkeit der DC, T-Zellen zu aktivieren, genauer analysiert. Dafür sind DC zunächst aus dem Knochenmark naiver C57BL/6

Mäuse generiert worden. Die T-Zellen für die Kokultur stammten aus den dLN infizierter C57BL/6 Mäuse und wurden mit Hilfe der MACS-Technologie zu einer CD4⁺ und einer CD8⁺ T-Zell-Population aufgereinigt. Das Verhältnis von DC zu T-Zellen in der Kokultur betrug stets 1:5. Für die Analyse der optimalen Peptidkonzentration in der Kokultur wurde das bereits bekannte CD4-LACK-Peptid in sechs verschiedenen Endkonzentrationen - 10⁻⁴ bis 10⁻⁹ mol - verwendet. Bei dem CD4-LACK-Peptid handelt es sich um ein CD4-spezifisches Peptid, das in erster Linie CD4⁺ T-Zellen zu einer Freisetzung von verschiedenen Zytokinen, wie frühem IL-4, anregt (Sacks et al, 2002). Für die Kokultur wurden die DC mit isolierten und mittels MACS aufgereinigten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen sowie dem Peptid für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kokultiviert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf die darin enthaltenen Mengen an IFN γ und IL-4 analysiert. In Abb. 10 sind die Daten (n=2-4) für die freigesetzten Mengen an IFN γ und IL-4 abgebildet. Die Ergebnisse sind nach Kokulturen bestehend aus DC und CD4⁺ T-Zellen, DC mit CD8⁺ T-Zellen und den verschiedenen Vorbehandlungen der DC getrennt dargestellt.

In [A] sind die Ergebnisse für die Kokulturen mit unbehandelten DC gezeigt. CD4⁺ T-Zellen, die mit unbehandelten DC und dem CD4-Peptid kokultiviert wurden, sekretierten mehr IFN γ (0,061 \pm 0,061 ng/mL), wenn die Peptidkonzentration bei 10⁻⁶ mol lag im Vergleich zur Kontrolle, den DC und CD4⁺ T-Zellen allein (0,029 \pm 0,024 ng/mL). Die anderen getesteten Peptidkonzentrationen hatten hier keinen Einfluss auf das Sekretionsverhalten der CD4⁺ T-Zellen. Die Analyse derselben Überstände auf die freigesetzte Menge an IL-4 führte zu anderen Ergebnissen. Hier waren die Peptidkonzentrationen 10⁻⁷ mol (0,394 \pm 0,221 ng/mL) und 10⁻⁹ mol (0,374 \pm 0,167 ng/mL) in der Lage, die T-Zellen in der Kokultur zu einer erhöhten IL-4 Sekretion anzuregen. Generell lag die sekretierte Menge an IL-4 deutlich über der freigesetzten Menge an IFN γ . In den Überständen der Kokulturen mit unbehandelten DC und aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen lag die freigesetzte Menge an IL-4 und IFN γ stets unterhalb der Kontrolle - DC und T-Zellen allein. Die unterschiedlichen Peptidkonzentrationen in den Kokulturen hatten dabei keinen Einfluss.

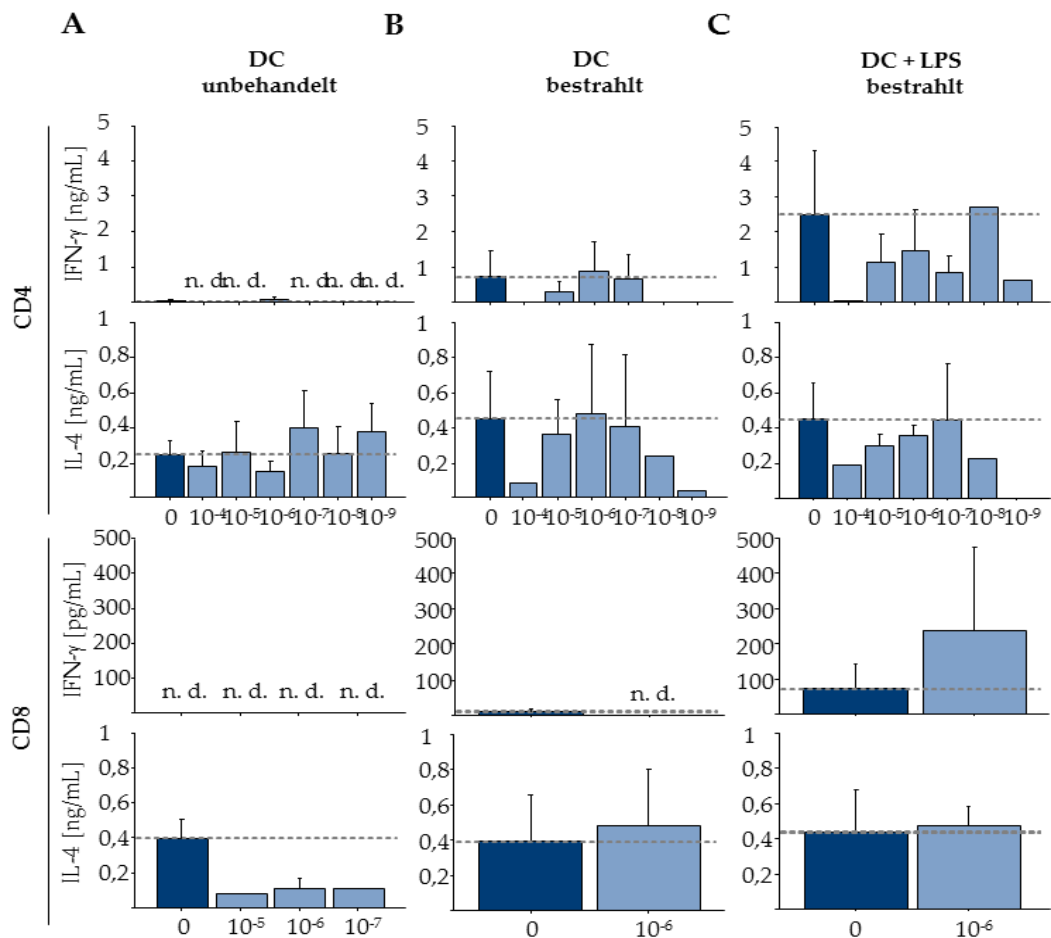


Abbildung 10: Zytokinprofile der Kokulturen bestehend aus CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und unterschiedlich vorbehandelten DC. Die DC wurden aus naiven C57BL/6 Mäusen über 6 Tage generiert, dann entweder nicht weiter behandelt [A], bei 55 kV, 40 Gy für 4 min bestrahlt [B] oder für 18 h mit LPS aktiviert und anschließend bestrahlt [C], bevor sie mit dem CD4-LACK-Peptid und geprimten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen für 48 h kokultiviert wurden. Nach zwei Tagen wurden die Überstände abgenommen und auf die sekretierten Mengen an IFN γ und IL-4 analysiert (n=2-4 unabhängige Versuche, mean \pm SEM, n.d. = nicht detektiert).

Um den Effekt der Peptidkonzentrationen auf das Sekretionsverhalten der T-Zellen noch zu verbessern, können die DC vor Beginn der Kokultur bestrahlt werden. Durch die Bestrahlung verbleiben die DC in dem Zustand, in dem sie sich zu dem Zeitpunkt befinden, wodurch eine verminderte Grundaktivierung der DC in der Kultur beobachtet werden soll. In [B] sind die Überstände der Kokultur mit bestrahlten DC und CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Deutlich ist ein konzentrationsabhängiges Sekretionsverhalten der CD4⁺ T-Zellen zu beobachten. Die Freisetzung von IFN γ durch die CD4⁺ T-Zellen ist im Vergleich zu den anderen getesteten Konzentrationen bei einer Peptidkonzentration von

10^{-6} mol deutlich höher ($869,33 \pm 822,29$ pg/mL). Alle anderen getesteten Peptidkonzentrationen führten zu keiner erhöhten Zytokinfreisetzung. IL-4 wurde nicht vermehrt sekretiert im Vergleich zu der Kontrolle. Da eine Peptidkonzentration von 10^{-6} mol ideal zu sein scheint, um T-Zellen zu aktivieren, wie bereits von *Busch et al* (Busch et al, 1998) gezeigt werden konnte, wurde für die Kokultur mit CD8⁺ T-Zellen nur noch diese Peptidkonzentration verwendet. Wie in [B] zu sehen ist, war das CD4-LACK-Peptid bei einer Konzentration von 10^{-6} mol jedoch nicht in der Lage, CD8⁺ T-Zellen in der Kokultur weder zu einer IFN γ Sekretion, noch zu einer erhöhten Freisetzung von IL-4 anzuregen, wenn sie mit bestrahlten DC kokultiviert wurden.

Um die Effizienz der Peptid-Präsentation gegenüber den T-Zellen in der Kokultur durch die DC noch zu maximieren, wurden die DC vor dem Bestrahlen für 18 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS; Endkonzentration 100 nm/mL) kultiviert, wodurch die MHC-Moleküle auf den Zelloberflächen hochreguliert werden. In [C] sind die Ergebnisse der ELISA-Daten für die sekretierten Mengen an IFN γ und IL-4 aus den Überständen der Kokulturen mit CD4⁺ T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Jedoch konnte in den Überständen mit CD4⁺ T-Zellen keine erhöhte Menge an IFN γ oder IL-4 im Vergleich zu der Kontrolle nachgewiesen werden. Mittels IFN γ und IL-4 ELISA wurden auch die Überstände der Kokulturen mit CD8⁺ T-Zellen auf diese Zytokine hin analysiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in [C] zu sehen. Die durch CD8⁺ T-Zellen freigesetzte Menge an IFN γ lag deutlich über der Kontrolle. Durch die in der Kokultur enthaltenen aktivierten und bestrahlten DC konnten die CD8⁺ T-Zellen mit dem CD4-LACK-Peptid dreimal mehr ($236,5 \pm 236,5$ pg/mL) IFN γ freisetzen im Vergleich zur Kontrolle - bestehend aus DC und T-Zellen allein. Wohingegen IL-4 nicht vermehrt durch die CD8⁺ T-Zellen sekretiert wurde.

Anhand der Daten in Abb. 10 zeigt sich, dass die Peptidkonzentration und auch die Vorbehandlung der DC einen großen Einfluss auf das Sekretionsverhalten der T-Zellen haben. So konnten CD8⁺ T-Zellen zu einer vermehrten IFN γ Freisetzung angeregt werden. Allerdings waren hier die Bestrahlung und die Voraktivierung der DC von entscheidender Bedeutung. Dagegen konnten CD4⁺ T-Zellen in der Kokultur durch die Peptidkonzentration von 10^{-6} mol zu einer vermehrten IFN γ Sekretion angeregt werden, wenn die DC vorher nicht weiter behandelt worden waren. IL-4 wurde ebenfalls vermehrt

durch CD4⁺ T-Zellen freigesetzt, wenn diese mit unbehandelten DC kokultiviert wurden. Dennoch bestätigten diese Ergebnisse, dass es sich bei dem CD4-LACK-Peptid um ein CD4⁺ T-Zell-spezifisches Peptid handelt, das in erster Linie die Sekretion von Th2-Zytokinen induziert.

Trotz der hohen Kontrollwerte und der nicht eindeutig zu verwendenden Peptidkonzentration, wurden in den folgenden Versuchen die Peptide mit einer Endkonzentration von 10⁻⁶ mol eingesetzt. Hier waren neben den Vorversuchen auch die Ergebnisse von *Busch et al* entscheidend für die Wahl der geeigneten Peptidkonzentration (Busch et al, 1998). So konnten *Busch et al* bereits zeigen, dass eine Peptidkonzentration von 10⁻⁶ mol am besten geeignet war, um *in vitro* T-Effektorzellen zu generieren (Busch et al, 1998). Somit sind für die weiteren *in vitro* Versuche, aufgrund der vorangegangenen Vorversuche, die DC mit LPS für 18 Stunden inkubiert und anschließend mit 40 Gy für 4 min bei 55 kV bestrahlt worden.

4.2 TESTEN EINER ÜBERLAPPENDEN PEPTID-BIBLIOTHEK *IN VITRO*

Bei der LACK-Bibliothek handelt es sich um Peptide aus dem LACK-Protein, das als Vakzin bereits in murinen Modellen untersucht worden ist (Mougneau et al, 1995; Gurunathan et al, 1997; Gurunathan et al, 1998; Gurunathan et al, 2000; Kronenberg et al, 2006). Die LACK-Bibliothek wurde in Kooperation mit Univ. Prof. Dr. Dirk Busch, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München, kreiert, wobei die einzelnen Peptide aus 15 mit jeweils 11 überlappenden Aminosäuren (Draenert et al, 2003; Kiecker et al, 2004) bestehen [Abb. 11]. Mit Hilfe der Untersuchungen des gesamten LACK-Proteins soll einerseits das gesamte Protein genauer analysiert und andererseits eventuell ein weiteres immundominantes Epitop identifiziert werden.

Peptide 1-6	Peptide 7-12	Peptide 13-18
HHHHHHGYGRKKRRQ	PDYAEFLRDGHEDWV	EHPVVSGSWDNTIK
HHGYGRKKRRQRRC	EFLRDGHEDWVSSIC	VVSGSWDNTIKVWNV
GRKKRRQRRCGYPYD	DGHEDWVSSICFSPS	SWDNTIKVWNVNGGK
RRQRRCGYPYDVPDY	DWVSSICFSPSLEHP	TIKVVWNVNGGKCERT
RRGYDVPDYAEFL	SICFSPSLEHPVVS	WNVNGGKCERTLKGH
PYDVPDYAEFLRD	SPSLEHPVVSGSWD	GGKCERTLKGHSNYV
Peptide 19-24	Peptide 25-30	Peptide 31-36
ERTLKGHSNYVSTVT	SGGKDGAALLWDLST	ESPINQIGFSPNRFW
KGHSNYVSTVTVSPD	DGAALLWDLSTGEQL	NQIGFSPNRFWMCVA
NYVSTVTVSPDGSLC	LLWDLSTGEQLFKIN	FSPNRFWMCVATERS
TVTVPDGSGLCASGG	LSTGEQLKINVESTP	RFWMCVATERSLSVY
SPDGSLCASGGKDG	EQLFKINVESTPINQI	CVATERSLSVYDLES
SLCASGGKDGAALLW	KINVESTPINQIGFSP	ERSLSVYDLESKAVI
Peptide 37-52	Peptide 43-47	Kontrollpeptide
SVYDLESKAVIAELT	ISIAWSADGNTLYSG	SIINFEKL
LESKAVIAELTPDGA	WSADGNTLYSGHKDN	GYKDGNEYI
AVIAELTPDGAKPSE	GNTLYSGHKDNLIRV	ICFSPSLEHPVVSGSWD
ELTPDGAKPSECISI	YSGHKDNLIRVWSIS	
DGAKPSECISIAWSA	HKDNLIRVWSISDAE	
PSECISIAWSADGNT		

Abbildung 11: Die LACK-Bibliothek. In der LACK-Bibliothek befinden sich 47 überlappende Peptide des LACK-Proteins mit je 15 Aminosäuren Länge und 3 Kontrollpeptide.

Für die Analyse der 50 Peptide der LACK-Bibliothek - 47 überlappende Peptide und 3 bereits definierte Kontrollpeptide (SIINFEKL, GYKDGNEYI und ICFSPSLEHPVVSGSWD) [Abb. 11 und 9.1.1] - wurden zunächst DC aus naiven C57BL/6 Mäusen generiert. Diese Zellen wurden für 18 h mit LPS aktiviert, anschließend bestrahlt und dann für 48 h mit den Peptiden der LACK-Bibliothek und aufgereinigten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen aus infizierten Mäusen kokultiviert. Die Peptid-spezifische Zytokinfreisetzung der Kokulturen wurde anschließend mittels ELISA bestimmt und die Ergebnisse der Messungen für IFN γ , IL-4 und IL-10 sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt.

In Abb. 12 sind die Resultate der Peptid-spezifischen Zytokinfreisetzung durch die CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Wie in [A] zu sehen ist, war keines der Peptide aus der LACK-Bibliothek in der Lage, die in der Kokultur vorhandenen CD4⁺ T-Zellen zu einer vermehrten IFN γ Sekretion anzuregen. Dahingegen induzierten die Peptide die CD4⁺ T-Zellen zu vermehrten IL-4 Freisetzungen [B]. So induzierten die Peptide ab Peptid 26 die CD4⁺ T-Zellen in der Kokultur zu mindestens dreimal so hohen IL-4 Freisetzungen im Vergleich zur Kontrolle. Wurden dieselben Überstände, wie aus [A und B] auf die sekretierten Mengen an IL-10 analysiert [C], so zeigte sich, dass die meisten der getesteten Peptide in der Lage waren, die CD4⁺ T-Zellen in der Kokultur zu einer vermehrten Zytokinsekretion anzuregen.

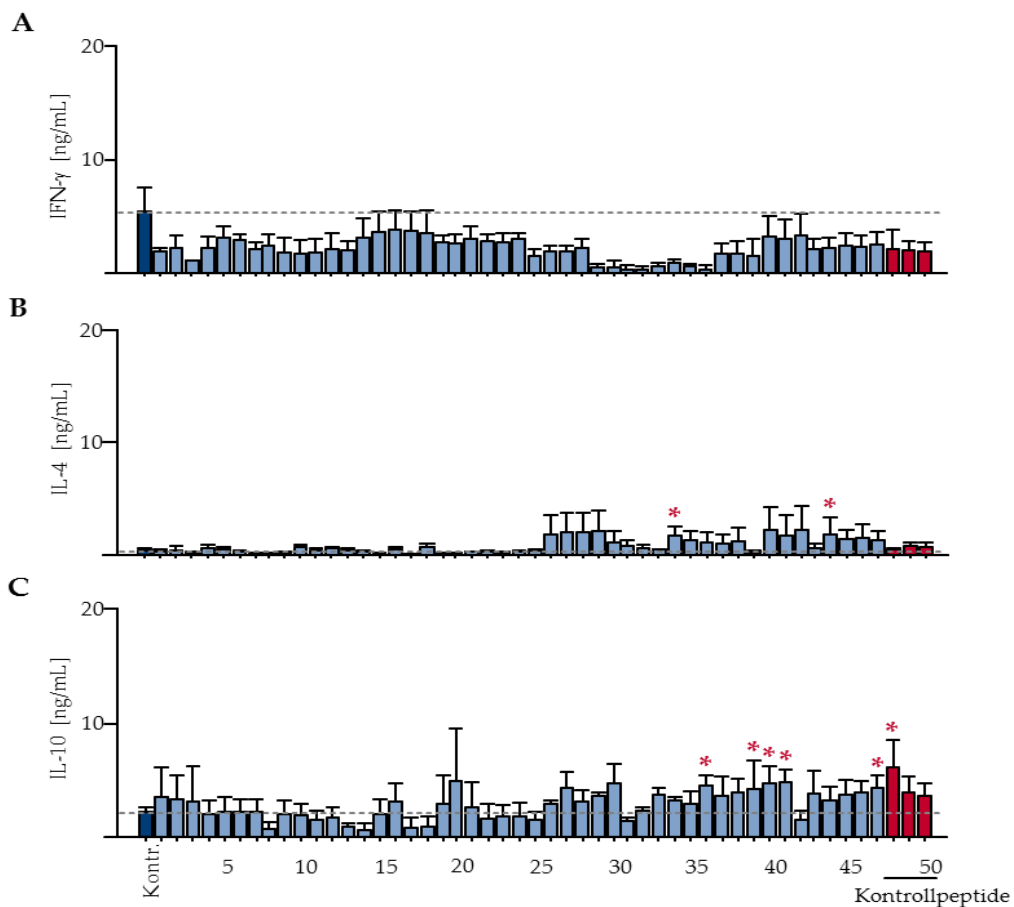


Abbildung 12: CD4⁺ T-Zell-spezifisches Zytokinprofil nach Restimulation mit Peptiden aus der LACK-Bibliothek. Die aus naiven C57BL/6 Mäusen gewonnen DC wurden zunächst für 18 Stunden mit LPS vorbehandelt und anschließend für 4 min bei 55 kV und 40 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die DC mit den Peptiden beladen und zusammen mit MACS-Aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen für 48 Stunden kokultiviert (Ratio DC:T-Zellen = 1:5). Nach 2 Tagen sind die Überstände der Kokulturen abgenommen worden und mittels ELISA wurde die sekretierte Menge an IFN γ , IL-4 und IL-10 in den Überständen bestimmt (n=3 unabhängige Versuche, * = p \leq 0,05, mean \pm SEM).

Um ein potenzielles CD8⁺ T-Zell Epitop in dem LACK-Protein zu identifizieren, wurden zusätzlich CD8⁺ T-Zellen aus infizierten C57BL/6 Mäusen aufgereinigt und ebenfalls mit den Peptiden aus der LACK-Bibliothek kokultiviert. In Abb. 13 sind die Ergebnisse der durch die CD8⁺ T-Zellen freigesetzten Mengen an IFN γ , IL-4 und IL-10 abgebildet. Die vermehrte Sekretion von IFN γ durch die CD8⁺ T-Zellen wurde tendenziell nur durch die Peptide 40 (1,8 \pm 1,3 ng/mL) und 41 (2,5 \pm 1,8 ng/mL) ermöglicht [A]. Alle anderen getesteten Peptide induzierten keine erhöhten IFN γ Freisetzungen.

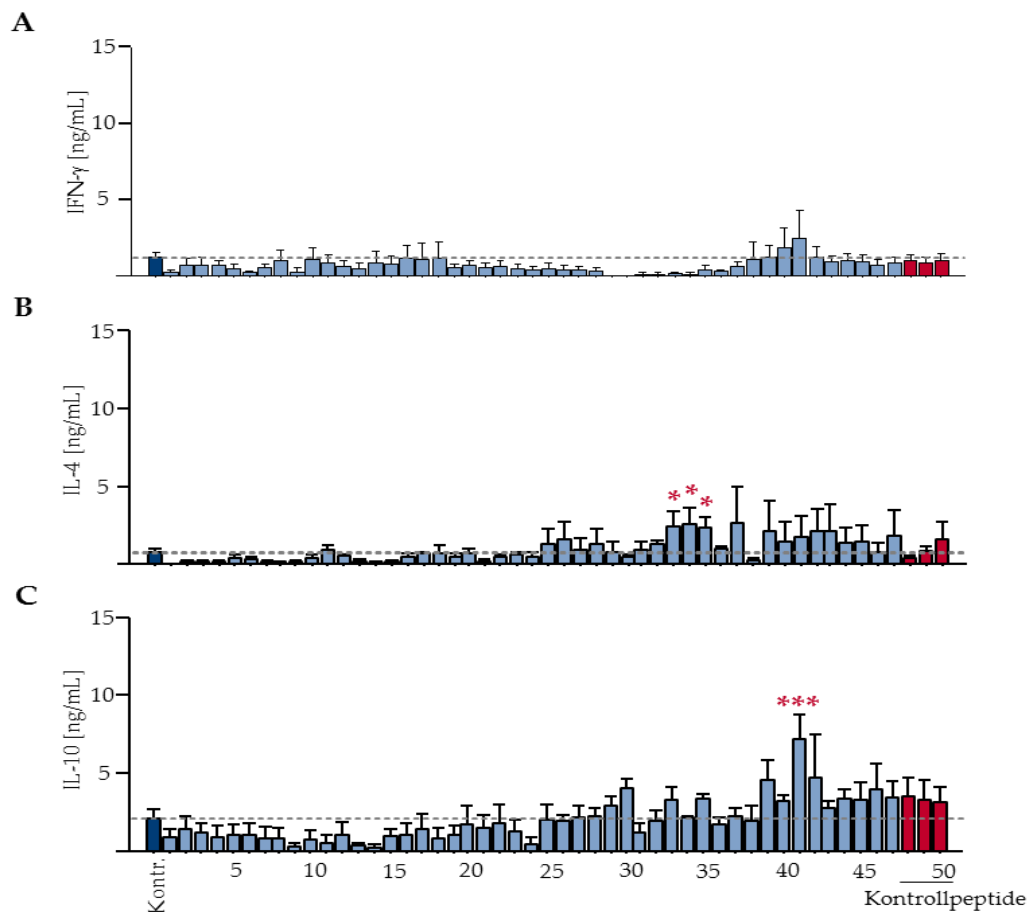


Abbildung 13: CD8⁺ T-Zell-spezifisches Zytokinprofil nach Restimulation mit Peptiden aus der LACK-Bibliothek. Aus C57BL/6 generierte DC wurden für 18 h mit LPS vorbehandelt und anschließend für 4 min, bei 55 kV und 40 Gy bestrahlt. Danach wurden die DC mit den Peptiden der LACK-Bibliothek beladen und mit geprimten CD8⁺ T-Zellen für 48 h kokultiviert (Ratio DC:T-Zellen = 1:5). Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf die sekretierten Mengen an IFN γ , IL-4 und IL-10 untersucht (n=3 unabhängige Versuche, * = p \leq 0,05, *** = p \leq 0,002, mean \pm SEM).

Im Gegensatz dazu war in denselben Überständen vermehrt IL-4 nachzuweisen [B]. So induzierte etwa die Hälfte der Peptide die CD8⁺ T-Zellen in der Kokultur zu einer erhöhten Freisetzung von IL-4 im Vergleich zu der Kontrolle. In [C] sind die Ergebnisse der IL-10 ELISA derselben Überstände abgebildet. So waren mehrere der getesteten Peptide in der Lage, die T-Zellen in der Kokultur zu einer vermehrten IL-10 Freisetzung mit bis zu 7,2 ng/mL anzuregen. Bei den anderen Peptiden kam es zu keiner im Vergleich zu der Kontrolle erhöhten IL-10 Sekretion. Generell war - im Vergleich zu der freigesetzten Menge an IFN γ - eine erhöhte Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-10 durch die CD8⁺ T-Zellen in der Kokultur zu beobachten.

4.3 TESTEN VON VORHERGESAGTEN CD8-PEPTIDEN *IN VITRO*

Nach Abschluss der Analyse der Peptide aus der LACK-Bibliothek wurden Peptide, die mit Hilfe verschiedener *in silico* Verfahren aus dem Gesamtpool an Proteinen von *L. major* ausgewählt worden waren, untersucht. Die Auswahl der Peptide erfolgte dabei zunächst mittels Massenspektrometrie, anhand derer die häufigsten Proteine aus beiden Lebensformen von *L. major* identifiziert wurden. Diese Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Computer-basierten Algorithmus SYFPEITHI auf die in den Proteinen vorkommenden immundominanten Peptide untersucht. Anhand der daraus resultierenden Rangliste - je höher der vergebene SYFPEITHI-Score, desto höher ist die theoretische Affinität der Peptide gegenüber MHC I-Molekülen - wurden schlussendlich 300 Peptide aus beiden Lebensformen ausgewählt, die im Folgenden weiter analysiert wurden.

Zunächst wurden alle ausgewählten Peptide auf ihre Stabilität hin, wie lange sie an MHC I-Moleküle binden, untersucht. Da neben der Affinität auch die Stabilität der Bindung eine wichtige - wenn nicht sogar entscheidende - Rolle spielt, um eine entsprechende Immunantwort zu generieren (van der Burg et al, 1996; Busch et al, 1998; Harndahl et al, 2011), wurde dieser Parameter zusätzlich analysiert. Dafür wurden die Peptide einzeln mit ¹²⁵I-gelabelten β_2m und der schweren Kette des MHC I- Komplexes auf eine mit Streptavidin-vorgebehandelten Szintillationsplatte gegeben. Dabei kommt es durch die Bindung des radioaktiven β_2m im MHC I-Peptid-Komplex zu einer Überführung in einen niedrigeren Energiezustand, was als Signal gemessen werden kann. Sobald sich der Komplex wieder auflöst, verschwindet das Signal. Somit konnte für jedes Peptid die reale Bindungszeit bei 37 °C gemessen werden, dargestellt in Abb. 14 [A]. Die Messung der Stabilität, d.h., wie lange die Peptide an MHC I binden, wurde in Kooperation mit Dr. Mikkel Nors Harndahl in der AG Buus, Panum Institut in Kopenhagen, Dänemark, durchgeführt. In [B] sind die Daten, wie stabil die ausgewählten Peptide an MHC I-Moleküle binden, gegen den SYFPEITHI-Score dargestellt.

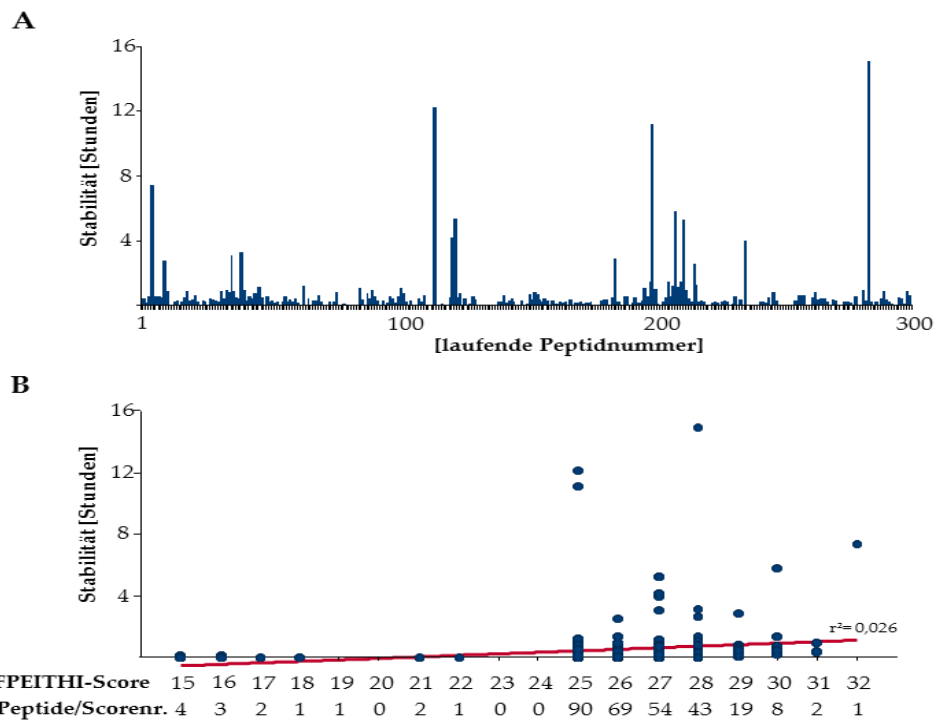


Abbildung 14: Korrelation zwischen der Affinität und der Bindungsstabilität der Peptide gegenüber MHC I-Molekülen. [A] Die 300 Peptide wurden, in Kooperation mit der AG Buus in Kopenhagen, auf ihre Bindungsstabilität gegenüber MHC I-Molekülen bei 37 °C untersucht. [B] Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Bindungsstabilität der Peptide gegenüber MHC I-Molekülen und dem SYFPEITHI-Score.

Eine Korrelation zwischen der Affinität und der Bindungsstabilität der 300 Peptide gegenüber MHC I-Molekülen besteht offensichtlich nicht [B]. Das Bestimmtheitsmaß r^2 , anhand derer die Korrelation zwischen zwei Parametern aufgezeigt werden kann, liegt in diesem Fall bei 0,026 (2,6 %), wobei 1 (100 %) die optimale Korrelation darstellen würde.

Nachdem die Analyse einer möglichen Korrelation zwischen der Affinität und der Bindungsstabilität der Peptide die Identifikation eines oder mehrerer Peptide als mögliche Vakzine nicht sicher eingrenzen konnte, wurden in den folgenden *in vitro* Versuchen alle 300 Peptide auf ihr spezifisches Zytokinprofil hin untersucht. Basierend auf den vorangegangenen Vorversuchen mit dem CD4-LACK-Peptid wurden die 300 Peptide in *in vitro* Versuchen mit DC aus naiven C57BL/6 Mäusen und geprimten CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die DC wurden vor Beginn der Kokultur für 18 Stunden mit LPS voraktiviert und anschließend für 4 min bei 55 kV und 40 Gy bestrahlt. Die Kokultur inklusive der

Peptide mit einer Endkonzentration von 10^{-6} mol wurde für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände auf die freigesetzten Mengen an IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10 untersucht. Die in Abb. 15 dargelegten Sekretionsmengen der unterschiedlichen Zytokine sind für n=4 unabhängige Versuche dargestellt, abzüglich der jeweiligen Negativkontrolle ohne Antigen. Dabei spielt die Reihenfolge der Peptide hier keine Rolle, da diese alphabetisch geordnet sind [9.2.2]. In [A] ist die Sekretion von IFN γ durch CD8⁺

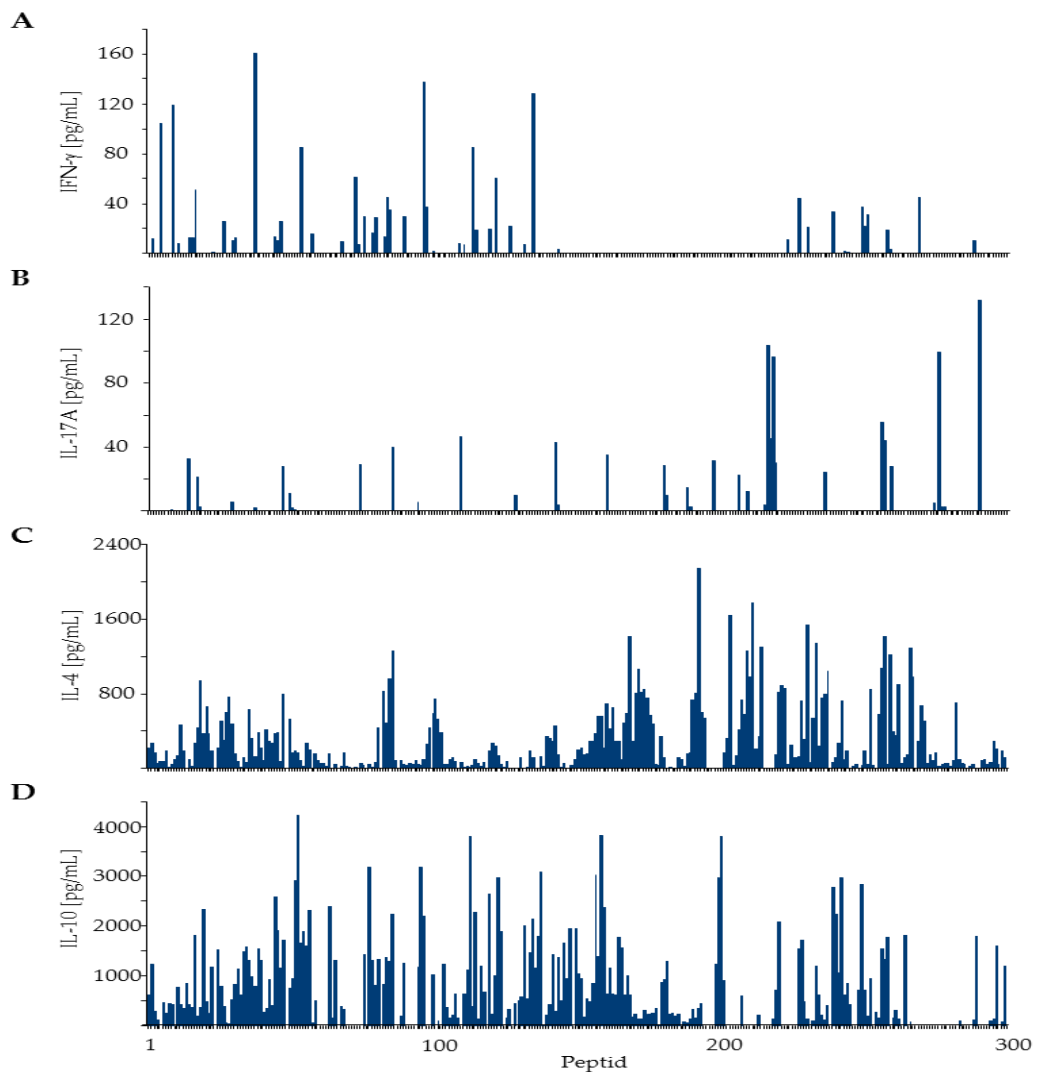


Abbildung 15: Kokultur aus peptidbeladenen DC und CD8⁺ T-Zellen. Die aus naiven C57BL/6 Mäusen gewonnenen DC wurden zunächst für 18 Stunden mit LPS vorbehandelt und anschließend für 4 min bei 55 kV und 40 gy bestrahlt. Anschließend wurden die DC mit den Peptiden beladen und zusammen mit MACS-aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen für 48 Stunden kokultiviert (Ratio DC:T-Zellen = 1:5). Nach zwei Tagen sind die Überstände abgenommen worden, und mittels ELISA wurde die sekretierte Menge an IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10 in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=4 unabhängigen Versuchen, abzüglich der jeweiligen Kontrolle ohne Peptid.

T-Zellen zu sehen, die in der Kokultur durch peptidbeladene DC aktiviert wurden. Die freigesetzte Menge an IFN γ variierte je nach Peptid. Interessant war hierbei, dass Peptide zwischen 1 und 150 vermehrt CD8⁺ T-Zellen zur IFN γ Freisetzung anregten im Vergleich zu den Peptiden mit den Nummern 151-300. Die Peptid-spezifische Freisetzung an IL-17A derselben Überstände ist in [B] zu sehen. Die durch CD8⁺ T-Zellen freigesetzte Menge an IL-17A variierte auch hier. Dabei waren Mengen des Zytokins in den Überständen zu messen, die zwischen 0 pg/mL und 130 pg/mL lagen. Interessant war, dass Peptide, die IFN γ sekretierten, kein oder nur sehr wenig IL-17A freisetzten - vergleiche [A und B]. Die Mengen an sekretiertem IL-4 in der Kokultur [C] stiegen auf bis zu 2300 pg/mL an. Andere Peptide induzierten hingegen keine Freisetzung dieses Zytokins. Peptide ab einer Nummer von 151 induzierten deutlich mehr die Sekretion von IL-4 durch CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Peptiden mit einer kleineren laufenden Nummer. Auch die Sekretion von IL-10 durch die CD8⁺ T-Zellen [D] variierte sehr. Hier lag die Sekretionsmenge dieses Zytokins zwischen 0 pg/mL und 4200 pg/mL. Allerdings war eine Positionstendenz der Zytokinfreisetzung, wie in [A] und [C] zu beobachten war, hier nicht zu sehen. Die vermehrte Freisetzung von IL-10 durch die in der Kokultur befindlichen CD8⁺ T-Zellen verteilte sich gleichmäßig über die gesamten 300 Peptide.

4.4 ZUSAMMENFASSENDER ANALYSE DER *IN VITRO* DATEN

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem SYFPEITHI-Score, der Bindungsstabilität und der Fähigkeit, T-Zellen zur Zytokinfreisetzung anregen zu können um anhand dieser zukünftig schneller eine Vorauswahl zu treffen, sind in Abb. 16 die Zytokine gegen den SYFPEITHI-Score und die Bindungsstabilität dargestellt. Als weiße Kreise sind die Peptide abgebildet, die später *in vivo* untersucht werden sollten, alle anderen Peptide wurden als dunkelblaue Punkte dargestellt. Die Betrachtung der SYFPEITHI-Scores gegen die jeweiligen Zytokine zeigte, dass hier keine Tendenz zu erkennen war, da das Bestimmtheitsmaß r^2 im Schnitt bei 0,003 (0,3 %) lag. Es war demnach also nicht möglich, eine Aussage bezüglich der Funktionalität der Peptide *in vivo* anhand der Korrelation des SYFPEITHI-Scores und der entsprechenden Zytokine treffen zu können [A - D].

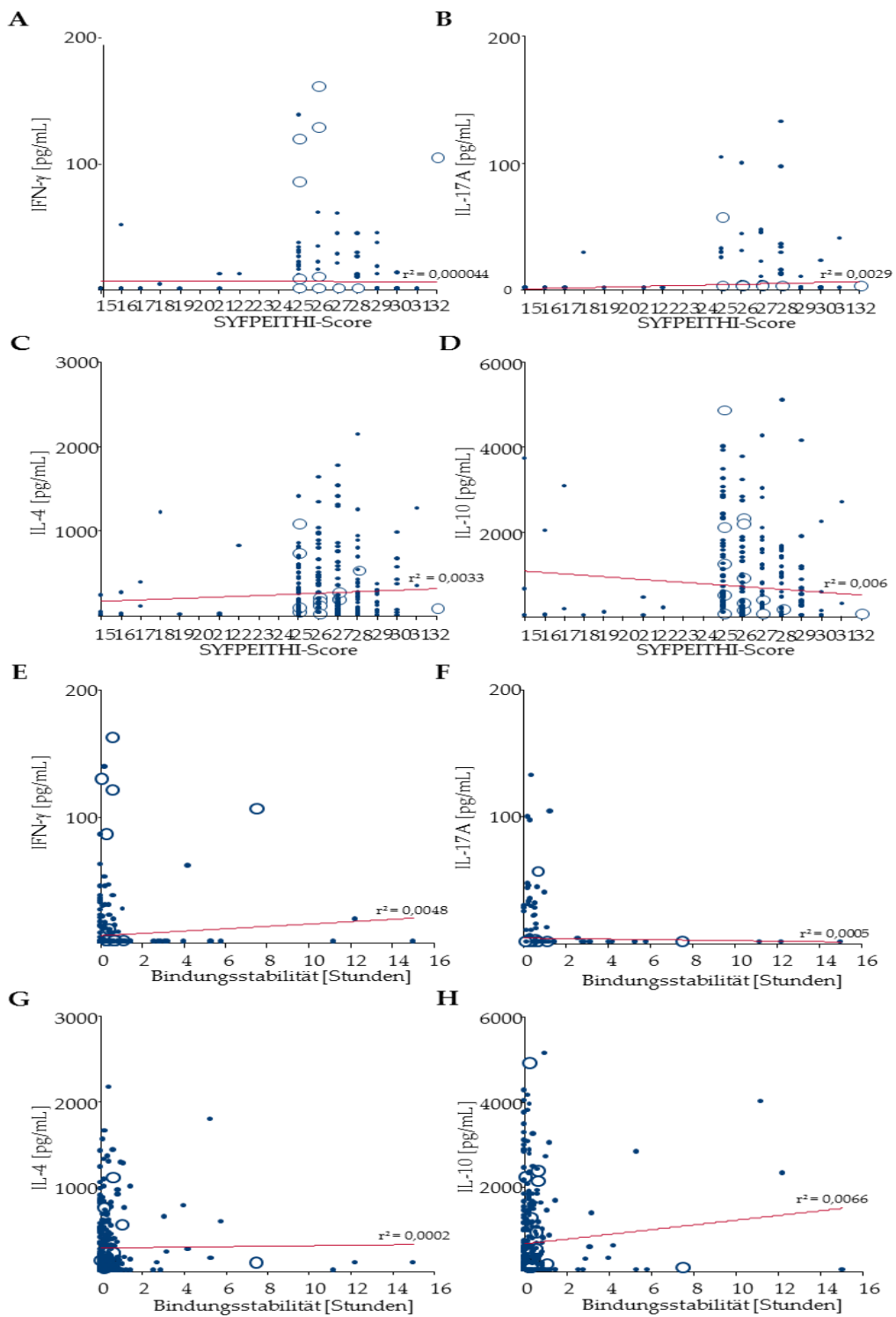


Abbildung 16: Kreuzanalyse der Zytokine gegen den SYFPEITHI-Score und die Bindungsstabilität der Peptide. Die vier analysierten Zytokine - IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10 - sind gegen die Affinität und die Bindungsstabilität dargestellt. Die weißen Kreise symbolisieren die Auswahl der Peptide für die folgenden *in vivo* Versuche, dagegen stellen die blauen Punkte alle anderen Peptide dar.

Bei den Analysen der Zytokine gegen die Bindungsstabilität wurde deutlich, dass die meisten Peptide eine geringe Bindungsstabilität gegenüber MHC I-Molekülen aufweisen [E - H], unabhängig vom Zytokinprofil der einzelnen Peptide. Auch hier weist das Bestimmtheitsmaß r^2 eine Korrelation im Schnitt von 0,003 (0,3 %) auf, wodurch von keiner Korrelation zwischen der Bindungsstabilität und den Zytokinprofilen der Peptide gesprochen werden kann.

Eine geeignete Vorauswahl der Peptide anhand einer möglichen Korrelation treffen zu können, wäre wünschenswert gewesen und hätte die zukünftige Suche nach geeigneten Peptidkandidaten erleichtert. Da dies anhand der Daten in Abb. 16 jedoch nicht möglich war, wurden der SYFPEITHI-Score und die Bindungsstabilität bei der Auswahl der Peptide für weitere *in vivo* Analysen vernachlässigt. Aus diesem Grund sind in Abb. 17 die Zytokinanalysen der einzelnen Peptide gegeneinander dargestellt worden, um dadurch gegebenenfalls ein Muster erkennen zu können. Bei den farbigen Kreisen handelt es sich um die Peptide, die *in vivo* weiter analysiert werden sollten und die blauen Kreise symbolisieren wiederum alle anderen Peptide.

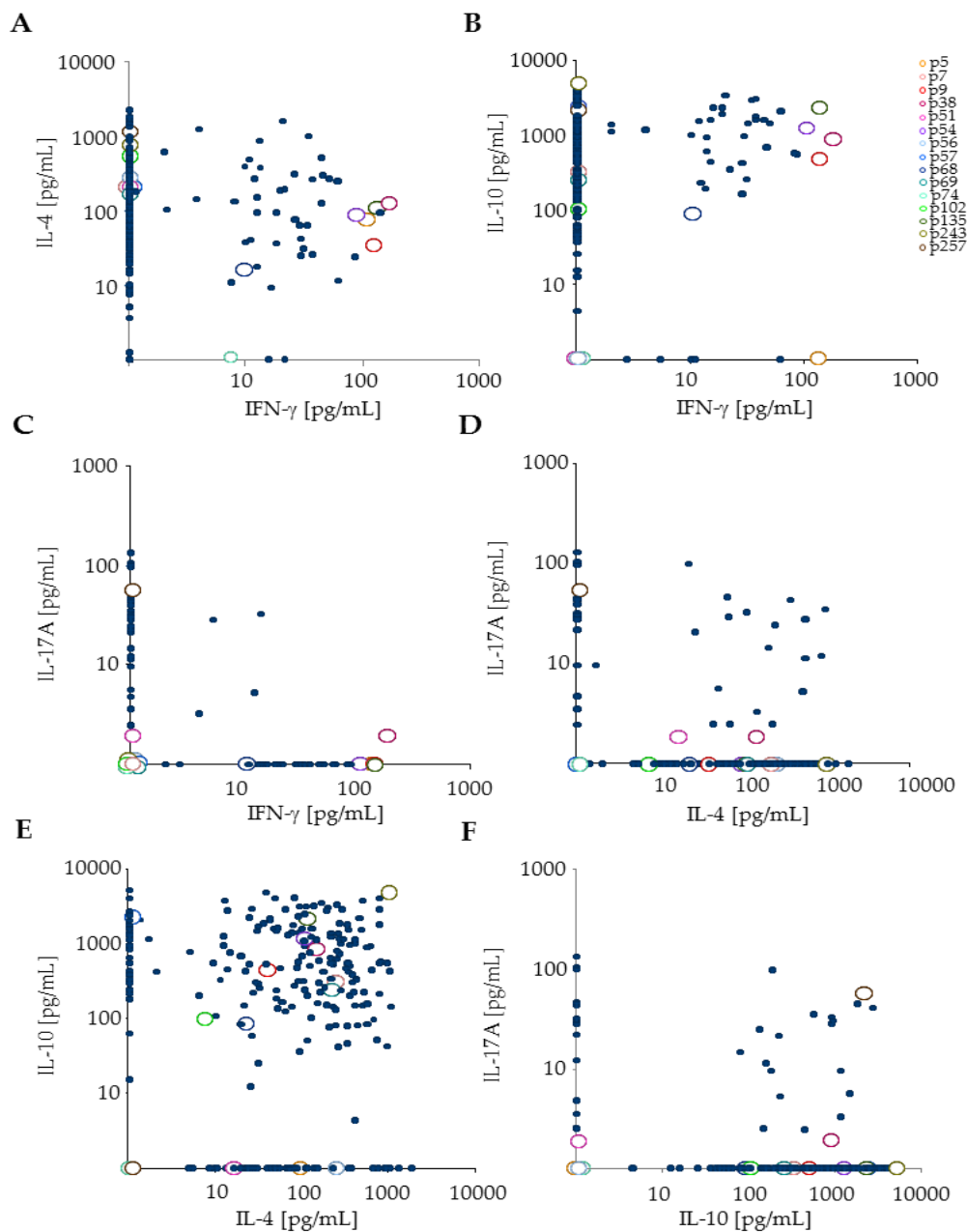


Abbildung 17: Kreuzanalyse der verschiedenen Zytokine IFN γ , IL-17A, IL-4 und IL-10. Die in den Überständen der Kokulturen untersuchten Zytokine wurden gegeneinander dargestellt, um dadurch ein mögliches Muster erkennen zu können, was die Auswahl möglicher Vakzinkandidaten vereinfachen sollte.

Dabei ist deutlich zu sehen, dass nur die Freisetzung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 von den meisten Peptiden gleichermaßen induziert wurde [E], nicht aber, oder nur in einem sehr geringen Maße, in Kombination mit einem der anderen Zytokine.

4.5 IMMUNISIERUNGEN MIT AUSGEWÄHLTEN CD8-PEPTIDEN *IN VIVO*

Basierend auf oben dargestellten *in vitro* Daten sind 15 Peptide für weitere *in vivo* Versuche ausgewählt worden [Abb. 18]. Hauptaugenmerk wurde dabei auf die sekretierte Menge an IFN γ gelegt. Zusätzlich sind weitere Peptide mit anderen Zytokinprofilen ausgewählt worden. Abgebildet sind die Mengen der jeweiligen Peptide als mean \pm SEM. Der jeweilige SYFPEITHI-Score und die Bindungsstabilität spielten hierbei eine untergeordnete Rolle.

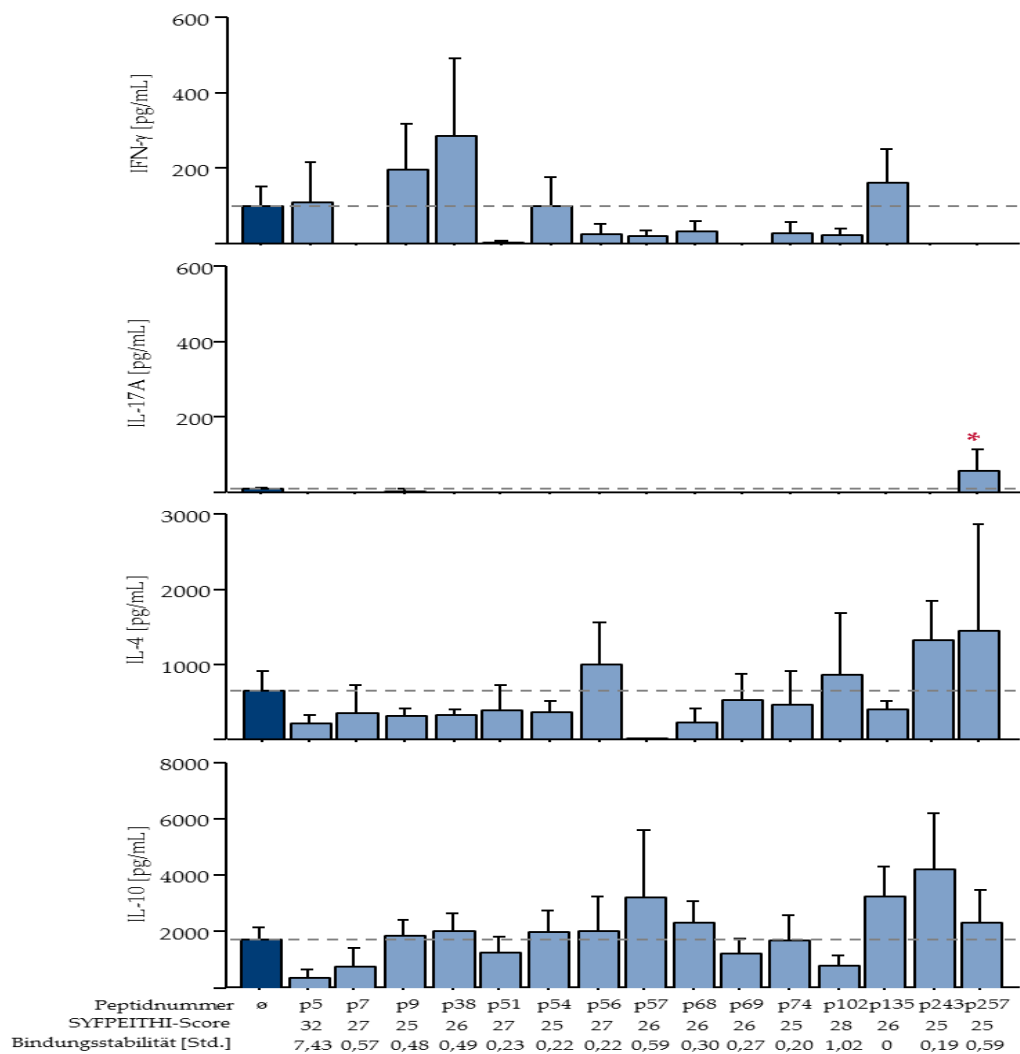


Abbildung 18: Auswahl der Peptide für *in vivo* Versuche. Basierend auf dem Zytokinprofil wurden 15 verschiedene Peptide für weitere *in vivo* Versuche ausgewählt. Hauptaugenmerk wurde bei der Auswahl auf die in den Überständen freigesetzte Menge an IFN γ gelegt. Zusätzlich wurden weitere Peptide ausgesucht, die *in vitro* keine IFN γ Freisetzung induzierten (n=4, mean \pm SEM, * = p<0,05).

Anhand der unterschiedlichen Zytokinfreisetzungen der 15 verschiedenen Peptide erfolgte eine Einteilung in $\text{IFN}\gamma^{\text{high}}$, zu denen die Peptide p9, p38 und p135 gehörten und in $\text{IFN}\gamma^{\text{low}}$, zu denen die Peptide p5, p7, p51, p54, p56, p57, p68, p69, p 74, p102, p243 und p257 gehörten.

4.5.1 DER PRIME/BOOST-ANSATZ ALS IMMUNISIERUNGS-STRATEGIE

C57BL/6 Mäuse sind zweimal mit den Peptiden in einem prime/boost (P/B)-Ansatz intradermal in die Ohren immunisiert worden. Dabei ist jedes Mal CpG als Adjuvanz mitgespritzt worden. Zunächst wurden 10 μg der Peptide appliziert und eine Woche später sind zum boosten ebenfalls 10 μg desselben Peptids verwendet worden. Als Positivkontrolle wurden 10 μg SLA (*soluble Leishmania antigen*; enthält den gesamten Proteinpool des Parasiten) eingesetzt. Dafür wurde die Proteinkonzentration des SLA mit Hilfe des *Bicinchoninic-Acid* (BCA)-Assays bestimmt. Als Negativkontrolle wurde PBS eingesetzt. Zwei Wochen nach dem boosten sind die Mäuse in das jeweils andere Ohr mit 10^3 metazyklischen promastigoten Leishmanien infiziert worden. Das Granulom, die sogenannte Läsion, die sich aufgrund der Infektion mit den Leishmanien im Ohr bildet, wurde wöchentlich in Dicke, Länge und Breite gemessen. Dadurch wurde es möglich, das Granulom dreidimensional darzustellen, den Verlauf über mehrere Wochen zu verfolgen und dann die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. In Abb. 19 ist der Verlauf der Läsionsvolumina der verschiedenen Peptide abgebildet. Die Ohrläsionen wurden über einen Zeitraum von 15 Wochen gemessen bis die Läsionen vollständig abgeheilt waren. Stets sind auch die Läsionen der Positivkontrolle (SLA) - gezeigt als graue Kreise - und der Negativkontrolle (PBS) - dargestellt als weiße Kreise - gemessen worden. Die Läsionen der Peptide sind als hellblaue Dreiecke abgebildet.

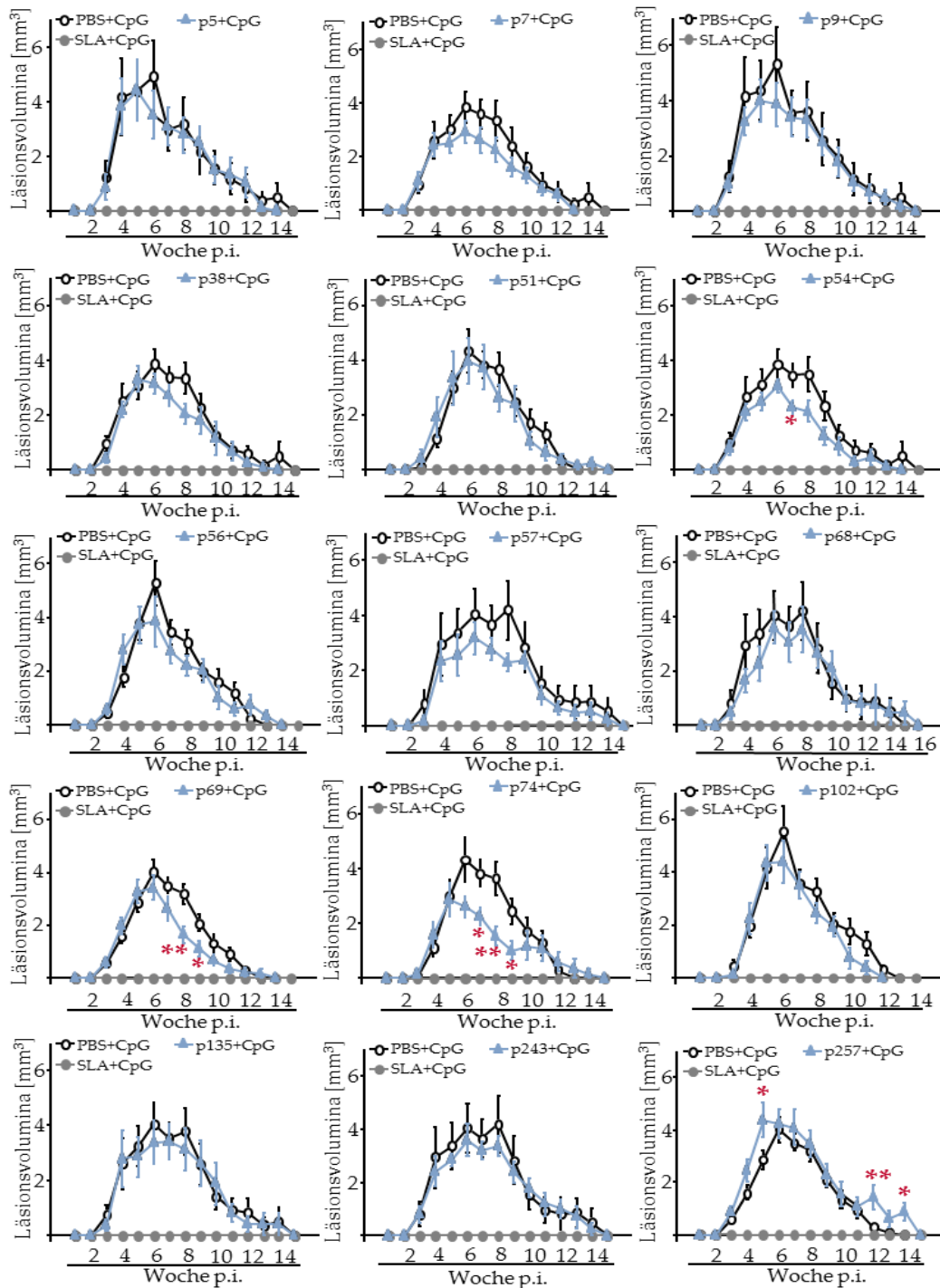


Abbildung 19: Verschiedene Peptide als mögliche Vakzine im P/B-Ansatz. C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 10 µg des Peptids inklusive CpG als Adjuvanz zweimal intradermal in die Ohren immunisiert. Zwei Wochen später sind dieselben Mäuse mit 10³ metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert worden. Der Verlauf der Granulombildung am Ort der Infektion wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 15 Wochen gemessen und ist als dreidimensionaler Wert dargestellt. Als Positivkontrolle diente SLA und als Negativkontrolle ist PBS - jeweils mit CpG als Adjuvanz - appliziert worden (n=4 unabhängige Versuche, mean ± SEM; * = p≤0,05, ** = p≤0,005).

Im Vergleich zu der Negativkontrolle waren nur p54, p69 und p74 in der Lage, die Mäuse partiell gegenüber einer Infektion mit *L. major* zu schützen. Bei diesen drei Peptiden kam es in den Wochen 7 (p54), den Wochen 8 und 9 (p69) und in den Wochen 7-9 (p74) zu einer signifikanten Reduktion der Läsionsgröße im Vergleich zu der PBS-Kontrolle. Alle anderen getesteten Peptide waren nicht in der Lage, den Verlauf der Leishmanien-Infektion zu verbessern. Nur die Gruppe, die mit SLA immunisiert worden war, entwickelte über die 15 Wochen der Messung keine Läsionen. Interessant war allerdings, dass p257 das Volumen der Läsion am Ohr in den Wochen 5, 12 und 14 nach der Infektion signifikant vergrößerte, die Infektion mit *L. major*, trotz der Immunisierung mit p257, verstärkt wurde.

4.5.2 PARASITENLASTEN IN WOCHE 6 NACH DER INFEKTION

Um eine Aussage über die Wirksamkeit der getesteten Peptide in den C57BL/6 Mäusen machen zu können, besteht durch die Bestimmung der Parasitenzahlen in den Ohren und der Milz die Möglichkeit, auf die genaue Anzahl der Parasiten zu schließen. Für die Parasitenlast wurden das infizierte Ohr und die Milz immunisierter und anschließend infizierter C57BL/6 Mäuse entnommen. Mit Hilfe enzymatischer und mechanischer Aufschlussverfahren wurden die infizierten Zellen aufgeschlossen und die Parasiten aus den Zellen freigesetzt. Nach 7-9 Tagen konnte anhand der Position in der 96 well-Platte über den Verdünnungsfaktor die Anzahl an Parasiten in dem jeweiligen Organ berechnet werden. Basierend auf den vorangegangenen *in vivo* Daten, wurden fünf Peptide ausgewählt, um im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf die Anzahl an Parasiten und damit auf die Wirksamkeit der Peptide als mögliche Vakzine rückschließen zu können. Dabei handelt es sich um Peptide, die in *in vivo* Versuchen die Läsionen partiell signifikant reduzierten (p38, p54 und p69). Das Peptid p7 reduzierte die Läsion nur im geringen Maße und durch p257 wurde die Läsion signifikant größer. SLA diente hierbei als Positivkontrolle. Im Vergleich zu den getesteten Peptiden und der PBS-Gruppe zeigten Mäuse deutlich geringere Parasitenzahlen in den Ohren auf, wenn sie vor der Infektion mit SLA immunisiert wurden [A]. Im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe konnte keines der getesteten Peptide die Parasitenanzahl in den Ohren reduzieren [A].

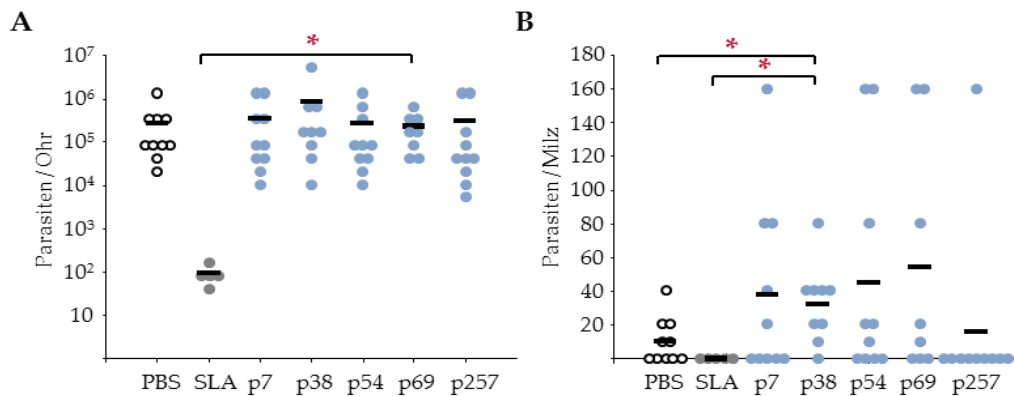


Abbildung 20: Parasitenlasten nach Immunisierung mit ausgewählten Peptiden. C57BL/6 Mäuse sind zweimal mit den verschiedenen Peptiden immunisiert (P/B-Ansatz) und anschließend in das andere Ohr infiziert worden. Sechs Wochen nach der Infektion sind die Ohren [A] und die Milz [B] entnommen worden und die spezifische Anzahl an Parasiten in den entsprechenden Organen wurde mittels Titrationskurve bestimmt (n=2 unabhängige Versuche, mean ± SEM; * = p≤0,05)

Wohingegen die Anzahl der Parasiten in der Milz [B], im Vergleich zu der PBS-Kontrolle, zum Teil signifikant erhöht war - siehe p38. Bei den anderen Peptiden - p7, p54, p69 und p257 - kam es zu keinem Unterschied, was die Anzahl der Parasiten im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe angeht. Jedoch ist die Anzahl an Gesamtparasiten im Vergleich zum Ohr hier verschwindend gering. Dies liegt vor allem an dem genetischen Hintergrund der Mäuse. Da bei C57BL/6 Mäusen eher eine Th1/Tc1-Immunantwort gegen *L. major* vorherrscht, kommt es bei diesem Mausstamm kaum zu einer Viszeralisierung in andere Organe.

4.5.3 PEPTID-POOLS ZUR VERSTÄRKUNG DES IMMUNISIERUNGSEFFEKTS

Da SLA als Peptidgemisch zu kleineren Ohrläsionen und verminderten Parasitenzahlen in den Organen führt, lag die Überlegung nahe, dass ein effektiver Impfstoff ebenfalls aus mehr als einem Peptid bestehen sollte. Da die Auswahl an möglichen Peptid-Kandidaten hoch war, wurden die Peptide für die Pools anhand der vorherigen *in vivo* Daten, siehe 4.5.1, ausgewählt. Dafür wurden die „besten“ Peptide, die die Mäuse teilweise gegenüber einer Infektion mit *L. major* schützten (p7, p38, p54 und p69), den „schlechtesten“ Peptiden (p5, p56, p102 und p257) gegenüber gestellt. Für die Immunisierungsversuche wurden C57BL/6 Mäuse im P/B-Ansatz mit den beiden Peptidgemischen - Endkonzentration der Peptide war jeweils 10⁻⁶ mol - immunisiert und nach zwei

Wochen in das andere Ohr mit 10^3 metazyklischen Promastigoten infiziert. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich gemessen und anschließend als dreidimensionaler Wert dargestellt, Abb. 21. Um nun die bestmögliche Strategie für die Wahl des Peptid-Pools zu identifizieren, wurde zwischen drei verschiedenen Ansätzen unterschieden.

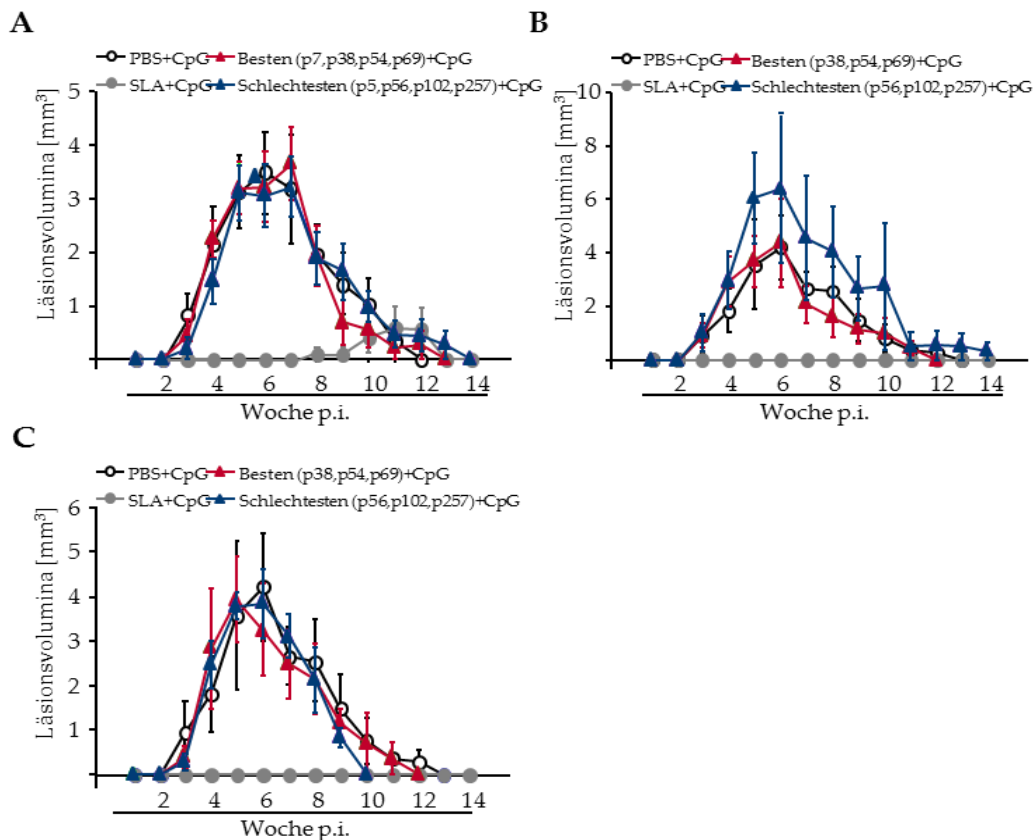


Abbildung 21: Verwendung von Peptid-Pools zur Verstärkung der Immunisierung. C57BL/6 Mäuse sind zweimal mit den verschiedenen Peptid-Pools, im P/B-Ansatz, immunisiert und anschließend in das andere Ohr infiziert worden. In [A] sind die vier besten und die vier schlechtesten Peptide zum selben Zeitpunkt in das Ohr der Mäuse injiziert worden (n=2). [B] stellt die Applikation der jeweiligen Peptide in einer 1:3 Verdünnung dar, um die gleiche Peptidkonzentration in die Ohren zu spritzen, wie in den Immunisierungsversuchen zuvor (n=1). In [C] schlussendlich sind die entsprechenden Peptide an drei aufeinanderfolgenden Tagen gespritzt worden, womit ein Konkurrenzverhalten der Peptide verhindert werden soll (n=1 unabhängiger Versuche, mean ± SEM).

Im ersten Ansatz - [A] - sind die vier besten und die vier schlechtesten Peptide miteinander gemischt und anschließend intradermal in die Ohren der Mäuse appliziert worden, wodurch eine Peptidkonzentration von 4×10^{-6} mol vorlag. Nach der Infektion mit *L. major* und dem anschließenden wöchentlichen Messen der Ohrläsionsvolumina war zwischen den beiden Peptid-Gruppen und der

PBS-Kontrolle kein Unterschied [A] zu sehen. Auch im zweiten Ansatz - [B] - waren die Peptide miteinander gemischt worden wie im ersten Ansatz, allerdings ist dieses Gesamt-Peptid-Gemisch anschließend nochmals 1:3 mit PBS verdünnt worden. Dies sollte die ursprüngliche Peptid-Konzentration von 10^{-6} mol in den vorangegangenen *in vivo* Versuchen imitieren. Es bestand ansonsten die Möglichkeit, dass die erhöhte Menge an Peptid einen negativen Effekt auf das Immunisierungsverhalten ausübt. Allerdings war auch bei diesem Ansatz kein Unterschied zwischen den beiden Peptidgruppen und der PBS-Kontrollgruppe zu sehen, [B]. Der dritte Ansatz [C] schließlich sollte das Konkurrenz-Verhalten - in Bezug auf die Bindung an MHC I-Moleküle - der Peptide untereinander verhindern. Daher waren die verschiedenen Peptide an drei aufeinanderfolgenden Tagen in die Ohren der Mäuse gespritzt worden. Aber auch hier zeigten sich keine Unterschiede, weder zwischen den beiden Peptidgruppen noch zu der PBS-Kontrollgruppe.

4.5.4 IMMUNISIERUNGSVERSUCHE MIT IL-4^{-/-} MÄUSEN

Um den Einfluss einiger Peptide, die in *in vitro* Versuchen CD8⁺ T-Zellen zu einer vermehrten IL-4 Sekretion anregen, *in vivo* genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit C57BL/6 IL-4^{-/-} Mäusen gemacht, um den Einfluss eines Th2-Zellen induzierenden Peptids zu analysieren. Durch fehlende IL-4-Sekretion in den Mäusen wird zwar nicht die B- und T-Zell Entwicklung beeinflusst, aber die Differenzierung der T-Zellen zu Th2-Zellen - da IL-4 hierfür essentiell ist (Kühn et al, 1991). Zusätzlich wird durch fehlendes IL-4 die Differenzierung der DC und damit der Verlauf der Infektion beeinträchtigt. So kommt es durch späte oder gar keine Freisetzung von IL-4 zu einer Verlagerung in Richtung Th2-Immunantwort, da die DC kein bis sehr wenig IL-12 freisetzen (Biedermann et al, 2001), was schlussendlich den progressiven Verlauf der Erkrankung veranlasst.

Für die Immunisierungsversuche sind IL-4^{-/-} Mäuse mit zwei verschiedenen Peptiden intradermal in die Ohren immunisiert worden. Dabei handelte es sich um p54, welches *in vitro* vermehrt die Sekretion von IFN γ und IL-10 ermöglichte, und p56, das überwiegend die Freisetzung von IL-4 und IL-10 induzierte. Die Peptide waren in Kombination mit CpG als Adjuvanz im P/B-Ansatz appliziert

worden. Als Kontrolle wurden zusätzlich C57BL/6 Mäuse mit den gleichen Peptiden zu denselben Zeitpunkten immunisiert. Als Negativkontrolle wurde PBS in Kombination mit CpG, injiziert. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich über einen Zeitraum von 16 Wochen gemessen und sind als dreidimensionaler Wert in Abb. 22 dargestellt. In [A] sind die Läsionsvolumina der C57BL/6 Mäuse dargestellt, die entweder mit p54 oder p56 immunisiert worden waren. Die Läsionen verliefen ähnlich zu der PBS-Kontrollgruppe. Die Immunisierung mit den beiden unterschiedlichen Peptiden hatte demnach auf den Verlauf einer Erkrankung mit *L. major* keinen Einfluss.

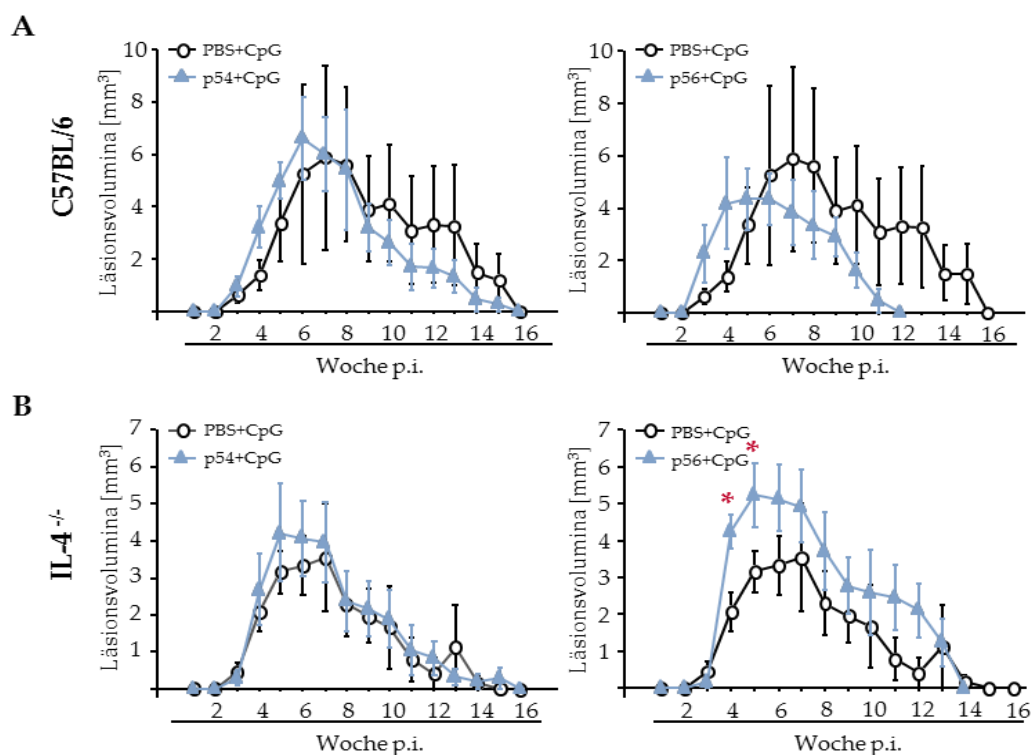


Abbildung 22: Immunisierung von C57BL/6 IL4^{-/-} Mäusen. C57BL/6 IL4^{-/-} und C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 10 µg Peptid inklusive CpG als Adjuvanz zweimal intradermal in die Ohren immunisiert. Zwei Wochen später wurden dieselben Mäuse mit 10³ metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert. Der Verlauf der Granulombildung am Ohr wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 16 Wochen gemessen und ist als dreidimensionaler Wert dargestellt. Als Negativkontrolle ist PBS - ebenfalls mit CpG als Adjuvanz - appliziert worden (n=2 unabhängige Versuche, mean ± SEM; * = p≤0,05).

Im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen zeigten IL4^{-/-} Mäuse [B] nach Immunisierung mit p56 eine signifikante Vergrößerung der Läsion am Ohr in Woche 4 und 5 nach der Infektion. Zusätzlich war das Granulom im Vergleich zu der PBS-Kontrolle über den gesamten Verlauf der Infektion deutlich dicker,

heilte aber bereits in Woche 14 komplett aus. Im direkten Vergleich mit den C57BL/6 Mäusen, die mit demselben Peptid immunisiert wurden, führte eine Immunisierung bei den IL-4^{-/-} Mäusen zu einer Verschlechterung der Erkrankung. Dagegen hatte die Immunisierung mit p54 keinen Einfluss auf das Läsionsvolumina der IL-4^{-/-} Mäuse. Hier verlief die Kurve ähnlich der PBS-Kontrollkurve und auch ähnlich der C57BL/6 Mäuse, die mit demselben Peptid immunisiert wurden.

4.5.5 DER PRIME/BOOST/BOOST-ANSATZ ALS IMMUNISIERUNGSSTRATEGIE

Nach Abschluss der vorangegangenen Versuche (Kapitel 4.5.1 bis 4.5.4) stellte sich die Frage, ob der P/B-Ansatz geeignet war, um als optimale Immunisierungsstrategie zu fungieren. Denn die Versuche im P/B-Ansatz zeigten, dass die Peptide nur einen sehr geringen Einfluss auf die anschließende Granulombildung haben. Die einzigen Ausnahmen bildeten hier die Peptide p54, p69 und p74. Daher stellte sich die Frage, ob eine Veränderung der Immunisierungsstrategie den Effekt, der bei den Peptiden p54, p69 und p74 sichtbar war, verbessern, d.h., die Läsion weiter reduzieren würde.

Im prime/boost/boost (P/B/B)-Ansatz sind C57BL/6 Mäuse zunächst mit 20 µg der Peptide - in Verbindung mit CpG als Adjuvanz - intradermal in die Ohren immunisiert worden. Anschließend folgten zwei weitere Immunisierungsschritte mit jeweils 10 µg des Peptids, ebenfalls in Kombination mit CpG. Auch hier diente SLA, in einer zu den Peptiden vergleichbaren Konzentration, als Positiv- und PBS als Negativkontrolle. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse in das jeweils andere Ohr mit 10³ metazyklischen promastigoten Leishmanien infiziert. Die Läsionsvolumina wurden wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Wochen gemessen und sind als dreidimensionaler Wert dargestellt. Die Läsionsvolumina von den sechs für diese Versuche ausgewählten Peptiden sind in Abb. 23 im Vergleich zur PBS- und SLA-Kontrolle dargestellt. Die Peptide wurden auf Basis der vorangegangenen *in vitro* und der P/B Versuche ausgewählt. Dabei handelte es sich um die Peptide p7, p38, p54, p57, p69 und p74. Im P/B/B-Ansatz zeigten drei der ausgewählten Peptide im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine partielle Verkleinerung der Läsionsvolumina auf - p38, p69 und p74. Zwei Peptide - p7 und p57 - hatten keinen Einfluss auf

das Läsionsvolumen, hier verlief die Kurve ähnlich der PBS-Kontrolle.

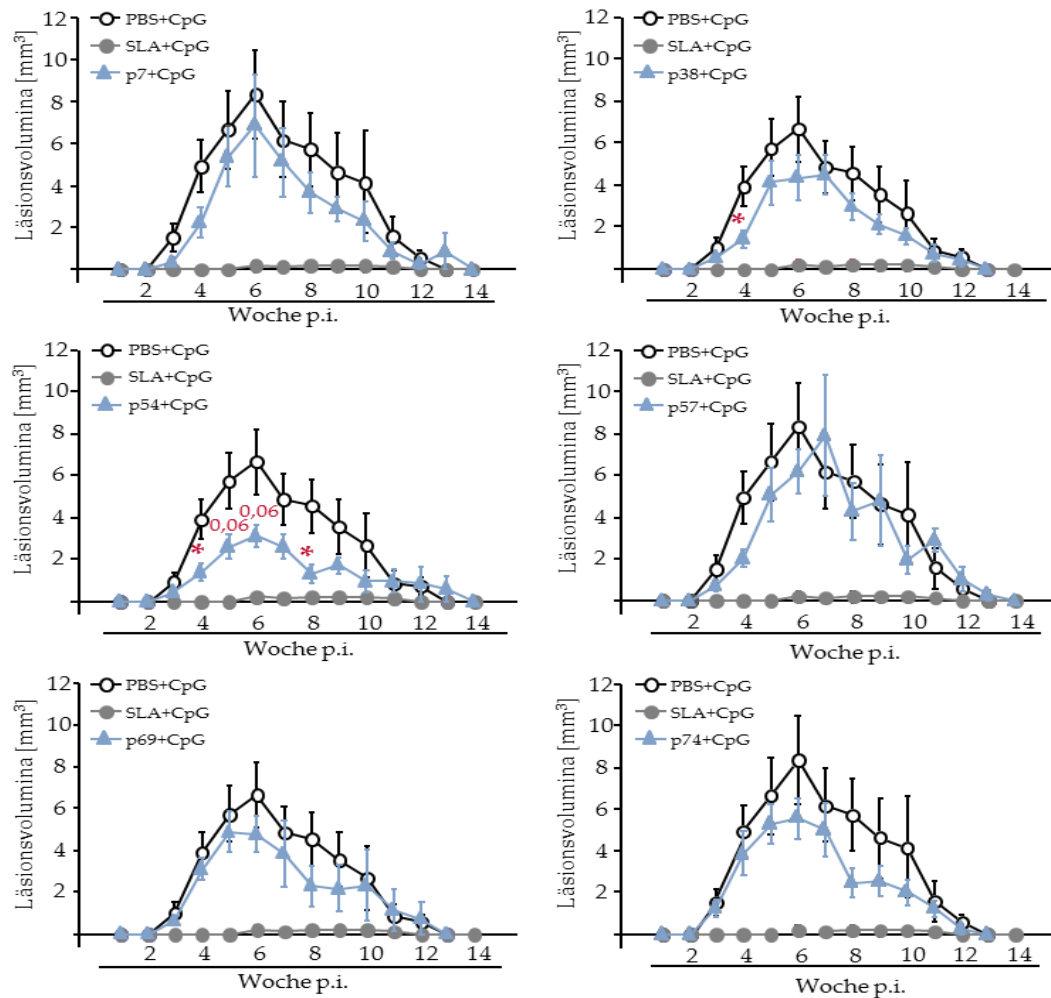


Abbildung 23: Läsionsvolumina von C57BL/6 Mäusen im P/B/B-Ansatz. C57BL/6 Mäuse wurden zunächst mit 20 µg des Peptids inklusive CpG als Adjuvanz intradermal in die Ohren immunisiert. Anschließend folgten zwei weitere Immunisierungsschritte mit jeweils 10 µg Peptid inklusive CpG. Eine Woche nach der letzten Immunisierung sind dieselben Mäuse mit 10^3 metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert worden. Der Verlauf der Granulombildung am Ort der Infektion wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Wochen gemessen und ist als dreidimensionaler Wert dargestellt. Als Positivkontrolle diente SLA und als Negativkontrolle ist PBS - jeweils mit CpG als Adjuvanz - appliziert worden (n=3 unabhängige Versuche, mean ± SEM; * = p≤0,05).

Der Effekt der Läsionsreduktion, der bei den Peptiden p69 und p74 im P/B-Ansatz deutlich zu sehen war, ist im P/B/B-Ansatz nicht mehr vorhanden. Allerdings zeigte p38 - im Vergleich zum P/B-Ansatz - eine partiell signifikante Reduktion der Läsionsvolumina. Allein p54 war in der Lage - im Vergleich zu

dem P/B-Ansatz und der PBS-Kontrolle - das Läsionsvolumen der C57BL/6 Mäuse über den gesamten Zeitraum signifikant zu reduzieren.

4.5.6 INTRAZELLULÄRES FACS NACH PEPTID-RESTIMULATION

Um verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Zytokinfreisetzung nach Stimulation charakterisieren zu können, besteht die Möglichkeit, die Zytokinproduktion mittels intrazellulärem (ic) FACS darzustellen. Zunächst müssen dabei lebende von toten Zellen differenziert werden, um die Zahl der zytokinproduzierenden Zellen weiter einzugrenzen, welche in der späteren durchflusszytometrischen Messung nachgewiesen werden können. Für die Untersuchung, ob durch die Applikation von p54 Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert wurden, die schlussendlich für die Reduktion der Läsion mitverantwortlich waren, wurde mittels ic FACS das Zytokinprofil und die dazugehörige spezifische Zellpopulation genauer charakterisiert.

C57BL/6 Mäuse sind im P/B/B-Ansatz mit p38, p54 und p69 intradermal in das eine Ohr immunisiert und anschließend in das andere Ohr infiziert worden. 11 Wochen nach der Infektion sind die dLN der Mäuse entnommen, und die isolierten Zellen für 2 h mit den Peptiden p38, p54 und p69 kultiviert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert worden. Im Anschluss daran wurde zu allen Ansätzen Brefeldin A gegeben. Diese Ansätze sind dann für weitere 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert worden. Danach folgten die intrazelluläre Zytokinfärbung und die daran anschließende durchflusszytometrische Analyse der Zellen. In Abb. 24 ist die Peptid-spezifische Freisetzung von IFN γ , IL-4 und IL-10 durch CD8⁺ T-Zellen nach Restimulation mit den jeweiligen Peptiden in Prozent dargestellt.

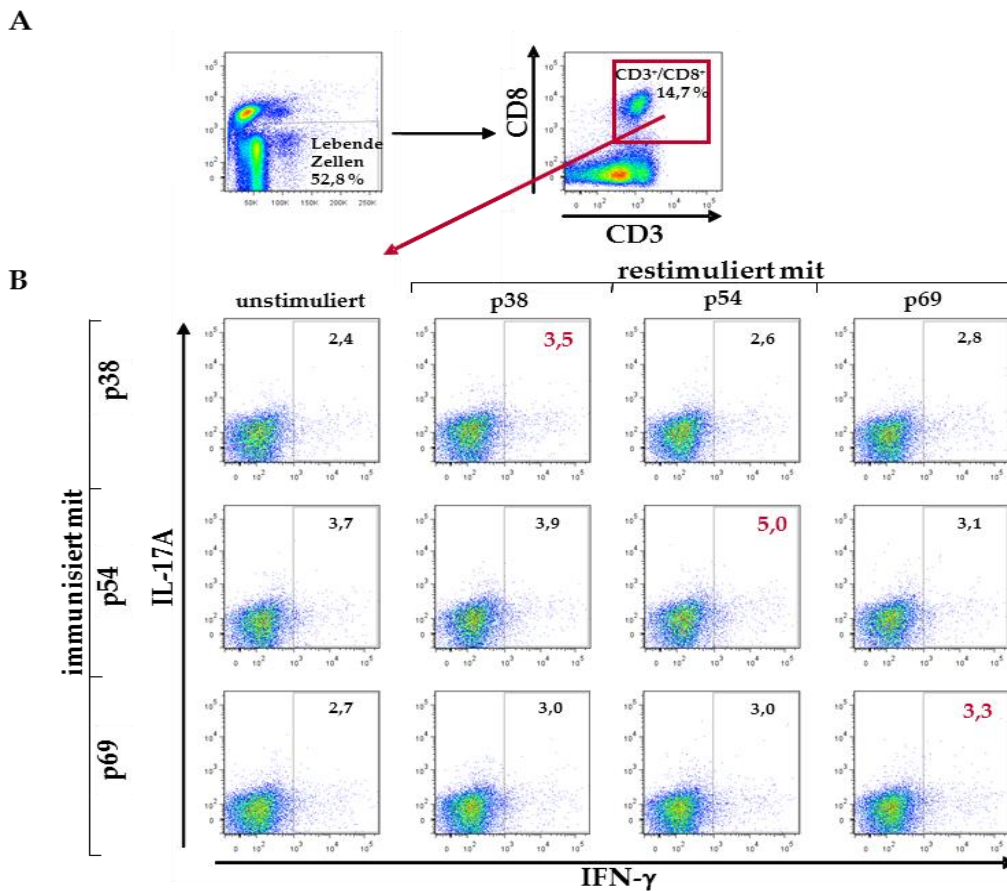


Abbildung 24: Intrazelluläres Zytokinprofil nach Restimulation mit p38, p54 und p69. C57BL/6 Mäuse sind im P/B/B-Ansatz intradermal mit den Peptiden p38, p54 und p69 in die Ohren immunisiert worden. Zwei Wochen später sind dieselben Mäuse in das andere Ohr infiziert worden. 11 Wochen nach der Infektion sind die dLN entnommen worden und die Zellen mit p38, p54 und p69 für 6 h restimuliert worden. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometer die Peptid-spezifische Zytokinfreisetzung der Zellen bestimmt. [A] zeigt die Gating-Strategie, um in [B] die peptidspezifische IFN γ Freisetzung der CD3⁺/CD8⁺ Zellen darzustellen (n=1 unabhängiger Versuch).

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden zunächst die lebenden Zellen und daraus dann die CD3/CD8 doppelt-positiven Zellen voreingestellt [A]. Der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die aus mit p38 immunisierten Mäusen stammten, und dann mit dem gleichen Peptid restimuliert wurden, lag bei 3,5 % und war damit 1,1 % höher im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle [B]. Dies war auch bei CD8⁺ T-Zellen zu beobachten, die aus mit p54 immunisierten Mäusen stammten und anschließend mit p54 restimuliert wurden [B]. Hier lag der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die intrazellulär IFN γ produziert hatten, 1,3 % über der unstimulierten Kontrolle. Der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die aus mit p69 immunisierten Mäusen stammten und mit diesem

Peptid restimuliert wurden, ist deutlich geringer: 0,6 % im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle [B]. Jedoch war bei den getesteten Peptiden p38 und p69 auch eine Kreuzreaktion mit einem der jeweils anderen Peptide zu beobachten, nicht jedoch bei p54.

4.5.7 ZUSAMMENFASSENDE ANALYSE DER *IN VITRO* UND *IN VIVO* DATEN

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den getesteten Parametern zu erkennen und damit die zukünftige Suche nach einem *Leishmania*-spezifischen Peptid zu erleichtern, sind in Abb. 25 alle Ergebnisse für die 15 *in vivo* untersuchten Peptide zusammenfassend nochmals aufgelistet.

Peptid	SYFPEITHI-Score	Bindungsstabilität [Stunden]	IFN γ [pg/mL]	IL-17A [pg/mL]	IL-4 [pg/mL]	IL-10 [pg/mL]	P/B-Ansatz	P/B/B-Ansatz
5	32	7,43	105	1	71	1	-	-
7	27	0,57	1	1	176	314	-	+
9	25	0,48	119	1	33	450	-	-
38	26	0,49	161	2	121	833	-	+
51	27	0,23	1	2	171	1	-	-
54	25	0,22	85	1	82	1181	+	++
56	27	0,22	1	1	263	1	-	-
57	26	0,58	1	1	192	2264	-	+
68	26	0,30	10	1	16	87	-	-
69	26	0,27	1	1	157	241	+	+
74	25	0,20	8	1	1	1	+	+
102	28	1,02	1	1	519	98	-	-
135	26	0	129	1	103	2138	-	-
246	25	0,19	1	1	719	4811	-	-
257	25	0,59	1	56	1070	2032	-	-

Abbildung 25: Tabellarische Darstellung der *in vitro* und *in vivo* Daten. Die 15 *in vivo* analysierten Peptide sind getrennt nach ihren SYFPEITHI-Scores, der Bindungsstabilität, den Zytokinprofilen und den Ergebnissen der beiden Immunisierungsstrategien aufgelistet (- = schlecht, + = mittelmäßig, ++ = gut).

Interessant ist dabei die Tatsache, dass die Peptide p54, p69 und p74, die im P/B-Ansatz die Läsionen partiell reduzierten, *in vitro* die T-Zellen zu verminderten IFN γ Freisetzungen anregten, aber auch die anderen drei Zytokine nicht verstärkt sekretiert wurden. Die Bindungsstabilität lag bei den drei Peptiden zwischen 0,2 und 0,27 Stunden und der SYFPEITHI-Score bei 25 und 26. Generell ist aus der Tabelle ersichtlich, dass der P/B-Ansatz für zukünftige Analysen nicht empfehlenswert ist, da die Immunisierung mit den verschiedenen Peptiden nur einen geringen Einfluss auf die Läsionsgröße hatte. Jedoch konnten die Läsionen im P/B/B-Ansatz weiter reduziert werden, womit dies zukünftig die zubevorzugende Strategie für weitere Immunisierungsversuche sein sollte.

5. DISKUSSION

Ziel der Arbeit war die Identifikation von CD8⁺ T-Zell-spezifischen Peptiden, die als mögliche Vakzine gegen die murine kutane Leishmaniasis eingesetzt werden können.

In vitro Untersuchungen zum Einfluss der Peptide auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Um die Peptide in späteren Versuchen genauer analysieren zu können, musste in Vorversuchen zunächst die zu verwendende Peptidkonzentration und eine mögliche Vorbehandlung der DC und der damit einhergehende Einfluss auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen genauer untersucht werden. Diese Vorversuche wurden mit dem CD4-LACK-Peptid durchgeführt, dem einzig bislang bekannten Leishmanien-Peptid.

Dafür wurden die generierten DC entweder nicht weiter behandelt, mit 55 kV für 4 min und 40 Gy bestrahlt oder zusätzlich mit LPS aktiviert. Um eine Aussage treffen zu können, ob das verwendete Peptid eine Th1/Tc1- oder eine Th2-Immunantwort induziert, kann im Überstand die durch die T-Zellen sekretierte Menge an IFN γ und IL-4 mit Hilfe eines ELISA gemessen werden. Dabei wird die Gesamtmenge des Zytokins gemessen, es kann also keine Aussage getroffen werden, welche Zelle wie viel des gemessenen Zytokins freigesetzt hat. Nach der Analyse der Überstände der verschiedenen Kokulturen, bestehend aus den unterschiedlich vorbehandelten DC und den beiden T-Zell-Populationen - CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen - zeigt sich sehr deutlich, dass nicht nur die Peptidkonzentration einen großen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen hat, sondern auch die Vorbehandlung der DC. Durch das Bestrahlen der DC vor Beginn der Kokultur soll die Grundaktivierung der DC herabgesenkt, die Funktionalität der Zellen aber nicht eingeschränkt werden. Dieser Effekt konnte in den Versuchen [Abb. 10], weder in der Kokultur mit CD4⁺ noch CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Durch das Bestrahlen der DC kommt es generell zu einer erhöhten Freisetzung der beiden getesteten Zytokine, egal ob DC und T-Zellen alleine, oder mit Peptid kokultiviert. Das LPS sorgt hingegen für eine erhöhte Aktivierung der DC. Es kommt zu einer vermehrten Anzahl von MHC-Molekülen auf den DC, durch die dann verstärkt Peptide aufgenommen bzw.

prozessiert werden können. Dies hat auf die CD4⁺ T-Zellen einen geringeren Einfluss, da auch hier bei der Kontrolle vermehrt Zytokine freigesetzt wurden. Allerdings können CD8⁺ T-Zellen von diesem Peptid aktiviert werden, was auf Crosspräsentation (den Haan et al, 2000) zurückzuführen ist. Die Peptidkonzentration hat demnach einen entscheidenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten der beiden T-Zell-Populationen. So zeigt sich unmissverständlich, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch eine Peptidkonzentration von 10⁻⁶ mol zu einer vermehrten Zytokinfreisetzung angeregt werden [Abb. 10]. Die anderen getesteten Peptidkonzentrationen hatten hier keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen. Die eingesetzte Konzentration des Peptids entspricht damit auch der publizierten Konzentration von *Busch et al* (Busch et al, 1998). Sie konnten anhand verschiedener Peptide von *Listeria monozytogenes* zeigen, welches die am besten geeignete Peptidkonzentration für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen *in vitro* ist.

Anhand der Vorversuche mit dem CD4-LACK-Peptid konnte somit, neben der bereits veröffentlichten Peptidkonzentration, zusätzlich die CD4⁺ T-Zell-aktivierende Eigenschaft des Peptids bestätigt werden (Mougneau et al, 1995).

In vitro Untersuchungen des LACK-Proteins

Bis heute sind einige Leishmanien-Proteine identifiziert und deren Wirksamkeit als Vakzin in Mausmodellen, aber auch am Menschen getestet worden. Darunter ist auch das LACK-Protein, welches von beiden Lebensformen gleichermaßen exprimiert wird (Mougneau et al, 1995). So konnte bereits von *Kronenberg et al* (Kronenberg et al, 2006) gezeigt werden, dass das Fusionsprotein TAT-LACK in Kombination mit CpG als Adjuvanz in der Lage ist, C57BL/6 Mäuse vor einer Infektion mit *L. major* zu schützen. Die Läsionen waren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant kleiner. Demnach wurde durch die Applikation von TAT-LACK die Th1-Immunantwort in den Mäusen verstärkt, was mit erhöhter IFN γ Sekretion und IL-12 Freisetzung einhergeht, und schlussendlich zum Abtöten des Parasiten führt (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002; von Stebut, 2007). In einem anderen Versuchsansatz wurde das LACK-Protein in Kombination mit IL-12 als Adjuvanz appliziert, wodurch es ebenfalls zu einer Verbesserung der Erkrankung in BALB/c Mäusen kam (Mougneau et al, 1995; Gurunathan et al, 1997; Gurunathan et al, 1998; Gurunathan et al, 2000). Die

Applikation des gesamten Proteins in Kombination mit einem Adjuvanz führte zu einer Th1-Immunantwort mit IFN γ Freisetzung (Mougneau et al, 1995; Gurunathan et al, 1997; Gurunathan et al, 1998; Gurunathan et al, 2000; Kronenberg et al, 2006). Mittels der Identifikation eines Epitop des LACK-Proteins von 158-173 bp, dass einerseits spezifische CD4⁺ T-Zellen aktiviert, und andererseits verantwortlich ist für die Induktion von frühem IL-4 und somit den progressiven Verlauf der Leishmaniasis initiiert (Sacks et al, 2002), konnte dieses sogenannte CD4-LACK-Peptid als Initiator der Th2-Immunantwort ausgemacht werden. Da für eine Ausheilung der Leishmaniasis eine Th1/Tc1 Aktivierung mit erhöhten Mengen an IFN γ nötig ist, stellt sich nun die Frage, ob in dem LACK-Protein neben dem CD4-LACK-Peptid Epitope/Peptide enthalten sind, die eine IFN γ Sekretion induzieren können. Um dies zu untersuchen, wurde eine überlappende Peptid-Bibliothek kreiert, anhand derer mögliche weitere Peptide identifiziert werden sollten, die *in vitro* und möglicherweise auch *in vivo* vermehrt die Freisetzung verschiedener Zytokine, wie IFN γ und IL-4, durch Effektorzellen induzieren.

Allerdings konnte keines der Peptide der Peptid-Bibliothek die in der Kokultur vorhandenen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zu einer vermehrten IFN γ Sekretion anregen [Abb. 12 und 13]. Die Existenz eines IFN γ induzierenden Peptids innerhalb des LACK-Proteins ist demnach ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu waren mehrere der Peptide in der Lage, die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Kokultur zu einer vermehrten IL-4 und IL-10 Sekretion anzuregen [Abb. 12 und 13]. Jedoch handelt es sich bei diesen beiden Zytokinen um Th2-Zytokine, die den progressiven Verlauf der Leishmaniasis begünstigen. Dies bestätigt damit auch die Schlussfolgerung von *Sacks et al* (Sacks et al, 2002), die bereits von der Induktion des frühen IL-4 sprachen, welches durch die Anwesenheit des LACK-Proteins von den CD4⁺ T-Zellen freigesetzt wird. Dies konnten auch *Launois et al* auf mRNA-Ebene bestätigen, und zusätzlich entdeckten sie bei der Analyse verschiedener Peptide aus dem LACK-Protein ein weiteres IL-4-induzierendes Peptid, das *in vivo* CD4⁺ T-Zellen zu einer frühen Freisetzung von IL-4 anregte (Launois et al, 2007). Anhand dieser *in vitro* Ergebnisse kann demnach die Th2-induzierende Fähigkeit des LACK-Proteins bestätigt werden. Die Th1-Induktion des Proteins, die *in vivo* mehrfach gezeigt werden konnte (Mougneau et al, 1995; Gurunathan et al, 1997; Gurunathan et al, 1998;

Gurunathan et al, 2000; Kronenberg et al, 2006), ist demnach einerseits auf die Anwesenheit der jeweiligen Adjuvanzien zurückzuführen, und andererseits auf die Tatsache, dass ein *in vitro* Versuch nicht mit einem *in vivo* Experiment verglichen werden sollte. Denn *in vitro* befinden sich die verschiedenen Zellen mit anderen Zellen in definierten Volumen. Daher stellt sich die Frage, ob bei der Verwendung von Th2-induzierenden Peptiden als Vakzine, Mäuse dennoch in Kombination mit unterschiedlichen Adjuvanzien, wie IL-12, erfolgreich immunisiert werden können. Diese Frage bleibt an dieser Stelle allerdings offen und muss in weiteren Versuchen genauer analysiert werden.

In vitro Untersuchungen von Peptiden aus beiden Lebensformen von *L. major*

Während einer Infektion mit Leishmanien spielen nicht nur CD4⁺, sondern auch CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr (Belkaid et al, 2002) gegen diesen Parasiten. Dabei konnte die Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen nicht nur im murinen Modell, sondern auch beim Menschen gezeigt werden, indem geprimte, aufgereinigte humane CD8⁺ T-Zellen *in vitro* mit verstärkter IFN γ Sekretion auf die Restimulation durch parasitäre Antigene reagierten (De Luca et al, 1999; Bottrel et al, 2001; Pompeu et al, 2001). Ebenfalls konnte beim Menschen gezeigt werden, dass kleinere Läsionen mit erhöhten Anzahlen an zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen einhergehen (Antonelli et al, 2005). Da somit die CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Leishmaniasis spielen, ob nun im murinen oder human Modell, wurden basierend auf vorangegangenen *in silico* Analysen 300 Peptide von *L. major* ausgewählt, die begrenzt auf MHC I sind (Dissertationen Brosch, 2010; Grewe, 2011).

Ein weiteres Kriterium war die Lebensform, aus der die verschiedenen Peptide stammen. So wird die promastigote Lebensform bei dem Biss der Sandmücke in die Haut des Wirts inokuliert, dort jedoch zügig von M Φ phagozytiert. Die Amastigoten jedoch werden nach ihrer Umwandlung in das die Zellen umgebene Gewebe abgegeben. Ein Peptid, das in beiden Lebensformen exprimiert wird und somit beide Lebensformen gleichermaßen unschädlich machen kann, wäre somit die optimale Wahl für ein Vakzin. Aus diesem Grund wurden die 300 Peptide nicht nur anhand ihres SYFPEITHI-Scores ausgewählt, sondern auch auf Basis ihres jeweiligen Lebensform-abhängigen Vorkommen (Dissertationen Brosch, 2010; Grewe, 2011).

SYFPEITHI: Bindungsaffinität von Peptiden an MHC I-Moleküle

Die Gesamtzahl an Proteinen, die theoretisch durch *L. major* synthetisiert werden können, liegt bei über 8000. Mit dieser großen Anzahl an Proteinen und der damit einhergehenden Vielzahl an immunogenen Epitopen, sollte die Anzahl an potenziell zu analysierenden Peptiden möglichst minimal gehalten werden (Guerfali et al, 2009). Dies kann vor allem mit Hilfe verschiedener Computer-basierter Algorithmen stattfinden. Allerdings gibt es mittlerweile viele verschiedene Vorhersage-Algorithmen, wodurch sich die Möglichkeit der vermehrten falsch-positiven Vorhersagen erhöht (Herrera-Najera et al, 2009). Einer der zu verwendenden Algorithmen ist SYFPEITHI, anhand dessen immunogene Epitope in definierten Proteinen vorhergesagt werden können. Am Ende entsteht dann eine Rangliste, mittels derer die Wahl an zu testender Peptide eingegrenzt werden kann. Um die Anzahl möglicher Vakzinkandidaten dann weiter reduzieren zu können, kann beliebig eine Grenze gewählt werden, so dass, wie in dieser Arbeit, nur Peptide mit einem SYFPEITHI-Score ≥ 25 ausgewählt werden, die es anschließend weiter zu testen gilt. Ob die Wahl der Grenze allerdings gut gewählt ist, ist fraglich. So konnten bei der Suche nach Peptiden, als Immuntherapie gegen die akute myeloide Leukämie (AML), vier Peptide des M-Phase Phosphoproteins 11 (MPP11) mittels SYFPEITHI als immunogene Epitope ermittelt werden. Diese Peptide werden von humanen CD8⁺ T-Zellen erkannt, und schlussendlich konnte ein Peptid mit einem SYFPEITHI-Score von 22 als potenzieller Kandidat identifiziert werden (Qudaihi et al, 2010). Jedoch gibt es neben SYFPEITHI auch noch verschiedene andere Computer-basierte Algorithmen, die vielfach bei der Suche nach immunogenen Epitopen zum Einsatz kommen. So auch BIMAS, das die Möglichkeit berechnet, ob ein Peptid überhaupt an MHC-Moleküle bindet und RANKpep, wie SYFPEITHI, ein Epitop-Vorhersage-Algorithmus. Im Vergleich zu BIMAS sind SYFPEITHI und RANKpep jedoch sensitiver und spezifischer (Wen et al, 2008). Kommen SYFPEITHI und RANKpep gleichzeitig zum Einsatz, so kann es passieren, dass zwar ein hoher RANKpep-Wert (78) von dem Programm ermittelt wird, jedoch nur ein geringer SYFPEITHI-Score (21). Schlussendlich ist dieses Peptid in Restimulationsexperimenten mit PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) jedoch als geeigneter Kandidat identifiziert worden, um als Dengue Virus spezifisches CD8⁺-Epitop zu fungieren

(Wen et al, 2010). So konnten auch *Pelte et al* zeigen, dass die Kombination aus SYFPEITHI und BIMAS am Ende zwar in der Identifizierung eines Peptids resultierte, jedoch stimmten ein hoher SYFPEITHI-Score nicht unbedingt mit einem hohen BIMAS-Wert überein (*Pelte et al*, 2004).

Somit sollte, in Anlehnung an *Trost et al*, die Theorie, dass eine höhere Vorhersage-Wahrscheinlichkeit erst durch die Kombination mehrerer verschiedener Vorhersage-Algorithmen resultiert (*Trost et al*, 2007), weiter verfolgt werden und die 300 hier getesteten Peptide anhand von z.B. RANKpep nochmals analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre es eine „MHC-I Antigenic Peptide Processing Prediction“ (MAPPP) durchzuführen, bei der mehrere verschiedene Computer-basierte Algorithmen gleichzeitig potenzielle Epitope eines Proteins vorhersagen können. Dabei werden die originalen Scores so transformiert, dass schlussendlich Peptide mit einem guten Score bei einem der Algorithmen nicht unbedingt eliminiert werden, nur weil sie woanders einen schlechten Rangplatz bekommen haben (*Pelte et al*, 2004). Damit würde die Chance erhöht werden, am Ende mögliche Vakzinkandidaten zu erkennen, ohne dabei welche zu verlieren, nur weil sie in einer der Ranglisten zuvor durchgefallen wären (*Pelte et al*, 2004). Die Tatsache, dass bei *Qudaihi et al* (*Qudaihi et al*, 2010) und *Pelte et al* (*Pelte et al*, 2004) die identifizierten Peptide einen SYFPEITHI-Score ≤ 25 haben, lässt darauf schließen, dass neben den 300 hier untersuchten Peptiden mit einem SYFPEITHI-Score von ≥ 25 , zusätzlich weitere Peptide mit einem kleineren Score auf ihre Fähigkeit als Vakzin zu fungieren untersucht werden sollten. So hat auch das hier identifizierte Peptid p54 einen SYFPEITHI-Score von 25, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass ein hoher SYFPEITHI-Score nicht unbedingt mit der Immunogenität des Peptids korreliert.

Bindungsstabilität von Peptiden an MHC I-Moleküle

Neben der Computer-basierten Vorhersage geeigneter Peptidkandidaten, ist auch die Analyse der Stabilität der Peptide, wie lange sie an MHC-I Molekülen binden, von Bedeutung. Denn neben der Affinität spielt auch die Stabilität der Peptide (*Harndahl et al*, 2011) eine entscheidende Rolle bei der Generierung einer entsprechenden Immunantwort. Dies kann mit Hilfe des β_2 -Mikroglobulin (β_2m) des MHC-Komplexes geschehen, an das das zu untersuchende Peptid

gegebenenfalls bindet und somit den gesamten Komplex stabilisiert. Dieser Peptid-MHC-Komplex wird dann auf bestimmten Zelllinien exprimiert und kann anschließend mittels FACS-Analyse ausgewertet werden (Elkington et al, 2003). Eine andere - auch in dieser Arbeit verwendete Methode - ist die Verwendung von ¹²⁵I-gelabelten β_2m und der schweren Kette des MHC-I Komplexes (Harndahl et al, 2011). Dabei werden die zu untersuchenden Peptide mit dem radioaktiven β_2m und der schweren Kette des MHC-I Komplexes in eine mit Streptavidin bedeckte Szintillationsplatte pipettiert. Bei 18 °C formen die beteiligten Moleküle einen Komplex, der durch die Bindung des radioaktiven β_2m in einen niedrigeren Energiezustand überführt wird, wodurch es zu einem messbaren Lichtsignal kommt (Harndahl et al, 2011).

Eine Korrelation zwischen dem SYFPEITHI-Score und der Stabilität der Peptide konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden [Abb. 14]. So konnten auch *Wen et al* zeigen, dass die gemessene Stabilität der Peptide nicht mit dem SYFPEITHI-Score korreliert, jedoch aber mit der immunogenen Eigenschaft des Peptids (Wen et al, 2010). Somit sollten die in dieser Arbeit untersuchten 300 Peptide nochmals anhand der Daten des Stabilitätsassays genauer untersucht werden. Da anhand der Korrelation zwischen dem SYFPEITHI-Score und dem Stabilitäts-Assay keine weitere Eingrenzung der Peptide vorgenommen werden konnte, sind alle 300 Peptide einzeln in *in vitro* Experimenten auf ihr spezifisches Zytokinprofil hin untersucht worden. Eine andere Möglichkeit wäre die Untersuchung von Peptid-Pools. So könnten mittels geschickter Auswahl der Peptide für die verschiedenen Pools am Ende mögliche Peptide identifiziert werden (Pelte et al, 2004; Limberis et al, 2009), die *in vitro* zwar ähnliche Zytokinprofile ergeben hätten [Abb. 15], allerdings hätte es den Vorteil gehabt, dass vielleicht Zeit gespart hätte werden können. Dennoch war es interessant, dass die Peptide *in vitro* überwiegend die Sekretion von Th2-Zytokinen [Abb. 15 A bis D] induzierten. CD8⁺ T-Zellen, die durch die Peptide zu einer erhöhten IFN γ Freisetzung angeregt wurden, sekretierten gleichzeitig, wenn auch nur gering, eines der Th2-Zytokine. Dies konnte auch bei der Kreuzanalyse der Zytokine gegeneinander [Abb. 17] gezeigt werden. So sind die meisten der Peptide in der Lage, die Effektorzellen zu einer Th1- oder Th2-Antwort zu stimulieren, nicht jedoch zu einer Freisetzung von Zytokinen beider Typen (Reiner et al, 1993; Sacks et al, 2002).

Der Prime/Boost-Ansatz als Immunisierungsstrategie

Basierend auf den jeweiligen Zytokinprofilen wurden 15 Peptide für die *in vivo* Versuche ausgewählt. In dem zunächst verwendeten Versuchsansatz (P/B) wurden die verschiedenen Peptide in einer Konzentration von 10 µg in Kombination mit CpG eingesetzt, jedoch kam es zu keiner deutlich signifikanten Läsionsreduktion [Abb. 19] oder Verminderung der Parasitenzahlen in den verschiedenen Organen [Abb. 20]. Die Verwendung von 10 µg wurde bereits erfolgreich im Zusammenhang mit verschiedenen Proteinen und Peptiden getestet und führte dabei stets zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Proben und den Kontrollen (Kronenberg et al, 2006; Ramirez et al, 2013), jedoch nicht bei der Verwendung der Peptide wie in dieser Arbeit gezeigt [Abb. 19]. Ebenso konnte in vorangegangenen *in vivo* Versuchen mit dem TAT-LACK Fusionsprotein (Kronenberg et al, 2006) und verschiedenen ribosomalen Proteinen von *L. major* (Ramirez et al, 2013) erst durch die Kombination mit CpG als Adjuvanz das Läsionsvolumen und auch die Anzahl der Parasiten in den verschiedenen Organen signifikant herabgesenkt werden. Auch konnte durch die Verwendung von CpG als Adjuvanz bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die DC durch das CpG stärker aktiviert werden (Jakob et al, 1998) und daraufhin erhöhte Mengen an IL-12 freisetzen. *In vivo* kommt es durch die vermehrte IL-12 Sekretion durch die DC zu einer schnelleren Initiation der Th1-Immunantwort (Chu et al, 1997; Davis et al, 1998). Durch die frühe IL-12 Freisetzung mittels aktivierter und mit CpG stimulierter DC, wird die „stille Phase“ der Infektion verdrängt (Wu et al, 2006) und die T-Zellen werden zeitlich früher geprimt und der Parasit dadurch schneller abgetötet. Der Einsatz von CpG als Adjuvanz ist demnach essentiell für die Wirksamkeit der verschiedenen Proteine und Peptide. Jedoch sollte auch die Verwendung anderer Adjuvanzen in Betracht gezogen werden. So konnten *Gentil et al* bereits zeigen, dass durch die Verwendung von kompletten (CFA) und inkompletten (IFA) Freund's Adjuvanz die Effektivität von Proteinen maßgeblich beeinflusst werden kann, indem die Immunisierung mit *Plasmodium vivax*-spezifischen Proteinen in Kombination mit CFA/IFA zu höheren Antikörpertitern führte im Vergleich zu der Verwendung von CpG mit demselben Protein (Gentil et al, 2010). Von den in dieser Arbeit *in vivo* untersuchten Peptide in Kombination mit CpG als Adjuvanz, waren nur die Peptide p54, p69 und p74 in der Lage, die Mäuse

partiell vor einer Infektion mit *L. major* zu schützen [Abb. 19]. Hier stellt sich nun die Frage, ob die Kriterien der Wahl der Peptide die richtigen waren. Die verschiedenen Peptide wurden anhand der *in vitro* Daten ausgewählt. Allerdings sollte eine *in vivo* Situation nicht mit *in vitro* Umständen verglichen werden. Denn im *in vitro* Versuch befinden sich die verschiedenen Zellpopulationen in unterschiedlichen Stresssituationen, wie Temperaturschwankungen, Pipettieren, veränderter Druck usw. Eine andere Möglichkeit wäre es, geeignete Peptidkandidaten anhand von vorher definierten und getesteten Peptid-Pools zu identifizieren und anschließend *in vivo* auf ihr immunogenes Potenzial hin zu untersuchen (Limberis et al, 2009). Ebenfalls können rekombinante, bereits identifizierte Proteine in Bakterien überexprimiert werden, um dann direkt *in vivo* auf ihre Fähigkeit als Vakzin zu fungieren untersucht zu werden (Ramirez et al, 2013). Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit mit Hilfe von Viren definierte Proteine oder Peptide in den Wirt zu schleusen (Kedzierska et al, 2012) oder aber Fusionsproteine zu entwickeln (Kronenberg et al, 2006), durch die potenzielle Vakzinkandidaten direkt *in vivo* untersucht werden können. Somit ist nicht nur die Wahl der einzelnen Peptide von entscheidender Bedeutung für die Verwendung als mögliche Vakzinkandidaten, sondern auch die Kriterien, anhand derer das entscheidende Peptid ausgewählt werden soll.

Um *in vivo* zu prüfen ob das ausgewählte Peptid auch in der Lage ist die richtige Zellpopulation zu aktivieren und damit die gewünschte Immunantwort zu initiieren, ist die Herstellung von Peptid-spezifischen Tetrameren. Anhand derer die Expansion und Proliferation definierter Zellpopulationen während einer Infektion mit Leishmanien genau verfolgt werden kann (Pagan et al, 2012). Somit könnte dann auch geprüft werden, ob durch die Peptide neben CD8⁺ T-Zellen noch andere Zellpopulationen *in vivo* zur Zytokinfreisetzung angeregt werden können. Denn sollten *in vivo* keine oder nicht genügend CD8⁺ T-Zellen durch die Peptide angesprochen werden, kann es *in vivo* nicht, im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen mit aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen, zu einer vermehrten IFN γ Freisetzung und damit zur Heilung der Leishmaniasis kommen.

Parasitenlasten in Woche 6 nach der Infektion

Um den Einfluss der Peptide auf das Immunsystem genauer zu analysieren, wurde von fünf verschiedenen Peptiden - p7, p38, p54, p69 und p257 - sechs Wochen nach der Infektion eine Parasitenlast angefertigt. Dabei besteht die Möglichkeit, einen Rückschluss auf den Grad der Infektion und eine mögliche Viszeralisierung zu ziehen, um dadurch festzustellen, wie wirksam das entsprechende Peptid tatsächlich ist. So konnten *Ramirez et al* die phänotypischen Merkmale nach der Immunisierung mit Hilfe von reduzierten Parasitenzahlen in den Milzen im Vergleich zu der Kontrolle verifizieren (Ramirez et al, 2013). Auch die Anzahl der Parasiten in den Ohren, dem Ort der Infektion, gibt einen Rückschluss auf die Wirksamkeit der getesteten Substanz, da eine kleine Läsion nicht unbedingt auf eine geringe Parasitenzahl schließen lässt. So konnten *Peters et al* zwar zeigen, dass die Anzahl der Parasiten signifikant geringer war in Mäusen, die mit dem Polyprotein KSAC immunisiert worden waren, allerdings war die Größe der Läsion in allen getesteten Gruppen gleich (Peters et al, 2012). Bei den hier analysierten Peptiden gibt es jedoch keinen Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und den fünf verschiedenen Peptidgruppen in Bezug auf die Anzahl der Parasiten in den Ohren und in der Milz [Abb. 20 A und B]. Obwohl die Peptide p54 und p69 die Läsionen *in vivo* verringerten, die Infektion demnach milder verlief. Damit lieferten diese Ergebnisse einen ersten Hinweis, dass der P/B-Ansatz nicht so gut zu funktionieren scheint, wie vorerst angenommen.

Peptid-Pools zur Verstärkung des Immunisierungseffekts

Da bei C57BL/6 Mäusen, die mit SLA immunisiert wurden, nicht nur die Anzahl an Parasiten in den Ohren und auch in der Milz minimal war [Abb. 20], sondern auch stets die Läsionen verschwindend gering waren [Abb. 19], stellte sich die Frage, ob durch den Einsatz von Proteingemischen die Läsion signifikant verringert werden könnte. So konnte durch die Kombination zweier ribosomaler Proteine von *L. major* das Läsionsvolumen signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert werden (Ramirez et al, 2013). Auch hier war der Erfolg in Kombination mit CpG als Adjuvanz größer (Ramirez et al, 2013). Bei der Verwendung der ursprünglichen Peptidkonzentration von 10 µg je Peptid kam es zu keiner Verbesserung durch den Einsatz der Peptid-Pools [Abb. 21 A]. Daher wurden die

einzelnen Peptide miteinander gemischt und anschließend auf die ursprüngliche Konzentration von 10 µg herunter verdünnt (Ramirez et al, 2013). Doch führte auch die Verdünnung der Peptide auf die ursprünglich eingesetzte Peptidkonzentration von 10 µg zu keiner Verbesserung [Abb. 21 B]. Um das Konkurrenzverhalten der Peptide gegenüber den MHC-Bindungsstellen aufzuheben, können die Peptide einzeln (Adorini et al, 1988) an aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden. Jedoch hatte dies ebenfalls keinen Einfluss auf den Verlauf der Läsionen [Abb. 21 C]. Eine mögliche Ursache für die missglückte Verwendung der verschiedenen Peptidgemische könnte damit begründet sein, dass es sich bei den Peptiden nicht um „die richtigen“ Peptide handelte. So könnte der Effekt, der durch p54 in Form der Läsionsreduktion hervorgerufen wurde, durch die Verwendung eines anderen Peptids aufgehoben werden. Zusätzlich könnte es an der Immunisierungsstrategie liegen, da die Verwendung des P/B/B-Ansatz erfolgversprechender ist im Vergleich zum P/B-Ansatz, und es durch den Gebrauch des P/B/B-Ansatzes womöglich zu einer Läsionsreduktion kommen kann. Doch dies bleibt an dieser Stelle noch zu prüfen.

Immunisierungsversuche mit IL-4^{-/-} Mäusen

Um den Einfluss der *in vitro* untersuchten Peptide auf deren immunmodulierendes Verhalten *in vivo* zu prüfen, wurden Peptide, die in *in vitro* CD8⁺ T-Zellen zu einer vermehrten IL-4 Sekretion anregten, mit Hilfe von IL-4^{-/-} Mäusen genauer untersucht. Dabei handelt es sich um Mäuse, die genetisch auf dem C57BL/6 Hintergrund sind. Allerdings sind bei diesen Mäusen beide Allele des Gens, das für die IL-4 Produktion verantwortlich ist, defekt, so dass diese Mäuse nicht in der Lage sind, von sich aus IL-4 zu sekretieren. Durch fehlende IL-4-Sekretion wird die B- und T-Zell Entwicklung nicht beeinflusst (Kühn et al, 1991), allerdings die Differenzierung der T-Zellen zu Th2-Zellen - da IL-4 hierfür essentiell ist. Zusätzlich wird durch fehlendes oder mangelndes IL-4 während der Infektion die Differenzierung der DC beeinflusst. So kommt es durch Anwesenheit von IL-4 während der frühen Phase der Infektion zu einer erhöhten IL-12 Freisetzung durch die DC und damit zu einer Th1/Tc1 Immunantwort. Im Gegensatz dazu kommt es durch spätere Anwesenheit von IL-4, während dem primen der T-Zellen, zu einer Verlagerung der

Immunantwort von Th1/Tc1 in Richtung Th2 und der progressive Verlauf der Leishmaniasis wird initiiert (Biedermann et al, 2001). Somit ist der progressive Verlauf der Leishmaniasis in BALB/c Mäusen vor allem damit begründet, dass es nicht zu einer Th1/Tc1 Immunantwort im Wirt kommt, sondern zu einer Th2 Immunantwort (Reiner et al, 1995; Sacks et al, 2002). Durch die Applikation von α -IL-4 innerhalb der ersten Woche nach der Infektion kommt es in BALB/c Mäusen zu einer dominierenden Th1/Tc1 Immunantwort begleitet von reduzierten Parasitenzahlen in den verschiedenen Organen und damit zum Ausheilen der Leishmaniasis (Sadick et al, 1990; Chatelain et al, 1992). Die beiden untersuchten Peptide - p54 und p56 - wurden auf ihre Fähigkeit, auch *in vivo* eine Th1/Tc1 (p54) oder Th2 (p56) Immunantwort zu induzieren, in IL-4^{-/-} und den Kontrolltieren (C57BL/6) getestet. Auf die C57BL/6 Tiere hatte die Wahl der beiden Peptide nur einen sehr geringen Einfluss [Abb. 22 A und B]. Die Läsionen der IL-4^{-/-} Mäuse hingegen sahen deutlich anders aus. Das Läsionsvolumen stieg ab Woche 4 nach der Infektion signifikant an und blieb bis zum Ausheilen der Mäuse stets oberhalb der PBS-Kontrolle [Abb. 22 C und D]. Da es sich bei p56, laut den *in vitro* Daten, um ein Th2-induzierendes Zytokin handelt, lag die Annahme nahe, dass dieses Peptid die Sekretion von IL-4 auch *in vivo* induziert. Demnach wurde durch die Anwesenheit des Peptids p56 womöglich IL-4 freigesetzt. Dies allerdings, wie auch in der Grafik zu erkennen, nicht von Beginn an, sodass es erst beim primen der T-Zellen zum Wechsel von Th1/Tc1 zu Th2 kommt und der Verlauf damit schlechter ist als bei der Kontrolle, wie bereits auch von *Biedermann et al* publiziert (Biedermann et al, 2001), was auf die Plastizität der T-Zellen schließen lässt (Jordan et al, 2010). Der Verlauf der Erkrankung in den IL-4^{-/-} Mäuse war damit durch die Immunisierung mit p56 tendenziell gravierender, jedoch nicht tödlich für die Maus, da diese aufgrund ihres genetischen Hintergrunds in der Lage ist, einer Infektion mit *L. major* entgegenzuwirken.

Der Prime/Boost/Boost-Ansatz als Immunisierungsstrategie

Aufgrund der bisher dargestellten Ergebnisse, die zeigen, dass der P/B-Ansatz unter den getesteten Bedingungen nicht gut funktioniert, wurde zusätzlich ein weiteres Model zur Immunisierung verwendet. In dem sogenannten P/B/B-Ansatz wurden C57BL/6 Mäuse mit sechs verschiedenen Peptiden inklusive CpG

als Adjuvanz immunisiert. So konnte bereits bei der Suche nach einem Impfstoff gegen HIV gezeigt werden, dass die verwendete rekombinante Plasmid-DNA und der rekombinante *Vaccinia*-Virus beide allein zwar zum Teil effektiv HIV-spezifische T- und B-Zell Antworten initiieren, dieser Effekt allerdings durch die Verwendung des P/B-Ansatzes deutlich verstärkt werden konnte (Richmond et al, 1997). Durch den Einsatz eines weiteren boosters konnte die Immunantwort noch weiter gesteigert werden (Caver et al, 1999; Lockey et al, 2000). So zeigte sich bereits damals, dass die Verwendung des P/B/B-Ansatzes den Effekt von möglichen Vakzinkandidaten deutlich verbessert. Dieser Effekt ist auch in dieser Dissertation zu sehen. So war das Peptid p54 bereits im P/B-Ansatz in der Lage, die Mäuse partiell vor einer Infektion mit *L. major* zu schützen [Abb. 19]. Dies konnte jedoch durch die Verwendung des P/B/B-Ansatzes signifikant verbessert werden [Abb. 23], indem die Mäuse über den gesamten Zeitraum der Messung von 14 Wochen im Vergleich zu der Negativkontrolle signifikant kleinere Ohrläsionen aufwiesen. Die in [Abb. 23] dargestellte Läsionsreduktion konnte auch anhand des ic FACS [Abb. 24] gezeigt werden. Der prozentuale Anteil an IFN γ sekretierenden CD8⁺ T-Zellen lag deutlich höher, wenn mit p54 immunisierte Mäuse mit demselben Peptid restimuliert wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der P/B-Ansatz generell nicht gut funktioniert, was nicht nur in den verschiedenen Immunisierungsversuchen, sondern auch in den Parasitenlasten sechs Wochen nach der Infektion gezeigt werden konnte. Allerdings konnte der Effekt, der bereits nach der Immunisierung mit p54 im P/B-Ansatz zu erkennen war, mit Hilfe des P/B/B-Ansatzes deutlich verstärkt und zusätzlich im ic FACS bestätigt werden. Bei p54 handelt es sich um ein Peptid, das in beiden Lebensformen von *L. major* gleichermaßen exprimiert wird. Es ist Bestandteil einer Transaldolase, die an allgemeinen Stoffwechselforgängen im Organismus beteiligt ist. Die Tatsache, dass p54 einen SYFPEITHI-Score von 25 hat und die Stabilität der Bindung an MHC I-Moleküle lediglich 0,22 Stunden beträgt, lässt darauf schließen, dass mögliche weitere Peptidkandidaten ebenfalls einen niedrigeren SYFPEITHI-Score haben sollten als die für diese Dissertation ausgewählten Peptide.

Schlussendlich konnte in dieser Arbeit das Peptid p54 als Kandidat für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die murine kutane Leishmaniasis

identifiziert werden und ist damit ein entscheidender Ansatzpunkt bei der Suche und Realisierung eines Impfstoffes für die Entwicklung eines dringend benötigten Vakzins gegen diesen humanpathogenen Parasiten.

6. AUSBLICK

Ziel der Arbeit war die Identifikation einerseits eines weiteren Peptids innerhalb des LACK-Proteins, und andererseits eines oder mehrerer Peptide aus dem Gesamtpool an Proteinen von *L. major*, die als Vakzin gegen die murine kutane Leishmaniasis eingesetzt werden können.

Bei der Suche nach Peptiden innerhalb des LACK-Proteins, die möglicherweise *in vitro* die Freisetzung von IFN γ induzieren, konnte kein Peptid identifiziert werden, jedoch einige Peptide, die vermehrt die Sekretion von Th2-Zytokinen induzierten, so auch das bekannte CD4-LACK-Peptid. Um nun *in vivo* einen Schutz gegenüber einer Infektion mit *L. major* zu ermöglichen, können die getesteten Peptide in Kombination mit einem Adjuvanz, wie CpG oder IL-12, in C57BL/6 und BALB/c Mäusen untersucht werden. Zusätzlich können die Peptide der LACK-Bibliothek in *in vitro* Versuchen mit Zellen aus BALB/c Mäusen getestet werden, um zu sehen, ob das Zytokinprofil der einzelnen Peptide dann anders aussieht im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen.

Bei der Analyse der 300 Peptide aus dem Gesamtpool an Peptiden von *L. major*, war aufgrund fehlender Korrelation zwischen dem SYFPEITHI-Score und der Stabilität der Peptide gegenüber MHC-Molekülen kein Muster erkennbar, so dass die Peptide mittels z.B. RANKpep nochmals analysiert werden sollten, um zukünftig frühzeitiger geeignete Peptide zu identifizieren. Zusätzlich sollten alle Proteine nach der massenspektrometrischen Untersuchung nochmals zusätzlich z. B. mittels RANKpep auf ihre immundominanten Epitope analysiert werden, um zu schauen, ob nicht entscheidende Epitope „übersehen“ worden sind. Zukünftig könnte dieses Problem mit Hilfe des MAPPP umgangen werden, da dieses Programm in der Lage ist, mehrere verschiedene Vorhersage-Algorithmen gleichzeitig zu verwenden und somit effektiver potenzielle Vakzinkandidaten ermittelt werden können, die bei Verwendung nur eines Algorithmus eventuell verloren gingen. Die Immunisierungsstrategie sollte auch zukünftig der P/B/B-Ansatz sein, wenn Peptide als Vakzin eingesetzt werden. Allerdings bleibt die Frage, ob durch die Verwendung anderer als der hier getesteten Peptid-Pools die Läsion schlussendlich weiter reduziert werden könnte, da auch SLA, als „optimales Vakzin“, neben anderen Bestandteilen des

Organismus aus allen Proteinen und Peptiden, die der Parasit exprimiert, besteht. Ebenso wäre es interessant, andere Peptide, die einen ähnlichen SYFPEITHI-Score und zusätzlich eine ähnliche Bindungsstabilität wie p54 aufweisen, zu testen. Während der Auswahl für die 300 Peptide wurde ein Cut-off bei 25 gesetzt, was den SYFPEITHI-Score angeht. Das Peptid p54 hat einen SYFPEITHI-Score von 25. Daher stellt sich die Frage, ob nicht ein hoher SYFPEITHI-Score, sondern eher ein mittlerer Score entscheidend ist für die Generierung einer adäquaten Immunantwort. Daher sollten weitere Peptide genauer untersucht werden, die einen SYFPEITHI-Score ≤ 25 aufweisen. Ebenso könnten weitere Immunisierungsschritte den reduzierten Läsionsverlauf bei p54 womöglich weiter senken, oder die Verwendung eines anderen Adjuvanz. Dies müsste allerdings in weiteren Versuchen genauer analysiert werden. Desweiteren kann mithilfe der Tetramer-Technologie die spezifische T-Zell Antwort *in vivo* genauer analysiert und verfolgt werden und somit weitere potenzielle Peptide die zu einer Th1/Tc1-Immunantwort beitragen identifiziert werden.

Das Peptid p54 ist Bestandteil des Proteins Transaldolase, das an regulären Stoffwechselfvorgängen beteiligt ist. Dies könnte ein Hinweis sein, das p54 nicht nur in *L. major* vorkommt, sondern womöglich auch noch in anderen Leishmanien-Spezies. Das hätte den Vorteil, dass p54 als beteiligter Impfstoff gegebenenfalls auch gegen eine andere Leishmanien-Spezies wirken könnte, und sollte diesbezüglich überprüft werden. Somit kann schlussendlich die Suche nach einem lang benötigtem Vakzin gegen die murine kutane Leishmaniasis und damit auch für den Menschen weiter vorangetrieben werden.

7. MATERIAL

7.1 PARASITEN

Stamm	Klon
<i>Leishmania major</i>	VI (MHOM/IL/80/Friedlin)

7.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bottle-Top Filter, 0,2 µm	Biochrome, Berlin
Dispenser Tips, 0,5 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Dispenser Tips, 12,5 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Dispenser Tips, 25 mL	VWR/Merck, Darmstadt
Finntips 300, 5-300 µL	Thermo Lab, VWR Darmstadt
Handschuhe, Sempermed S	Apotheke, Universitätsmedizin
Kryoröhrchen, 1,8 mL	Sarstedt, Nürnberg
Leukosilk Gewebepflaster	Apotheke, Universitätsmedizin
MaxiSorp, Nunc-Immuno Platten, 96-well	Nunc, Brand, Wertheim
Microlance 3, Kanüle, 23G 1 1/4 - Nr. 4	BD Pharmingen, Heidelberg
Microlance 3, Kanüle, 26G 1/2	BD Pharmingen, Heidelberg
MiniMACS Separationssäulen, MS, 500 µL	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic, Chicago, (USA)
Petrischalen groß	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen klein	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen D200, Diamond, 2-200 µL	Gilson, Villiers de Bel, Frankreich
Pipettenspitzen, 0,1-10 µL	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, 10-200 µL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 200-1000 µL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Polystyrene Reaktionsgefäße, Rundboden, 5 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Reaktionsgefäße, 0,5 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, 2,0 mL	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße, Protein low-bind tubes, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipette, 10 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipette, 25 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritze Discardit II, 5 mL	BD Pharmingen, Heidelberg

Spritze Discardit II, 10 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Spritze Discardit II, 20 mL	BD Pharmingen, Heidelberg
Spritze Injekt, 2 mL	B. Braun, Melsungen
Spritze Injekt-F Tuberkulin, 0,01-1 mL	B. Braun, Melsungen
Spritze Omnican F 30G, 0,01-1 mL	B. Braun, Melsungen
Ständer für Reaktionsgefäße	VWR/Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen plus Filter, 75 cm ²	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen ohne Filter, 25 cm ²	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 24-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 6-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 96-well, Flachboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, 96-well, Rundboden	BD Pharmingen, Heidelberg
Zellkulturplatte, 96-well, Rundboden	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zellsiebe, 70 µm Filter	BD Pharmingen, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Greiner, Bio-One, Frickenhausen

7.3 GERÄTE

Geräte	Hersteller
Bestrahlungsgerät RT 100; Quelle Röntgenstrahlen	Müller
CO ₂ -Inkubator	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Pharmingen, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR II	BD Pharmingen, Heidelberg
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Handdispenser, Handy Step	VWR/Merck, Darmstadt
Magnetrührer IKA RCT classic	VWR/Merck, Darmstadt
Mehrkanalpipette, Biohit, 30-300 µL	Sartorius, Göttingen
Mehrkanalpipette, Biohit, 5-100 µL	Sartorius, Göttingen
Microplate Reader ELx808	BioTEK Instruments, Bad Friedrichshall
Mikroskop Dialux	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Neubauerzählkammer	VWR/Merck, Darmstadt
Pellet-Pestle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pH211 Mikroprozessor-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schweiz
Schieblehre, digital, 150 mm	Rheinwerkzeuge, Mainz
Sterilbank HeraSafe	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold

Varioklav, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen
Waage MC1 LC2200P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad TW2	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Fresco 17, Heraeus	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zentrifuge Multifuge 3 L-R, Heraeus	Thermo, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zytospinzentrifuge Cellspin II	Tharma, Waldsolms

7.4 REAGENZIEN

Reagenz	Hersteller
ACK-Lyse Puffer	BioWhittaker/Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Adenin (10mM)	Carl Roth, Karlsruhe
Alkopharm 70 (70 % Ethanol)	Brüggemann Alkohol, Heilbronn
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BCA Reagent A+B, Pierce	Thermo Scientific, Dreieich
Brefeldin A; (Endkonzentration 1 ng/mL)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
BSA (Bovine-Serum-Albumin)	Carl Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine-Serum-Albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-(+)Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Diff-Quick	Dade-Behring, Düdingen, Schweiz
Dimethyl-Suloxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Clean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Flow Sheath Fluid	BD Pharmingen, Heidelberg
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FixPerm-Kit	eBioscience Inc, San Diego (USA)
Helipur H plus N	Braun, Melsungen
Hemin (Chlorid) 98%	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES, Pufferan 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
ic-Fixierungspuffer	eBioscience Inc, San Diego (USA)
Ionomycin, Kalzium Salz; (Endkonz. 500 ng/mL)	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (Endkonz. 100 ng/mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
M199 Medium (10x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M199 Medium (1x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid; NaN_3	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat; Na_2CO_3	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid; NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat; NaHCO_3	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenosphat; Na_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
CpG, Oligodesoxynukleotide ODN1826 (Endkonz. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Permeabilisierungspuffer	eBioscience Inc., San Diego (USA)
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA); (Endkonz. 50 ng/mL)	LC Laboratories, Woburn, (USA)
rekombinantes murines GM-CSF (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in PBS)	PeptoTech, Offenbach
rekombinantes murines IL-4 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in PBS)	PeptoTech, Offenbach
RPMI 1640	Biochrome, Berlin
Salzsäure	VWR/Merck, Darmstadt
Schneiders Drosophila Medium	BioWhittaker/Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stopp-Lösung: 1 M H_3PO_4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat-Lösung	eBioscience Inc, San Diego (USA)
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol, 50 mM	Carl Roth, Karlsruhe

7.5 ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER

Puffer	Zusammensetzung
RPMI complete	RPMI 1640
	1 % Penicillin/Streptomycin
	1 % Glutamin
	1 % HEPES (1 M)
	1 % Nicht-essentielle Aminosäuren
	0,1 % β -Mercaptoethanol, 50 mM
10x PBS [pH 6,6]	5 % FCS
	1L Aqua dest.
	1,38 M NaCl
1x PBS [pH 7,2-7,3]	0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4+2\text{H}_2\text{O}$
	1:10 Verdünnung des 10x PBS mit Aqua dest.
MACS-Puffer	1x PBS
	2 % FCS
	2 mM EDTA-Lösung
FACS-Puffer	1x PBS
	2 % FCS
	50 μL NaN_3 (10%ige Lösung)
Waschpuffer für ELISA	1x PBS
	0,1 % Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate)
Blockpuffer für $\text{IFN}\gamma$ ELISA	1x PBS
	1 % BSA
	0,05 % NaN_3
Assay-Puffer für $\text{IFN}\gamma$ ELISA	1x PBS
	0,1 % BSA
	0,05 % Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan Monolaurate)
Assay-Puffer für IL-17A ELISA	1x PBS
	1 % BSA
Assay-Puffer IL-4 und IL-10 ELISA	1x PBS
	10 % FCS
Ficoll	20 % Ficoll in Aqua dest.
Stopp-Lösung	1 M H_3PO_4
Schneiders Medium	Schneiders Drosophila Med. (mod.) W L-Glutamin
	2 % Humanurin
	10 % FCS
	2 % Glutamin
	1 % Penicillin/Streptomycin
	0,5 % HEPES (1 M)

Leishmanien Medium	M199 (1x) 350 mL
	M199 (10x) 14,25 mL
	FCS 100 mL
	HEPES (1 M) 20 mL
	Adenin (10 mM) 5 mL
	Hemin (0,25%) 1 mL
	Penicillin/Streptomycin 5 mL
	Glutamin 5 mL
Adenin	10 mM Adenin
	5 % HEPES (1 M)
	In Aqua dest.
Hemin	50 % Triethanolamin
	0,25 % Hemin
	In Aqua dest.
	0,1 % Collagenase A
	DMEM

7.6 MACS-ANTIKÖRPER

Antikörper	Name, Sitz der Firma
α -CD4 (α -mouse L3T4) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
α -CD8 (α -mouse Ly-2) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

7.7 FACS-ANTIKÖRPER

Fluorochrome	Antikörper	Name, Sitz der Firma
	CD16/32 (α -Maus, Klon: 93)	eBioscience Inc. San Diego (USA)
FITC	CD3a (α -Maus CD3e ϵ -Kette, Klon: 145-2C11)	BD Pharmingen, Heidelberg
	MHC-I (α -Maus H-2D ^b , Klon: 2G5)	Serotec, München
	MHC-II (α -Maus I-A/I-E, Klon: 2G9)	BD Pharmingen, Heidelberg
	CD86 (α -Maus B.7-2, Klon: GL1)	BD Pharmingen, Heidelberg
	$\gamma\delta$ -TCR (α -Maus, Klon: UC7-13D5)	Biologend, über Biozol, Eching
	<i>Isotyp</i> : Ratten IgG2a, κ (α -Maus Klon: R35-95)	BD Pharmingen, Heidelberg
	<i>Isotyp</i> : Hamster IgG, Gr. 1, κ , λ , α -TNP (α -Maus, Klon: A19-3)	BD Pharmingen, Heidelberg

	<i>Isotyp:</i> Arm. Hamster IgG (α -Maus, Klon: HTK888)	Biolegend, über Biozol, Eching
PE	CD4 (α -Maus L3T4, Klon: RM4-5)	BD Pharmingen, Heidelberg
	CD8a (α -Maus Ly-2, Klon: 53-6.7)	BD Pharmingen, Heidelberg
	CD11c (α -Maus, Klon N418)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	IFN γ (α -Maus, Klon: XMG1.2)	BD Pharmingen, Heidelberg
	IL-4 (α -Maus, Klon: 11B11)	BD Pharmingen, Heidelberg
	<i>Isotyp:</i> Ratten IgG2a, κ (α -Maus, Klon: R35-95)	BD Pharmingen, Heidelberg
	<i>Isotyp:</i> Hamster IgG, Gr.1, κ , λ α -TNP (α -Maus Klon: G235-2356)	BD Pharmingen, Heidelberg
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG1 (α -Maus Klon: eBRG1)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Arm. Hamster IgG (α -Maus Klon: eBio299Arm)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
APC	IL-10 (α -Maus, Klon: JES5-16E3)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	IL-17A (α -Maus, Klon: eBio 17B7)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG2a (α -Maus Klon: eB149/10H5)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG2b (α -Maus Klon: eBR2a)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
eFluor 450	CD3 (α -Maus, Klon: eBio 500A2)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG2a (α -Maus, Klon: eB149/10H5)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
APC-eFluor 780	CD4 (α -Maus, Klon: RM4-5)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG2a (α -Maus, Klon: RTK4530)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
PECy7	CD8a (α -Maus, Klon: 53-6.7)	eBioscience Inc., San Diego (USA)
	<i>Isotyp:</i> Ratte IgG2a (α -Maus, Klon: eBR2a)	eBioscience Inc., San Diego (USA)

7.8 ELISA-KITS

ELISA-Kit	Hersteller
Maus IFN γ ELISA Kit, DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Maus OptEIA Set Mouse IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus OptEIA Set Mouse IL-10	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IL-17A ELISA Kit, DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden

8. METHODEN

Sämtliche Tiere wurden gemäß den geltenden Tierschutzgesetzen gehalten. Alle Tierversuche fanden in der Einrichtung der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter *specific pathogen free* (SPF) Bedingungen statt. Mittels Genickbruch wurden die Tiere am Versuchsende getötet. Für die Infektion der Mäuse mit *L. major* und bei dem Messen der Läsionsvolumina wurden die Tiere wenige Sekunden dem Inhalationsgas Isofluran ausgesetzt. Anschließend wurden die Tiere bis zum vollständigen Aufwachen überwacht.

8.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

8.1.1 ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON DCS

Naive C57BL/6 Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet. Unter einer Sterilbank wurde das Fell oberhalb der Hüftgelenke mit einer in Ethanol getauchten Schere aufgeschnitten. Anschließend wurden die Hüftgelenke mit Hilfe eines sterilen Skalpells oberhalb der Gelenkpfanne durchtrennt. Das Beinfell wurde entfernt und ebenso ein Teil der Beinmuskulatur. Durch Überstrecken von Femur und Tibia konnte der Oberschenkel aus dem Muskel isoliert werden. Die Sehnen am Fuß wurden mit dem Skalpell durchtrennt. Das Wadenbein wurde während des Abziehens des Muskelgewebes gebrochen. Der Fuß wurde am Sprunggelenk von der frei-präparierten Tibia abgeschnitten. Die Tibia und der Femur wurden nach der Präparation kurz in Ethanol getaucht und dann in steriles PBS überführt.

Die Epiphysen wurden knapp abgetrennt und die Knochen in eine mit 1x PBS und RPMI complete (Verhältnis 1:1) bedeckte große Petrischale gegeben. Die Lösung wurde mittels einer Spritze aufgezogen. Dann wurden die Knochen so lange mit der Lösung gespült, bis kein Knochenmark mehr enthalten war. Die Zellsuspension wurde in der Petrischale mit einer 10 mL Pipette resuspendiert und anschließend über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Die Petrischale wurde noch ein- bis zweimal mit Medium gespült und das

Falconröhrchen damit auf 50 mL aufgefüllt. Die Suspension wurde 8 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL ACK-Lösung für ca. 1 min resuspendiert, wodurch die Erythrozyten in der Zellsuspension lysiert wurden. Die Reaktion wurde mit 10 mL 1x PBS abgestoppt und die Suspension erneut für 8 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Medium aufgenommen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Pro Zellkulturflasche wurden 40×10^6 Zellen in 20 mL Medium eingesät. Das Medium wurde zusätzlich mit 1 µL/mL rekombinantes murines IL-4 und GM-CSF versetzt. Nach zwei Tagen wurde das Medium vollständig gewechselt. Die DC waren nun adhärent, daher wurde die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt, um nicht adhärente Zellen vom Boden abzulösen. Das Medium wurde vorsichtig und vollständig abgenommen und durch 15 mL neues Medium, inklusive der Zytokine IL-4 und GM-CSF, ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen waren die DC nicht mehr adhärent und es wurden nur 5 mL frisches Medium, inklusive der Zytokine IL-4 und GM-CSF, in die Zellkulturflasche gegeben. Am Tag 6 nach der Isolation der Zellen wurden die Zellkulturflaschen vorsichtig geschwenkt, um noch adhärente DC zu lösen. Die Suspension wurde vollständig abgenommen und 8 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL RPMI complete resuspendiert und anschließend ausgezählt. Pro well einer 24 well Platte wurden 2×10^5 DC eingesät und mit LPS (Lipopolysaccharid; Stock 10 µg/mL) für 18 h bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert.

8.1.2 ISOLATION DER LYMPHKNOTEN VON C57BL/6 MÄUSEN

Mit Promastigoten infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet. Unter einer Sterilbank wurde die Haut am Kiefer mit der Schere aufgetrennt. Mit Hilfe der Uhrmacherpinzette wurde das Gewebe links und rechts vom Kiefer wegpräpariert. Sobald die submandibulären drainierenden Lymphknoten freilagen, wurden sie mit der Pinzette herausgenommen und in steriles 1x PBS überführt.

Die isolierten Lymphknoten wurden mit dem 1x PBS in eine kleine Petrischale überführt und mit einem 5 mL Spritzenstempel zerkleinert. Über ein 70 µm Sieb wurde die Suspension in ein 15 mL Falconröhrchen überführt. Die

Petrischale wurde mit 3 mL RPMI complete gespült und ebenfalls über das Sieb in das Falcon gegeben. Bei 200 g und 4 °C wurde die Suspension für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Medium aufgenommen und die Zellen ausgezählt.

8.1.3 ISOLIERTE ZELLEN ZÄHLEN

Um Zellen in einem bestimmten Verhältnis zueinander oder einer definierten Anzahl einsetzen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mittels Trypanblau wurden die Zellen zunächst angefärbt. Dieser Farbstoff ist nicht in der Lage, durch die intakte Zellmembran der Zellen zu dringen und färbt somit nur tote Zellen blau. Farblos schimmernde Zellen leben und können daher gezählt werden.

Je nach zu erwartender Zellzahl wurden die Zellen entweder in einem 1:10 oder einer 1:100 Verdünnung gezählt. Die gezählte Anzahl der Zellen, der Verdünnungsfaktor und der Kammerfaktor spielen bei der Ermittlung der exakten Zellzahl eine entscheidende Rolle.

Formel zur Bestimmung der Zellzahl:

$$x \text{ [gezählte Zellen]} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10^4 \text{ [Kammerfaktor]} = \text{Zellen/mL}$$

8.1.4 KOKULTUR AUS PEPTIDBELADENEN DC UND GEPRIMTEN CD4⁺ UND CD8⁺ T-ZELLEN

Nachdem die DC für 18 h mit LPS stimuliert worden waren, wurden die Zellen mit 55 kV bei 40 Gy für 4 min bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in Falcons überführt und für 8 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert und ausgezählt. 10⁵ Zellen wurden in ein well einer 96 well Platte pipettiert. Gleichzeitig wurden die jeweiligen Peptide in einer Endkonzentration von 10⁻⁶ mol zu den DC gegeben. Die geprimten isolierten (8.1.2) und mittels MACS (8.2.2) aufgereinigten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden ebenfalls zu den peptidbeladenen DC pipettiert, sodass am Ende ein Gesamtvolumen von 200 µL/well vorlag. Die so entstandene Kokultur wurde dann für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der 2 Tage wurden 180 µL der jeweiligen

Überstände abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Der Rest wurde verworfen.

8.1.5 ISOLATION UND AUFREINIGUNG VON AMASTIGOTEN

BALB/c Mäuse sind etwa 4-6 Wochen vor Isolierung der Amastigoten mit 2×10^5 metazyklischen Leishmanien (*L. major*) in die Sohlen der Hinterpfoten infiziert worden. Für die Isolierung der Amastigoten wurde die Maus mittels Genickbruch getötet. Die Läsionen an den Hinterfüßen wurden mit einer Schere abgeschnitten und in den vorbereiteten sterilen PBS/Glukose/EDTA-Puffer überführt.

In einer kleinen Petrischale wurde das weiche Gewebe mit den Amastigoten von der festen Fußsohle entfernt. Dabei werden gleichzeitig Nekrosen entfernt. Das nicht nekrotische Gewebe wurde mit einer gebogenen Schere zu Brei zerkleinert und in einen „Tissuegrinder“ gegeben. Petrischale und Schere wurden nochmals mit 1x PBS gespült und die Lösung ebenfalls in den „Tissuegrinder“ gegeben. Dieser wurde zu $\frac{3}{4}$ mit 1x PBS aufgefüllt. Mehrere Minuten wurden die Zellen vorsichtig und sorgfältig mit dem „Tissuegrinder“ zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falconröhrchen gegeben. Der „Tissuegrinder“ wurde mit 1x PBS gespült und die Lösung wurde ebenfalls über das Sieb in das Falcon gegeben. Die Suspension wurde zweimal 8 min bei 200 g zentrifugiert. Die Amastigoten befanden sich jeweils im Überstand. Anschließend wurde der Überstand nochmals abgenommen und 8 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Amastigoten befanden sich im Pellet, welches in 1 mL RPMI complete aufgenommen wurde.

Anschließend wurden die Amastigoten in einer 1:100 Verdünnung ausgezählt. Die isolierten Amastigoten konnten anschließend unter anderem für eine neue Kultur von Promastigoten verwendet werden.

8.1.6 KULTIVIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROMASTIGOTEN

Die Promastigoten wurden in einer Flüssigkultur gehalten. Alle 2-3 Tage wurde die bestehende Kultur 1:10 geteilt und die Parasiten mit frischem Medium gefüttert.

Um die metazyklischen Promastigoten aus der Kultur zu isolieren, wurden 20 mL Zellsuspension mit dem gleichen Volumen DMEM gemischt und für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Im Überstand waren anschließend die Leishmanien enthalten und dieser wurde erneut bei 200 g für 8 min zentrifugiert. Um die Leishmanien zu pelletieren, wurde die Suspension anschließend bei 3000 g für 8 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 mL DMEM resuspendiert. Gleichzeitig wurde in ein 15 mL Falcon 2 mL der 20 %igen Ficoll-Lösung gegeben und darüber 2 mL der 10 %igen Ficoll-Lösung geschichtet. Anschließend wurde darüber das Parasitenkonzentrat geschichtet. Der Gradient wurde für 15 min bei 2000 g ohne Bremse zentrifugiert. Die obere Schicht und $\frac{2}{3}$ der zweiten Phase wurden abgenommen, mit 5-10 mL DMEM versetzt und erneut für 8 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL DMEM resuspendiert und die Parasiten in einer 1:10 oder 1:100 Verdünnung mit 4 % Paraformaldehyd ausgezählt. Durch das Paraformaldehyd wurden die Leishmanien abgetötet und ein Kleben der Parasiten an der Zählkammer verhindert. Unter dem Lichtmikroskop wurden nur die langen und schlanken Promastigoten ausgezählt. Anschließend wurden die Promastigoten so mit DMEM eingestellt, dass für die *low* dose Infektion 10^3 metazyklische Leishmanien/10 μ L vorhanden sind.

8.1.7 HERSTELLUNG VON SOLUBLE LEISHMANIA ANTIGEN (SLA)

SLA ist ein komplexes Gemisch bestehend aus degradierten Leishmanien-Antigenen. Neben *in vitro* Experimenten, bei denen geprimte T-Zellen mit SLA restimuliert wurden, wurde SLA auch in *in vivo* Experimenten als Positivkontrolle eingesetzt. Um das Lysat herzustellen, wurden Promastigoten direkt aus der Kultur verwendet. Die Leishmanien wurden zunächst zweimal bei 200 g für 8 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Promastigoten durch Zentrifugation bei 3000 g pelletiert. Die Parasiten wurden im Anschluss daran

auf 300×10^6 metazyklische Leishmanien pro mL RPMI-complete eingestellt und danach durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wie folgt degradiert:

1. Parasiten in flüssigem Stickstoff einfrieren
2. Anschließend bei $56\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad auftauen
3. Zum Schluss 1 min bei maximaler Leistung vortexen

Dieser Zyklus wurde mindestens 10 mal wiederholt. Die Immunogenität des SLA wurde in Restimulationsexperimenten anhand der sezernierten Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 bestimmt. Für Immunisierungsexperimente wurde die Menge an Protein im SLA mittels BCA (8.2.1) bestimmt.

8.1.8 INTRADERMALE INFEKTION VON C57BL/6 MÄUSEN

Für *in vitro* Versuche, aber auch bei den Immunisierungs-Experimenten wurden C57BL/6 Mäuse intradermal mit entweder 10^3 (Niedrigdosis) oder 2×10^5 (Hochdosis) metazyklischen Promastigoten in die Ohren infiziert. Dafür wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt und anschließend wurden die Ohren der Mäuse mit Leukosilk auf einem Zwangsröhrchen fixiert. Die Promastigoten wurden dann mittels Einwegspritze (Omnican F 0,01-1 mL) in die Dermis der Ohren injiziert.

8.1.9 SUBKUTANE INFEKTION VON BALB/C MÄUSEN

Um eine Kultur von Promastigoten unter Laborbedingungen halten zu können, ist es wichtig, die Kultur in regelmäßigen Abständen zu erneuern. Dafür müssen sich die Promastigoten in die amastigote Lebensform umwandeln. Damit der Parasit diesen Wandel vollziehen kann, wurden 2×10^5 metazyklische Promastigote subkutan in die Hinterpfoten von BALB/c Mäusen injiziert. In der Haut kommt es dann zur Umwandlung in die amastigote Lebensform, die nach 4-6 Wochen aus dem Hautgewebe isoliert wurde.

8.1.10 IMMUNISIERUNG VON C57BL/6 MÄUSEN

Die Peptide wurden in 35 %-igem Acetonitril gelöst, um eine Endkonzentration von 10^{-3} mol zu erhalten. Die Aliquots wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zu Versuchsbeginn des prime/boost (P/B)-Ansatzes wurden die Peptide soweit mit PBS verdünnt, dass pro Maus und Ohr zunächst $10\ \mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$ des Peptids, in Kombination mit dem Adjuvanz CpG ($10\ \mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$), appliziert wurden. Eine Woche später wurden die Peptide erneut mit PBS verdünnt, und pro Maus erneut dieselbe Konzentration der Peptide in Kombination mit CpG pro Ohr appliziert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse jeweils in das andere Ohr mit 10^3 aufgereinigten metazyklischen Leishmanien (8.1.6 und 8.1.8) infiziert.

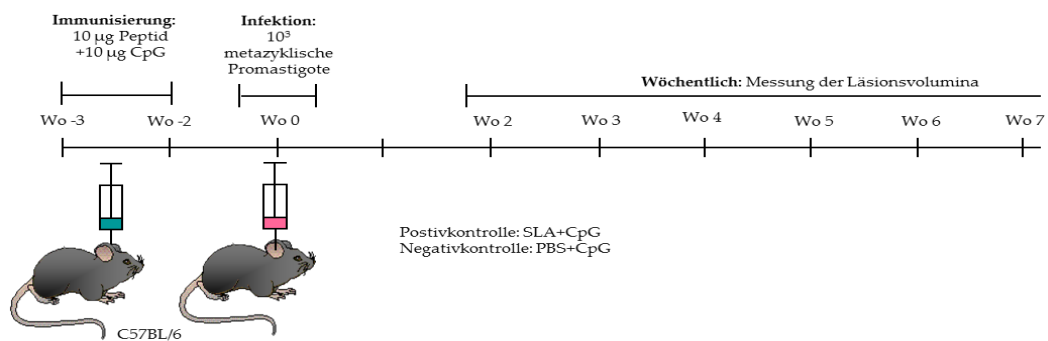


Abbildung 26: Prime/boost Immunisierungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden zweimal mit jeweils $10\ \mu\text{g}$ Peptid inklusive CpG als Adjuvanz in einem zweiwöchigen Abstand intradermal in die Ohren immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden dieselben Mäuse mit 10^3 metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert. Der Verlauf der Granulombildung am Ort der Infektion wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Wochen gemessen. Als Positivkontrolle diente SLA und als Negativkontrolle PBS - jeweils mit CpG als Adjuvanz.

Bei der Verwendung des prime/boost/boost (P/B/B)-Ansatz wurden die Mäuse zunächst mit $20\ \mu\text{g}/30\ \mu\text{L}$ des Peptids immunisiert, gefolgt von zwei weiteren Immunisierungsschritten mit jeweils $10\ \mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$ des Peptids - jedes Mal in Kombination mit CpG ($10\ \mu\text{g}/20\ \mu\text{L}$) als Adjuvanz.

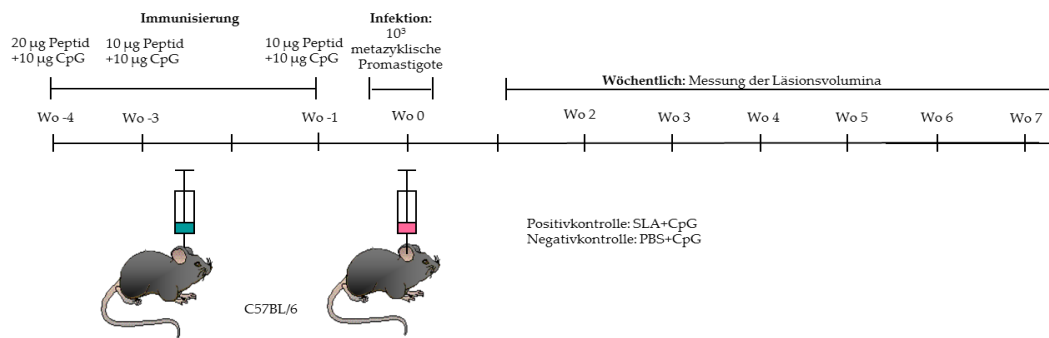


Abbildung 27: Prime/boost/boost Immunisierungsschema. C57BL/6 Mäuse wurden zunächst mit 20 µg des Peptids inklusive CpG als Adjuvanz intradermal in die Ohren immunisiert. Anschließend folgten zwei weitere Immunisierungsschritte mit jeweils 10 µg Peptid inklusive CpG als Adjuvanz. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden dieselben Mäuse mit 10³ metazyklischen Promastigoten in das andere Ohr infiziert. Der Verlauf der Granulombildung am Ort der Infektion wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Wochen gemessen. Als Positivkontrolle diente SLA und als Negativkontrolle PBS - jeweils mit CpG als Adjuvanz.

Für die *in vivo* Experimente wurden ausschließlich C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden zum Injizieren der Peptide und auch zum Infizieren mit den Leishmanien kurzzeitig mit Isofluran narkotisiert und in einem Zwangsröhrchen fixiert. Das jeweilige Ohr wurde mit Hilfe von Leukosilk auf dem Röhrchen festgeklebt. Die Peptide und auch die Leishmanien wurden dann mit Hilfe einer Einwegspritze (Omnican F 0,01-1 mL) intradermal in das Ohr der Mäuse injiziert.

8.1.11 BERECHNUNG DER LÄSIONSVOLUMINA

Um die Schwere der Leishmaniasis quantitativ bestimmen zu können, wurde - mittels Uhrenmessschieber - wöchentlich die Länge, Breite und Dicke des Granuloms am Ohr gemessen. Die sich daraus ergebenden Werte konnten dann mit Hilfe der unten stehenden Formel für Ellipsoide als dreidimensionaler Wert in einer Grafik abgebildet werden.

Formel zur Berechnung der Läsionsvolumina:

$$\text{Volumen [mm}^3\text{]} = (\text{Dicke}/2) \cdot (\text{Breite}/2) \cdot (\text{Länge}/2) \cdot (4/3) \cdot \pi$$

8.1.12 BESTIMMUNG DER PARASITENZAHL IN DEN OHREN UND IN DER MILZ

Als Maß wie gut eine Leishmanien-Infektion unter Kontrolle gebracht werden kann, wurde die Anzahl der Parasiten zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion in den Ohren und der Milz bestimmt.

Dabei wurde, nach dem Töten der Tiere, das infizierte Ohr geerntet, geteilt und die obere und die untere Hälfte der Ohren wurde mit der Dermis nach unten in das Kollagenase-Medium gelegt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die enzymatisch angedauten Ohren wurden zuerst mit Hilfe einer Schere grob und anschließend für 1 min mit dem Pellet-Pestler weiter mechanisch zerkleinert. Das dadurch aufgeschlossene Gewebe wurde über ein 70 µm Sieb in ein Falcon gegeben und mit PBS gewaschen, um so die Leishmanien aus dem Gewebe zu spülen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 g für 8 min, bei dem die Leishmanien pelletiert wurden. Das entstandene Pellet wurde mit 1 mL Schneiders Medium resuspendiert. Die freigesetzten Parasiten wurden dann in einer Verdünnungsreihe austritiert (Lima et al, 1997). Anschließend wurden die Platten mit Hilfe von Parafilm luftdicht verschlossen und bei 27 °C für 6-9 Tage inkubiert. Durch die Medienzusammensetzung und die für die Parasiten optimalen Temperaturbedingungen wandelten sich die Amastigoten größtenteils in die promastigote Lebensform um. Nach Ablauf der Inkubation konnte an einem Lichtmikroskop die letzte lebende Leishmanie gesucht werden, anhand derer ein Rückschluss auf die eigentliche Anzahl an Parasiten im Ohr erfolgen kann.

Die Milz wurde zum selben Zeitpunkt wie die infizierten Ohren geerntet. Mithilfe eines Spritzenstempels wurde die Milz zerkleinert und die Zellen inklusive der Parasiten wurden mittels eines 70 µm Siebes von den restlichen Milzbestandteilen getrennt. Die Suspension wurde für 8 min bei 200 g zentrifugiert, und anschließend wurde das Pellet mit 2,5 mL PBS resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden anschließend 500 µL in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels eines Pellet-Pestler wurden die Zellen innerhalb 1 min aufgeschlossen: die Leishmanien lagen nun frei in der Lösung vor. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 5.6 U^{-min} für 10 min wurden die Leishmanien pelletiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und

das Zellpellet mit 100 µL Schneiders Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Verdünnungsreihe austritiert und der weitere Ablauf erfolgte analog zu dem der Ohren.

8.2 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

8.2.1 BCA ASSAY

Um die exakte Proteinmenge des SLA-Gemisches zu kennen und dann eine definierte Menge Protein als Positivkontrolle bei den Immunisierungsexperimenten einsetzen zu können, wurde mit Hilfe des BCA (*bicinchoninic acid*)-Assay die Proteinmenge des SLA bestimmt. Bei der Bicinchoninic-Säure handelt es sich um einen stabilen, wasserlöslichen Stoff, der in alkalischer Umgebung mit Kupfer-Ionen (Cu^+) einen lilafarbenen Komplex bildet. Um diesen Farbumschlag nun für die Proteinbestimmung auszunutzen, wurde im BCA-Assay die Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung von Cu^+ kombiniert. Die Methode beruht auf der proteinvermittelten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in alkalischer Lösung (Smith et al, 1985). Dabei bilden zwei BCA-Moleküle mit einem Cu^+ -Ion einen farbigen Chelatkomplex. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA Protein Assay Reagent Kit verwendet und ausschließlich nach Anweisungen des Herstellers gearbeitet.

8.2.2 MACS

Mittels MACS („*magnetic cell separation*“) können einzelne Zellpopulationen aus Zellgemischen isoliert werden. Dabei werden die Zielzellen an einen Antikörper gegen definierte Oberflächenmarker, der an einen „Bead“ (Eisenpartikel) gekoppelt ist, gebunden. Die Zellsuspension wird über eine magnetisierte Säule gegeben. Durch die magnetische Bindung der Zielzelle bleiben diese in der Säule hängen und können separat eluiert werden. Zur

Separation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen wurden diese zunächst wie unter 8.1.2 beschrieben vorbereitet.

Die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und ausgezählt. 10⁷ Zellen wurden in 45 µL MACS-Puffer aufgenommen und 5 µL der entsprechenden Beads hinzugegeben. Die Beads banden an die Oberflächenmoleküle (CD4 oder CD8) der T-Zellen und ermöglichten dadurch die magnetische Bindung an die Matrix der Säule. Die Lösung wurde 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 mL MACS-Puffer verdünnt und bei 200 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, wodurch überschüssige Beads in der Lösung entfernt wurden. Die Säule wurde zwischenzeitlich mit 500 µL MACS-Puffer äquilibriert. Das Pellet wurde in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen und über die Säule gegeben. Wenn die Zellen durchgelaufen waren, wurde die Säule dreimal mit dem Säulenvolumen (500 µL) gespült. Zuerst wurden die CD8⁺ Zellen isoliert und anschließend die CD4⁺ Zellen. Die Säule wurde zur Isolierung der jeweiligen Zellpopulation aus dem Magneten entfernt und zweimal mit dem Säulenvolumen mit Hilfe des Stempels kräftig und zügig eluiert. Die Zellsuspension wurde nochmals bei 200 g für 10 min zentrifugiert und anschließend ausgezählt. Die Isolierung für die CD4⁺ Zellen erfolgte im Anschluss nach dem gleichen Prinzip. Zur Qualitätskontrolle wurde anschließend eine FACS-Analyse durchgeführt.

8.2.3 FACS

Die FACS (*Fluorescence activated cell sorting*)-Analyse dient der Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen. Dabei werden die Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen deren Oberflächenmoleküle, die zusätzlich mit einem Fluoreszenzmarker gekennzeichnet sind, markiert. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen von Seiten der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Lichtstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Granularität. T-Zellen z.B. streuen nur wenig Licht, da sie eine glatte Oberfläche haben,

wohingegen ausgereifte DC, aufgrund ihrer Dendriten, eher eine raue Oberfläche haben. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, das von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in der Zelle beeinflusst wird. Nach Markierung der Zellen kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden.

Die isolierten und gezählten Zellen wurden mit Medium auf mindestens 10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen eingestellt. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 200 μ L FACS-Puffer gewaschen. Dazwischen wurde jeweils 5 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde geprüft, ob ein Pellet vorhanden ist und der Überstand dann verworfen. Zu jedem FACS-Röhrchen wurden 10 μ L Fc-Block hinzu pipettiert und 5 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Der Fc-Block verhinderte unspezifische Bindungen der Antikörper an die Zielzelle, da er spezifisch an die Fc γ R-Oberflächenmoleküle auf T-Zellen und DC bindet. Nach der Inkubation wurden 10 μ L der jeweiligen Antikörper zu den Lösungen pipettiert und anschließend 20-30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 μ L FACS-Puffer aufgenommen und eine FACS-Analyse am FACS-Gerät durchgeführt.

8.2.4 INTRAZELLULÄRES FACS

Um Zellen anhand ihrer spezifischen Zytokinfreisetzung nach unterschiedlicher Stimulation zu charakterisieren, können die produzierten, aber noch nicht freigesetzten Zytokine mittels intrazellulärem (ic) FACS dargestellt und die Zellen unterschieden werden. Wichtig hierbei ist vor allem die Analyse von ausschließlich noch lebenden Zellen, was durch den Einsatz eines lebend/tot-Farbstoffs - „LIVE/DEAD Fixable Yellow“ - ermöglicht wird. Dieser gelangt durch die perforierte Membran von nekrotischen Zellen und bindet dort an freie

Amine im Innern und an der Zelloberfläche. Lebende Zellen hingegen werden nur an der Oberfläche gefärbt und erzeugen dadurch ein deutlich schwächeres Signal bei einer durchflusszytometrischen Messung, wodurch beide Zellstadien deutlich voneinander getrennt betrachtet und analysiert werden können. Als Positivkontrolle wird PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate), ein Phorbol-Ester verwendet, der als starker Proteinkinase C (PKC)-Aktivator agiert. Durch additive Gabe von Ionomycin, das als Ionophor zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel führt, kann die Effizienz der Kalzium-abhängigen PKC zusätzlich gesteigert werden. Durch die Kombination beider Substanzen können Immunzellen effizient aktiviert und eine erhöhte Zytokinproduktion erzielt werden. Damit produzierte Zytokine im Innern der Zelle festgehalten werden und somit für die spätere durchflusszytometrische Messung nachweisbar bleiben, werden alle Ansätze mit Brefeldin A behandelt. Dieses interferiert mit dem retrograden Transport des Golgi-Apparats, was zu einer Akkumulation von gebildeten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum führt.

Nach der Restimulation wurden die Zellen in ein 15 mL Falcon überführt und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zwischendurch wurden die Zellen jeweils bei 200 g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend gezählt. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen auf 10^7 Zellen/mL eingestellt und 1 μ L/mL des Farbstoffes hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden 10^6 Zellen/100 μ L in ein well einer 96 well-Platte gegeben und erneut bei 450 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit 10 μ L Fc-Block für 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen gewaschen und zentrifugiert (450 g, 3 min) und anschließend für 20 min mit 10 μ L der spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Oberflächen-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen (450 g, 3 min) und für 20 min in 50 μ L Fixierungs-Puffer fixiert. In den darauf folgenden beiden Waschschrritten wurde je 100 μ L eines Permeabilisierung-Puffers verwendet, um das Eindringen der Zytokin-spezifischen Antikörper in die Zellen zu gewährleisten. 10 μ L der Zytokin-Antikörper in Permeabilisierung-Puffer wurden pro well hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut

dreimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 μ L Puffer aufgenommen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

8.2.5 ELISA

Der ELISA (engl.: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können unter anderem Proteine nachgewiesen werden. Dabei wird das Antigen oder der Antikörper mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das sogenannte Substrat wird vom Enzym umgesetzt und das Reaktionsprodukt kann dann als Farbumschlag nachgewiesen werden. Der Sandwich-ELISA verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Für quantitative Nachweise wird zusätzlich eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal zu erhalten. Mit Hilfe eines Microplate Readers wird die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Je nach zu untersuchendem Zytokin wurde ein anderes ELISA-Kit verwendet. Bei allen verwendeten ELISA (IFN γ , IL-4, IL-10 und IL-17A) wurde nach Anweisung des Herstellers gearbeitet.

8.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistischen Analysen wurden unter Anwendung des ungepaarten *Student's t test* und der Software *StatView*[®] für Windows durchgeführt.

9. PEPTIDVERZEICHNIS

9.1 PEPTIDE DER LACK-BIBLIOTHEK

Die Peptide der LACK-Bibliothek wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH in Berlin synthetisiert und je 132 nmol der Peptide wurde lyophilisiert geliefert. Die Peptide wurden in 10 %-igem DMSO in PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 10^{-3} mol zu erhalten. Die Aliquots wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

9.1.1 PEPTIDLISTE DER LACK-BIBLIOTHEK

Peptidnummer	Aminosäuresequenz	besondere Funktion	Anzahl Aminosäuren
1	HHHHHHGYGRKKRRQ	-	15
2	HHGYGRKKRRQRRRG	-	15
3	GRKKRRQRRRGYPYD	-	15
4	RRQRRRGYPYDVPDY	-	15
5	RRGYPDVPDYAEFL	-	15
6	PYDVPDYAEFLRDGH	-	15
7	PDYAEFLRDGHEDWV	-	15
8	EFLRDGHEDWVSSIC	-	15
9	DGHEDWVSSICFSPS	-	15
10	DWVSSICFSPSLEHP	-	15
11	SICFSPSLEHPIVVS	-	15
12	SPSLEHPIVVSWSW	-	15
13	EHPIVVSWSWNTIK	-	15
14	VVSWWSWNTIKVWNV	-	15
15	SWWSWNTIKVWNVGGK	-	15
16	TIKWVWNVGGKCERT	-	15
17	WNVGGKCERTLKGH	-	15
18	GGKCERTLKGHSNYV	-	15
19	ERTLKGHSNYVSTVT	-	15
20	KGHSNYVSTVTVSPD	-	15
21	NYVSTVTVSPDGSLC	-	15
22	TVTSPDGSLCASGG	-	15
23	SPDGSLCASGGKDGA	-	15
24	SLCASGGKDGAALLW	-	15
25	SGGDGAALLWDLST	-	15
26	DGAALLWDLSTGEQL	-	15

27	LLWDLSTGEQLFKIN	-	15
28	LSTGEQLFKINVEST	-	15
29	EQLFKINVESTPINQI	-	15
30	KINVESTPINQIGFSP	-	15
31	ESPINQIGFSPNRFW	-	15
32	NQIGFSPNRFWMCVA	-	15
33	FSPNRFWMCVATERS	-	15
34	RFWMCVATERSLSVY	-	15
35	CVATERSLSVYDLES	-	15
36	ERSLSVYDLESKAVI	-	15
37	SVYDLESKAVIAELT	-	15
38	LESKAVIAELTPDGA	-	15
39	AVIAELTPDGAKPSE	-	15
40	ELTPDGAKPSECISI	-	15
41	DGAKPSECISIAWSA	-	15
42	PSECISIAWSADGNT	-	15
43	ISIAWSADGNTLYSG	-	15
44	WSADGNTLYSGHKDN	-	15
45	GNTLYSGHKDNLIRV	-	15
46	YSGHKDNLIRVWSIS	-	15
47	HKDNLIRVWSISDAE	-	15
48	SIINFEKL	Kontrollpeptid: CD8 ⁺ -Epitop	8
49	GYKDGNEYI	Kontrollpeptid: CD8 ⁺ -Epitop	9
50	ICFSPSLEHPIVVSGSWD	Kontrollpeptid: CD4-LACK-Peptid	18

9.2 PEPTIDE AUS BEIDEN LEBENSFORMEN VON *L. MAJOR*

Auf Basis der Auswahlkriterien wurden 300 Peptide mit unterschiedlichen Mengen in mg von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH in Berlin synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden in 35 %-igem Acetonitril gelöst, um eine Endkonzentration von 10^{-3} mol zu erhalten. Die Aliquots wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

9.2.2 PEPTIDLISTE DER PEPTIDE AUS BEIDEN LEBENSFORMEN VON *L. MAJOR*

Peptidnummer	Aminosäuresequenz	SYF-PHEITI-Score	Stabilitätsassay [hrs]	H2-D ^b	H2-K ^b	Protein	Chromosom	Funktion	Lokalisation	Lebensform
1	AAARNMPTM	28	0,38	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
2	AAATNTLIM	25	0,44	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	11	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
3	AAGYNRHNM	26	0,17	1	-	RNA binding protein putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Replikation/ Transkription	Zellkern	In beiden Lebensformen
4	AAKRNKQVI	27	0,55	1	-	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative [<i>L. major</i> strain Friedlin]	27	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
5	AAPQNAVSI	32	7,43	1	-	h1 histone like protein <i>L. major</i>	33	Replikation/ Transkription	Zellkern	Amastigote
6	AASTNEVNIL	27	0,24	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	3	unbekannt	unbekannt	Amastigote

7	AAATNSQLL	27	0,57	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	33	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
8	AAVDNAVWV	26	0,58	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	Amastigote
9	ACLENEELV	25	0,48	1	-	paraflagellar rod protein 1D putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Fortbewegung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
10	ACLSNEEFI	28	2,76	1	-	paraflagellar rod protein 2C <i>L. major</i>	16	Fortbewegung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
11	ADAENARRI	26	0,83	1	-	co chaperone GrpE putative <i>L. major</i>	30	Stressbewältigung / Proteinfaltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
12	AEKENVKTL	25	0,00	1	-	heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	30	Proteinfaltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
13	AELRNGKKL	25	0,00	1	-	vesicle associated membrane protein putative <i>L. major</i>	8	Intrazellulärer Transport	Zytoplasma	Amastigote

14	AEVINLRSL	27	0,19	1	-	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit putative <i>L. major</i>	25	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
15	AEVSNLSVM	28	0,25	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	14	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
16	AFSPNRFWM	21	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
17	AGECMHEFL	16	0,18	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
18	AGFMNFCTL	27	0,46	1	-	branched chain amino acid aminotransferase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	27	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
19	AGISNFAAI	28	0,85	1	-	hypothetical protein conserved leucine rich repeat protein putative <i>L. major</i>	32	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
20	AGKTNAALI	26	0,27	1	-	oligosaccharyl transferase like protein <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Translation	Endoplasmatisches Retikulum	Amastigote

21	AGLENLPNL	30	0,35	1	-	hypothetical protein conserved leucine rich repeat protein putative <i>L. major</i>	32	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
22	AGLLNKTSL	29	0,61	1	-	thiolase protein like protein <i>L. major</i>	31	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
23	AGMENVLTF	26	0,19	1	-	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
24	AGRDNVIRV	21	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
25	AIPQNHALL	26	0,24	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	28	unbekannt	unbekannt	Amastigote
26	AKNANGEYL	26	0,18	1	-	long chain fatty Acyl CoA synthetase putative <i>L. major</i>	3	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
27	AKQGNIDLI	25	0,00	1	-	40S ribosomal protein S12 putative <i>L. major</i>	13	Translation	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

28	ALAKNLAQL	25	0,40	1	-	carnitine choline acetyltransferase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Intrazellulärer Transport	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
29	ALDTNGKEM	25	0,34	1	-	carnitine choline acetyltransferase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Intrazellulärer Transport	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
30	ALIANSEQL	26	0,28	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Intrazellulärer Transport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
31	ALIENADDL	29	0,22	1	-	T complex protein 1 theta subunit putative chaperonin putative <i>L. major</i>	36	Protein-faltung	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
32	ALPRNAHPM	27	0,85	1	-	citrate synthase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
33	AMAGNPVVI	25	0,39	1	-	pyruvate phosphate dikinase putative <i>L. major</i>	11	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
34	AMGSNQCLL	27	0,90	1	-	CPA cysteine peptidase clan CA family C1 cathepsin L like protein cysteine protease A cysteine	19	Virulenzfaktor	Lysosomen	In beiden Lebensformen

35	AMVENTKEI	30	0,79	1	-	protein kinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
36	AMYFLCL	27	3,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
37	AQGTNPIDM	25	0,82	1	-	chaperonin Hsp60 mitochondrial precursor <i>L. major</i>	36	Stressbewäl- tigung / Protein- faltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
38	AQYNHDFE	26	0,49	1	-	iron superoxide dismutase putative <i>L. major</i>	32	Stressbewäl- tigung	Zytoplasma / Mitochondrien	Amastigote
39	AQQNLLHL	28	0,39	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
40	AQYAYIEL	28	3,20	-	1	hypothetical protein L302 07 <i>L. major</i> strain Friedlin	4	unbekannt	unbekannt	Amastigote
41	ARGVNLCLL	28	0,90	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen

42	ARNNLSLL	26	0,26	1	-	kinesin putative <i>L. major</i>	16	Intrazellulärer Transport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
43	ASFRNVEEI	29	0,58	1	-	transaldolase putative <i>L. major</i>	16	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
44	ASGTNPMDL	26	0,40	1	-	chaperonin Hsp60 mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	32	Stressbewältigung / Proteinfaltung	Zytoplasma / Mitochondrien	Amastigote
45	ASVNGDLL	30	0,70	1	-	cysteinylyl tRNA synthetase putative <i>L. major</i>	12	Proteinsynthese	Zytoplasma	Promastigote
46	ASLNNIKTI	28	0,43	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote
47	ASLTNAVIL	28	1,07	1	-	metallo peptidase Clan ME Family M16 peptidase putative <i>L. major</i>	31	Proteolyse	Zytoplasma	Promastigote
48	ASLVNIPVI	28	0,51	1	-	40S ribosomal protein SA putative <i>L. major</i>	36	Translation	Zytoplasma	Promastigote

49	ASWDRSIRM	16	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
50	ATIMNLLLEI	28	0,57	1	-	t complex protein 1 eta subunit putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Proteinfaltung	Zytoplasma	Promastigote
51	ATPYNPEDI	27	0,23	1	-	p1 s1 nuclease <i>L. major</i>	30	Replikation/Transkription	Zellkern	In beiden Lebensformen
52	AVRFNAETL	25	0,26	1	-	fructose 1 6 bisphosphate aldolase <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
53	AYARNLDTL	29	0,16	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
54	CAQANVSLI	25	0,22	1	-	transaldolase putative <i>L. major</i>	16	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
55	CNSVNRVEL	25	0,00	1	-	ATP dependent DEAD box RNA helicase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Replikation/Transkription	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

56	CSGENAARI	27	0,22	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	36	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
57	CTVTNAHTI	26	0,58	1	-	pyruvate kinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
58	CYIENPRTL	26	0,22	1	-	sterol C 24 reductase putative <i>L. major</i>	33	Stoffwechsel	Membran	Amastigote
59	DAAKNQVA M	25	0,36	1	-	heat shock protein hsp70 putative <i>L. major</i>	28	Protein- faltung / Stress- bewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
60	DALLNEENL	27	0,23	1	-	paraflagellar rod component par4 putative <i>L. major</i>	5	Fortbewe- gung	Zellmembran/ Zytoplasma	Promastigote
61	DALSNRDRV	25	0,40	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
62	DAMENPLSL	26	0,17	1	-	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor putative <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen

63	DASFNASAI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote
64	DAVRNAAAI	27	1,18	1	-	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative [<i>L. major</i> strain Friedlin]	27	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
65	DAYDFLDL	28	0,00	-	1	mitogen activated protein kinase putative protein kinase putative <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	Promastigote
66	DFIANTETI	25	0,41	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	29	unbekannt	unbekannt	Amastigote
67	DGGVNYNYI	27	0,00	1	-	vesicle associated membrane protein putative <i>L. major</i>	8	Vesikel-Formation	Zytoplasma	Amastigote
68	DLVNNLGTI	26	0,30	1	-	heat shock protein 83.1 <i>L. major</i>	33	Protein-faltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
69	DMSTNAEYF	26	0,27	1	-	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal <i>L. major</i>	30	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

70	DQIRNMSVI	25	0,62	1	-	elongation factor 2 <i>L. major</i>	36	Translation	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
71	DSFPNSVTI	25	0,21	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	36	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
72	DSLYNEIRI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	30	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
73	DSNENLLAL	26	0,00	1	-	transaldolase putative <i>L. major</i>	16	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
74	EAAKNVECI	25	0,20	1	-	acyl coa dehydrogenase putative <i>L. major</i>	28	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
75	EAGVNRDDF	25	0,00	1	-	heat shock protein putative <i>L. major</i>	18	Protein-faltung / Stressbewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
76	EALANDGSL	25	0,20	1	-	chaperonin Hsp60 mitochondrial precursor <i>L. major</i>	36	Protein-faltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

77	EAPENAREL	30	0,79	1	-	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative [<i>L. major</i> strain Friedlin]	27	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
78	ECGVNPSEL	25	0,00	1	-	hypothetical protein LT05 <i>L. major</i> strain Friedlin	4	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
79	EMLFNPSHL	25	0,00	1	-	2 oxoglutarate dehydrogenase E1 component putative <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Mitochondrien	Amastigote
80	EPYGYDKL	27	0,10	-	1	aldose 1 epimerase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Stoffwechsel	Zytoplasma	Promastigote
81	ERYPYLSL	26	0,00	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
82	ESITVVRI	26	0,00	1	-	serine peptidase putative <i>L. major</i>	2	Apoptose	Mitochondrien	Amastigote
83	ESPINQJAF	22	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

84	FAEDNFDEF	28	0,00	1	-	enolase <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
85	FALINYMRF	26	0,00	1	-	protein kinase putative <i>L. major</i>	15	Signaltransduktion	Zytoplasma	Amastigote
86	FAWVNLVHI	31	1,00	1	-	p1 s1 nuclease <i>L. major</i>	30	Nukleinsäure-Abbau	Zellkern	In beiden Lebensformen
87	FFLINGPEI	25	0,33	1	-	Transitional endoplasmic reticulum ATPase putative valosin containing protein homolog <i>Leishmania</i>	36	Protein-synthese	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
88	FFYFFFLL	26	0,00	-	1	sterol C 24 reductase putative <i>L. major</i>	33	Stoffwechsel	Membran	Amastigote
89	FGDVNSPLL	27	0,68	1	-	pyruvate phosphate dikinase putative <i>L. major</i>	11	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
90	FGVNCAGI	28	0,39	1	-	3 oxoacyl acyl carrier protein reductase putative <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma	Promastigote

91	FKLVNTIYL	28	0,86	1	-	citrate synthase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Mitochondrien	Promastigote
92	FLMVNADRM	28	0,55	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	Amastigote
93	FMPENYKLL	30	0,26	1	-	pyruvate phosphate dikinase putative <i>L. major</i>	11	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
94	FNNVMPFM	25	0,00	1	-	poly a binding protein putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Translation	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
95	FQDDNYESL	27	0,29	1	-	Serine peptidase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Apoptose	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
96	FRPHNTSRI	27	0,00	1	-	amastrin like protein <i>L. major</i>	8	Oberflächen- protein	Zelloberfläche	Amastigote
97	FRRGNASTL	25	0,17	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote

98	FSLENVRLM	29	0,57	1	-	carboxypeptidase putative metallo peptidase Clan MA E family 32 <i>L. major</i>	13	Proteolyse	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
99	FTYDNLPEF	25	0,41	1	-	phosphoprotein phosphatase putative <i>L. major</i>	5	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
100	FVNNREKL	25	0,14	1	-	high mobility group protein homolog tdp 1 putative <i>L. major strain</i> Friedlin	29	Transkription	Zellkern	In beiden Lebensformen
101	GAINNAVNI	27	0,53	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
102	GAPVNEFAI	28	1,02	1	-	transcription factor like protein <i>L. major strain</i> Friedlin	29	Transkriptionsfaktor	Zellkern	Amastigote
103	GGDGNLSAL	25	0,66	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	13	unbekannt	unbekannt	Amastigote
104	GGHMNLTML	25	0,20	1	-	succinyl coA 3 ketoacid coenzyme A transferase mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	33	Signaltransduktion	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen

105	GKGANLAEM	25	0,00	1	-	pyruvate phosphate dikinase putative <i>L. major</i>	11	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
106	GMLYNFSEL	28	0,29	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote
107	GMNVNVQRL	26	0,00	1	-	60S ribosomal protein L13 putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Protein-synthese	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
108	GRPKNMQAM	25	0,00	1	-	actin a <i>L. major</i>	4	Fortbewegung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
109	GSFVNPNTI	26	0,43	1	-	dihydrolipoamide dehydrogenase putative <i>L. major</i>	32	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
110	HAAATNFREI	27	0,18	1	-	cysteine peptidase Clan CA family C2 putative <i>L. major</i> strain Friedlin	27	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
111	HGLANQEVL	26	0,59	1	-	citrate synthase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

112	HRPFNAKTL	26	0,00	1	-	protein kinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
113	HSVDSYGL	15	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltrans- duktion, Zellzyklus- Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
114	IAETNGREM	25	0,00	1	-	ruvb like 1 DNA helicase putative <i>L. major</i>	34	Replikation / Transkription	Zellkern	In beiden Lebensformen
115	IAGLNVLRI	25	12,22	1	-	heat shock protein 70 related protein <i>L. major</i>	26	Stressbewäl- tigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
116	IAGLNVVRI	26	0,00	1	-	glucose regulated protein 78 putative <i>L. major</i>	28	Protein- faltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
117	IDPENKEQL	27	0,00	1	-	t complex protein 1 gamma subunit putative <i>L. major</i>	23	Protein- faltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
118	IDYPYVSL	27	0,10	-	1	heat shock protein putative <i>L. major</i>	33	Protein- faltung / Stressbewäl- tigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

119	IGGVNVAGL	25	0,00	1	-	glycosomal membrane like protein <i>L. major</i>	24	Intrazellulärer Proteintransport	Zellmembran/ Zytoplasma	Amastigote
120	IGYDNFVEF	25	0,00	1	-	glucose 6 phosphate isomerase <i>L. major</i>	12	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
121	IMGDAAAFM	26	0,46	1	-	glycosomal membrane protein putative <i>L. major</i>	28	Intrazellulärer Proteintransport	Zellmembran/ Zytoplasma	Amastigote
122	IMYMYFAL	27	4,20	-	1	fatty acid elongase putative <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Endoplasmatisches Retikulum	In beiden Lebensformen
123	IMYTYFAL	27	5,30	-	1	fatty acid elongase putative <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Endoplasmatisches Retikulum	Amastigote
124	IPPTNVSTL	27	0,50	1	-	metallo peptidase Clan ME Family M16 <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Proteolyse	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
125	ISLDNYDSI	28	0,70	1	-	ATP dependent RNA helicase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen

126	ISPGNKSDM	26	0,00	1	-	GTP binding protein putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
127	ITPFNFTAI	26	0,43	1	-	delta 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase putative <i>L. major</i>	3	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
128	ITYSYSRL	28	0,00	-	1	dynein putative <i>L. major</i>	32	Fortbewegung	Zytosol	Promastigote
129	IYYSFGFL	27	0,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	29	unbekannt	unbekannt	Amastigote
130	KAGVNLPL	29	0,58	1	-	oligosaccharyl transferase like protein <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Protein-synthese	Membran	Amastigote
131	KALENPVNL	29	0,36	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	24	unbekannt	unbekannt	Promastigote
132	KAQRNPADL	25	0,00	1	-	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal <i>L. major</i>	30	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

133	KASFNDQQL	25	0,00	1	-	heat shock protein 20 putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stressbewäl- tigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
134	KDPENFDHF	28	0,00	1	-	map kinase putative mitogen activated protein kinase putative <i>L. major</i>	33	Signaltrans- duktion	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
135	KDPNNTLYI	26	0,00	1	-	stress induced protein sti1 <i>L. major</i>	8	Protein- faltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
136	KEAENGDEL	27	0,00	1	-	calpain like cysteine peptidase Clan CA family C2 calpain like cysteine peptidase putative <i>L. major</i>	20	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
137	KEGENAASL	26	0,00	1	-	aconitase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
138	KENENLRVL	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
139	KEPRNIQRI	27	0,00	1	-	alanyl tRNA synthetase putative <i>L. major</i>	22	Translation	Zytoplasma	Promastigote

140	KESKNLTKM	26	0,21	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	29	unbekannt	unbekannt	Amastigote
141	KGHTNDTFF	25	0,21	1	-	regulatory subunit of protein kinase a like protein <i>L. major</i>	34	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
142	KGVQNMAE M	28	0,64	1	-	elongation factor 2 <i>L. major</i>	36	Translation	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
143	KGYNQTRI	26	0,16	1	-	pyruvate kinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
144	KIIGNLTSM	27	0,25	1	-	putative 3 ketoacyl coa thiolase like protein <i>L. major</i>	31	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
145	KLGLNESEM	25	0,43	1	-	glutamate dehydrogenase <i>L. major</i>	15	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
146	KLPTNSSAI	26	0,23	1	-	transketolase putative <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen

147	KLRENAELM	26	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	Amastigote
148	KLVMNKDGL	25	0,00	1	-	la RNA binding protein putative <i>L. major</i>	21	Translation	Zellkern	In beiden Lebensformen
149	KMFSNKTSL	27	0,28	1	-	metallo peptidase Clan ME Family M16 mitochondrial processing peptidase alpha subunit putative	13	Proteolyse	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
150	KNGRNLEDF	25	0,00	1	-	protein disulfide isomerase putative <i>L. major</i>	26	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
151	KQYPYTGL	27	0,10	-	1	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative [<i>L. major</i> strain Friedlin]	27	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
152	KSIENAAACL	28	0,69	1	-	aconitase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
153	KSISNIVNI	27	0,31	1	-	glucose 6 phosphate isomerase <i>L. major</i>	12	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

154	KSLANTTTL	29	0,85	1	-	elongation factor 2 <i>L. major</i>	36	Translation	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
155	KSLKNFIFI	29	0,71	1	-	cysteinyI tRNA synthetase putative <i>L. major</i>	12	Transkription	Zytosol	Promastigote
156	KTPENAEVL	29	0,32	1	-	carnitine choline acetyltransferase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
157	KWLNNVDI	26	0,17	1	-	fatty acid elongase putative <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Endoplasmatisches Retikulum	Amastigote
158	LAGYNAAVM	25	0,39	1	-	kinesin putative <i>L. major</i>	16	Fortbewegung	Zytosol	In beiden Lebensformen
159	LAHFDDNI	25	0,25	1	-	map kinase putative mitogen activated protein kinase putative <i>L. major</i>	33	Signaltransduktion	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
160	LALGNTVVL	26	0,00	1	-	aldehyde dehydrogenase mitochondrial precursor <i>L. major</i>	25	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen

161	LAVDNVAEL	28	0,27	1	-	metallo peptidase Clan MA E Family M3 <i>L. major</i> strain Friedlin	1	Proteolyse	Zytoplasma	Promastigote
162	LEYLYLNL	28	0,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	10	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
163	LGYDFEAV	26	0,10	-	1	OMPDCase OPRase putative orotidine 5 phosphate decarboxylase- orotate-phosphoribosyltransferase <i>L. major</i> strain Friedlin	16	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
164	LIYIFILI	25	0,20	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	29	unbekannt	unbekannt	Amastigote
165	LLVQNGEM	25	0,15	1	-	ADP ATP carrier protein 1 mitochondrial precursor putative ADP ATP translocase 1 putative <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
166	LNVENLMDI	26	0,19	1	-	heat shock protein putative <i>L. major</i>	18	Protein-faltung / Stressbewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
167	LSKKNIESI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	14	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen

168	LSPGNNEVM	27	0,37	1	-	stress inducible protein STII homolog <i>L. major</i>	36	Protein- faltung	Zytoplasma	Promastigote
169	LSYGYSIV	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	17	unbekannt	unbekannt	Amastigote
170	MKPSNADEL	29	0,16	1	-	glucose transporter putative <i>L. major</i>	36	Glucose- transport	Membran	Promastigote
171	MLENTSQM	25	0,17	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	13	unbekannt	unbekannt	Amastigote
172	MLVSNRREI	25	0,19	1	-	ama1 protein putative <i>L. major</i>	30	Transmem- branprotein	Zellmembran/ Zytoplasma	Amastigote
173	MLYNFSEL	27	0,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote
174	MPGDNRELI	25	0,17	1	-	elongation factor TU putative <i>L. major</i>	18	Protein- synthese	Zytoplasma	Amastigote

175	MSKDNFDQL	25	0,16	1	-	protein disulfide isomerase putative <i>L. major</i>	26	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
176	NAKENSATL	26	0,18	1	-	14 3 protein like protein <i>L. major</i>	36	Stressbewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
177	NDVTNEEHI	26	0,00	1	-	heat shock protein putative <i>L. major</i>	33	Proteinfaltung / Stressbewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
178	NESSADRDL	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	10	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
179	NGGCERTL	16	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
180	NGPTNVLL	28	0,31	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	25	unbekannt	unbekannt	Promastigote
181	NSLMNNHSI	25	0,33	1	-	vacuolar ATP synthase catalytic subunit a putative <i>L. major</i>	34	Ionentransport	Membran	In beiden Lebensformen

182	NSVVNAVLL	29	0,35	1	-	calpain like cysteine peptidase Clan CA family C2 calpain like cysteine peptidase putative <i>L. major</i>	20	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	Promastigote
183	PANPNFTDI	25	0,00	1	-	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor putative <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
184	PAPTNAPEL	29	0,45	1	-	heat shock protein putative <i>L. major</i>	18	Protein- faltung / Stressbewäl- tigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
185	PGYMYTNL	29	2,90	-	1	vacuolar ATP synthase subunit B putative <i>L. major</i>	28	Ionen- transport	Membran	In beiden Lebensformen
186	PSEENS DRM	25	0,19	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
187	PTLPNLHTL	25	0,20	1	-	hypothetical protein conserved leucine rich repeat protein putative <i>L. major</i>	32	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
188	QAGSYIKV	19	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltrans- duktion, Zellzyklus- Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

189	QAVKNVNEI	28	0,56	1	-	enolase <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
190	QDAVNLGLM	25	0,52	1	-	clathrin heavy chain putative <i>L. major</i>	36	Intrazellulärer Protein-transport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
191	QEPENRKVL	25	0,00	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	21	unbekannt	unbekannt	Amastigote
192	QGIANAVGL	26	0,17	1	-	transketolase putative <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	In beiden Lebensformen
193	QCVQNIDSI	28	0,45	1	-	pyruvate kinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	In beiden Lebensformen
194	QLAANAEEEL	25	0,15	1	-	hypothetical protein LMJ 0185 <i>L. major</i>	3	unbekannt	unbekannt	Amastigote
195	QMVYNQDEI	28	0,16	1	-	P type H ATPase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Membran	In beiden Lebensformen

196	QQPTNTISI	26	0,26	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	32	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
197	RAHRNLSPI	26	1,04	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	34	unbekannt	unbekannt	Amastigote
198	RAMPNLQVI	25	0,52	1	-	transketolase putative <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	In beiden Lebensformen
199	RAPVNSMSL	28	1,45	1	-	3 2 trans enoyl CoA isomerase mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	31	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	Promastigote
200	RAVENADV	25	11,17	1	-	malate dehydrogenase <i>L. major</i>	34	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
201	RGVYVNMQYL	28	0,98	1	-	60S acidic ribosomal protein P2 putative <i>L. major</i>	30	Translation	Zytoplasma	Promastigote
202	RKYFFPDL	27	0,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	35	unbekannt	unbekannt	Amastigote

203	RRLKNVTRM	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	36	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
204	RRVENAQFL	26	0,23	1	-	paraflagellar rod protein 1D putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Fortbewegung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
205	RSPVNYNLL	27	0,45	1	-	ATPase alpha subunit <i>L. major</i>	5	Stoffwechsel	Mitochondrien /Zytoplasma	Promastigote
206	SADPNRMLI	26	1,44	1	-	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase putative <i>L. major</i> strain Friedlin	27	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
207	SAIDNLKGM	30	0,55	1	-	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative <i>L. major</i> strain Friedlin	27	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	Promastigote
208	SAIGNVCTV	25	1,16	1	-	glycosomal membrane like protein <i>L. major</i>	24	Intrazellulärer Proteintransport	Zellmembran/ Zytoplasma	Amastigote
209	SAPLNVENL	30	5,80	1	-	heat shock protein putative <i>L. major</i>	18	Proteinfaltung / Stressbewältigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

210	SAVLNLTIV	28	1,11	1	-	GTP binding protein putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
211	SAVRNCDEF	30	1,45	1	-	aconitase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma/ Mitochondrien	In beiden Lebensformen
212	SAVYNACSV	27	5,27	1	-	chaperonin Hsp60 mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	32	Protein- faltung	Mitochondrien	Amastigote
213	SAVWNSNINI	27	0,87	1	-	glucose 6 phosphate dehydrogenase <i>L. major</i>	34	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
214	SAYENMETL	31	0,44	1	-	ATP synthase epsilon chain putative <i>L. major</i>	30	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
215	SDLNNLASI	27	0,18	1	-	clathrin heavy chain putative <i>L. major</i>	36	Intrazellulärer Protein- transport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
216	SECHNPDTM	26	2,56	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen

217	SEGGNDYEI	25	1,25	1	-	phosphomannomutase putative <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
218	SELRNKYSL	27	0,23	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	26	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
219	SGASNSVTI	28	0,26	1	-	heat shock protein 20 putative <i>L. major</i> strain Friedlin	29	Stressbewäl- tigung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
220	SGELNVSEI	26	0,21	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	6	unbekannt	unbekannt	Amastigote
221	SGKENKGAI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	20	unbekannt	unbekannt	Amastigote
222	SGPGNLRILV	26	0,00	1	-	hypothetical protein unknown function <i>L. major</i>	13	unbekannt	unbekannt	Amastigote
223	SHNENAYTM	27	0,14	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	24	unbekannt	unbekannt	Promastigote

224	SLPQNQTQL	28	0,21	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	27	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
225	SLPVNGLHI	28	0,17	1	-	⁵ methyltetrahydropteroylriglutamate homocysteinemethyltransferase putative <i>L. major</i>	31	Signaltransduktion	Zytoplasma	Promastigote
226	SMWGNLDQF	26	0,00	1	-	epsin putative <i>L. major</i>	25	Membrankrümmung	Membran	In beiden Lebensformen
227	SPIVNCSDM	27	0,24	1	-	amastin like surface protein like protein <i>L. major</i>	30	Oberflächenprotein	Membran	In beiden Lebensformen
228	SPNSNFVTL	27	0,25	1	-	hypothetical protein conserved leucine rich repeat protein putative <i>L. major</i>	32	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
229	SPVWNSNLI	25	0,24	1	-	succinate dehydrogenase flavoprotein putative <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
230	SQGNNMKFI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	27	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen

231	SRYPFLRL	27	0,10	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
232	SSMPNLQTL	29	0,56	1	-	surface antigen protein 2 putative <i>L. major</i>	12	Oberflächenprotein	Membran	Promastigote
233	SSSVNARNI	27	0,00	1	-	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8 putative <i>L. major</i>	36	Proteinsynthese	Zytoplasma	Promastigote
234	STIVNEGAL	26	0,36	1	-	ATP dependent zinc metalloproteinase putative metallo peptidase Clan MA E Family M41 <i>Leishmania</i>	32	Proteolyse	Membran	In beiden Lebensformen
235	STSRDGTAI	15	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
236	STYPFLRL	27	4,00	-	1	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
237	SVEVNHQTM	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	2	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen

238	SWLSNVQKI	26	0,00	1	-	glycosomal membrane like protein <i>L. major</i>	24	Proteintransport	Zellmembran/ Zytoplasma	Amastigote
239	TAYEFAEL	28	0,00	-	1	i 6 autoantigen like protein <i>L. major</i>	22	Kalzium-Ionen Bindung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
240	TGDSNVKSI	25	0,00	1	-	succinyl CoA ligase GDP forming beta chain putative <i>L. major</i>	36	ATP-Bindung	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
241	TGFVSCVSL	17	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
242	TGIGNRTSL	28	0,23	1	-	oligosaccharyl transferase like protein <i>L. major</i> strain Friedlin	35	Protein-synthese	Membran	Amastigote
243	TGKRNQITI	25	0,19	1	-	heat shock protein hsp70 putative <i>L. major</i>	28	Protein-faltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
244	TIGFNVETL	25	0,15	1	-	adp ribosylation factor putative <i>L. major</i>	31	Signaltransduktion	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

245	TIPANATLL	27	0,49	1	-	peptidylprolyl isomerase like protein <i>L. major</i>	19	Proteinfaltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
246	TIVRNAIRL	25	0,00	1	-	chaperonin Hsp60 mitochondrial precursor <i>L. major</i>	36	Proteinfaltung	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
247	TMGVNACLL	28	0,83	1	-	cathepsin L like protease <i>L. major</i>	8	Proteolyse	Zytoplasma	Promastigote
248	TMLTNGVKL	27	0,28	1	-	glutamate dehydrogenase putative <i>L. major</i>	28	Stoffwechsel	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
249	TNPSNVVIL	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	26	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
250	TNVSNSRSI	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	23	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
251	TPISNIIRI	25	0,00	1	-	inosine 5 monophosphate dehydrogenase <i>L. major</i>	19	Signaltransduktion	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen

252	TRDPNLAYI	25	0,00	1	-	clathrin heavy chain putative <i>L. major</i>	36	Intrazellulärer Proteintransport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
253	TRKDNLTLM	26	0,00	1	-	glucose regulated protein 78 putative <i>L. major</i>	28	Proteinfaltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
254	TSANNARSL	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
255	TSVDNIYAI	26	0,27	1	-	trypanothione reductase <i>L. major</i>	5	Stressbewältigung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
256	TTGLNAEAI	25	0,28	1	-	dihydrolipoamide dehydrogenase putative <i>L. major</i>	32	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
257	TVVRNLRKLL	25	0,59	1	-	aconitase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
258	VAAHNAEAM	27	0,63	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	unbekannt	unbekannt	Amastigote

259	VAAVNVERI	29	0,64	1	-	UDP galactopyranose mutase <i>L. major</i>	18	18	Isomerase	Zytoplasma	Promastigote
260	VAFSPDDRDL	18	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
261	VAGECMHEF	17	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
262	VALNNRGS	27	0,46	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	16	16	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
263	VAPANVGI	28	0,84	1	-	n acyl l amino acid amidohydrolase putative <i>L. major</i>	31	31	Stoffwechsel	Zytoplasma	Promastigote
264	VAQHNASCI	26	0,34	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	33	33	unbekannt	unbekannt	Amastigote
265	VATVNAVTV	25	0,43	1	-	p1 s1 nuclease <i>L. major</i>	30	30	Nukleinsäure-Abbau	Zellkern	In beiden Lebensformen

266	VEIWNLVFM	27	0,00	1	-	alanyl tRNA synthetase putative <i>L. major</i>	22	Translation	Zytoplasma	Promastigote
267	VELENGDVM	27	0,40	1	-	succinyl CoA ligase GDP forming beta chain putative <i>L. major</i>	36	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
268	VEWRNPDTL	26	0,18	1	-	stress induced protein sti1 <i>L. major</i>	8	Protein-faltung	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
269	VGLVNCLLL	28	0,00	1	-	cytochrome c1 heme protein mitochondrial precursor putative <i>L. major</i>	7	Stoffwechsel	Membran	Promastigote
270	VHQVNLEYL	29	0,37	1	-	aconitase putative <i>L. major</i>	18	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
271	VKLRNRVVM	25	0,30	1	-	2 4 dienoyl coa reductase fadh1 putative <i>L. major</i>	33	Stoffwechsel	Membran	Amastigote
272	VKLSNRALI	25	0,00	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

273	VKQTNLSSL	26	0,00	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
274	VKVENQVRL	27	0,23	1	-	cysteine peptidase Clan CA family C2 putative cytoskeleton associated protein CAP5 5 putative	31	Proteolyse	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
275	VKVGNRSTL	26	0,19	1	-	acetyl CoA synthetase putative <i>L. major</i>	23	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
276	VLVVGHRHRI	26	0,18	1	-	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal <i>L. major</i>	30	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
277	VNPANEEVI	26	0,15	1	-	aldehyde dehydrogenase mitochondrial precursor <i>L. major</i>	25	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	In beiden Lebensformen
278	VQAENGKEL	26	0,00	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
279	VQLTNRALI	26	0,53	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

280	VQQANLREL	26	0,00	1	-	carboxypeptidase putative metallo peptidase Clan MA E family 32 <i>L. major</i>	12	Proteolyse	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
281	VSAGNAKTL	26	0,00	1	-	triosephosphate isomerase <i>L. major</i>	24	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
282	VSAVNLLPL	27	0,87	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i> strain Friedlin	35	unbekannt	unbekannt	Amastigote
283	VSFENPRAL	25	0,26	1	-	4 coumarate coa ligase like protein <i>L. major</i>	19	Stoffwechsel	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
284	VSIRNSVHI	28	15,01	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	25	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
285	VSSTNLDRL	29	0,22	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	25	unbekannt	unbekannt	In beiden Lebensformen
286	VVDKNWEYL	25	0,00	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote

287	VWNVAGECM	15	0,20	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
288	WGQTNAEKL	26	0,00	1	-	P type H ATPase putative <i>L. major</i>	18	Ionentransport	Membran	In beiden Lebensformen
289	WMLRNIVTF	26	0,42	1	-	vacuolar ATP synthase catalytic subunit a putative <i>L. major</i>	34	Ionentransport	Membran	In beiden Lebensformen
290	YADENGDAI	27	0,81	1	-	peroxidoxin trypanredoxin peroxidase <i>L. major</i>	23	Elektronentransport	Mitochondrien	In beiden Lebensformen
291	YAGENYENL	28	0,34	1	-	hypothetical protein conserved <i>L. major</i>	22	unbekannt	unbekannt	Amastigote
292	YASENVNKI	25	0,22	1	-	small GTP binding protein Rab1 putative <i>L. major</i> strain Friedlin		Intrazellulärer Proteintransport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
293	YDYLFKLL	26	0,10	-	1	small GTP binding protein Rab1 putative <i>L. major</i> strain Friedlin	27	Intrazellulärer Proteintransport	Zytoplasma	In beiden Lebensformen

294	YGLPNHRLE	15	0,00	1	-	activated protein kinase c receptor LACK guanine nucleotide binding protein beta subunit like protein	28	Translation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle	Zytoplasma	In beiden Lebensformen
295	YGNGLITL	28	0,00	1	-	metallo peptidase Clan ME Family M16 peptidase putative <i>L. major</i>	31	Proteolyse	Zytoplasma	Promastigote
296	YKPVNVDTI	29	0,51	1	-	UDP galactopyranose mutase <i>L. major</i>	18	Signaltransduktion	Zytoplasma / Mitochondrien	Promastigote
297	YLVENTSHL	26	0,41	1	-	protein kinase putative <i>L. major</i>	15	Stoffwechsel	Zytoplasma / Mitochondrien	Amastigote
298	YLYLFCLE	26	0,10	-	1	fatty acid elongase putative <i>L. major</i>	14	Stoffwechsel	Endoplasmatisches Retikulum	In beiden Lebensformen
299	YMYTNLACI	25	0,85	1	-	vacuolar ATP synthase subunit B putative <i>L. major</i>	28	Ionentransport	Membran	In beiden Lebensformen
300	YQFMNFESL	25	0,61	1	-	hypothetical protein L30207 <i>L. major</i> strain Friedlin	4	unbekannt	unbekannt	Amastigote

III LITERATURVERZEICHNIS

- 1 | Adorini, L., Appella, E., Doria, G., and Nagy, Z. A.: "Mechanisms influencing the Immunodominance of T cell determinants", *Journal of Experimental Medicine*, 1988, Vol. 68: 2091-2104
- 2 | Anderson, C. F., Stumhofer, J. S., Hunter, C. A., and Sacks, D.: "IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4⁺ T Cells in Nonhealing *Leishmania major* Infection", *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 4619 – 4627
- 3 | Antonelli, L. R. V., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho E. M., Gollob, K. J.: "Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis", 2005, *Immunology Letters*, 101: 226–230
- 4 | Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. and Sacks, D.: "Natural Model of *Leishmania major* Infection Reveals a Prolonged "Silent" Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity", *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 969–977
- 5 | Belkaid, Y., von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C., and Sacks, D.: "CD8⁺ T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following low-dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*", *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 3992–4000
- 6 | Bertholet, S., Debrabant, A., Afrin, F., Caler, E., Mendez, S., Tabbara, K. S., Belkaid, Y., and Sacks, D. L.: "Antigen Requirements for Efficient Priming of CD8⁺ T Cells by *Leishmania major*-Infected Dendritic Cells", *Infect. Immun.*, 2005, 73(10): 6620
- 7 | Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gummy, A., Egeter, O., Sakrauski, A. K., Seegmüller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A. D., Wagner, H., Heeg, K., Louis, J. A., & Röcken, M.: "IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice, 2001, *Nature Immunology*, Vol. 2, 11, 1054-1060
- 8 | Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M., Moll, H.: "Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*", *J Infect Dis.*, 1993 Feb; 167(2): 418-25
- 9 | Bottrel, R. L. A., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R., and Gollob, K. J.: "Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble *Leishmania* Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis", 2001, *Infection and Immunity*, Vol. 69, 5: 3232–3239

-
- 10 | Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostböck, S., und Ritter, U.: „Priming of CD8⁺ and CD4⁺ T Cells in Experimental Leishmaniasis Is Initiated by Different Dendritic Cell Subtypes“, *J Immunol*, 2009; 182: 774-783
 - 11 | Busch, D. H. und Pamer, E. G.: “MHC Class I/Peptide Stability: Implications for Immunodominance, In Vitro Proliferation, and Diversity of Responding CTL“, *J Immunol*, 1998; 160: 4441-4448
 - 12 | Caver TE, Lockey TD, Srinivas RV, Webster RG, Hurwitz JL: “A novel vaccine regimen utilizing DNA, vaccinia virus and protein immunizations for HIV-1 envelope presentation“, *Vaccine*, 1999, 17(11-12): 1567-72
 - 13 | Chatelain, R., Varkila, K., and Coffman, R. L.: “IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice“, 1992, *J. Immunol.*, 148:1182-1187
 - 14 | Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, and C. V. Harding: “CpG Oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity“, 1997, *J. Exp. Med.* 186:1623.
 - 15 | Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J. and Krieg, A. M.: “CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen“, *J. Immunol.*, 1998, 160: 870
 - 16 | De Luca, P. M., Mayrinkc, W., Alves, C. R., Coutinho, S. G., Oliveira, M. P., Bertho, A. L., Toledo, V. P., Costa, C. A., Genaroc, O., Mendonc, S. C. F.: “Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis“, 1999, *Vaccine*, 17: 1179-1185
 - 17 | den Haan, J. M. M., Lehar, S. M., und Bevan, M. J.: "CD8⁺ but Not CD8⁻ Dendritic Cells Cross-prime Cytotoxic T Cells In Vivo", *J. Exp. Med.*, 2000, The Rockefeller University Press, Volume 192, Nr. 12, 1685–1695
 - 18 | Dissertation Sven Brosch: “Studying MHC I-dependent CD8⁺ T cell responses in the model of murine cutaneous leishmaniasis“, 2010
 - 19 | Dissertation Beatrix Grewe: “*In silico* Vorhersage von CD8⁺ T-Zellepitopen aus dem gesamten *Leishmania major* Genom“, 2011
 - 20 | Draenert, R., Altfeld, M., Brander, C., Basgoz, N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Stone, D. R., Kalams, S. A., Trocha, A., Addo, M. M., Goulder, P. J. R., Walker, B. D.: „ Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses“, *Journal of Immunological Methods*, 2003, 275: 19-29

-
- 21 | Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R.: "Ex Vivo Profiling of CD8⁺-T-Cell Responses to Human Cytomegalovirus Reveals Broad and Multispecific Reactivities in Healthy Virus Carriers", 2003, *Journal of Virology*, Vol. 77, 9: 5226–5240
- 22 | Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., Rammensee, H. G.: "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules", *Nature*, 1991, 351(6324): 290-6
- 23 | Greenblatt, C. L., Spira, D. T., Montilio, B., Gerichter, H.: "An improved protocol for the preparation of a frozen promastigote vaccine for cutaneous leishmaniasis", *J Biol Stand.*, 1980, 8(3):227-32
- 24 | Gentil, F., Bargieri, D. Y., Leite, J. A., Françoso, K. S., Patricio, M. B. M., Espíndola, N. M., Vaz, A. J., Palatnik-de-Sousa, C. B., Rodrigues, M. M., Costa, F. T. M., Soares, I. S.: "A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice", 2010, *Vaccine*, 28: 6183-6190
- 25 | Griewank, K., Gazeau, C., Eichhorn, A., and von Stebut, E.: „Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, Vol. 54, Nr. 2: 652-659
- 26 | Guerfali, F. Z., Ben-Abdallah, H., Sghaier, R. M., Ben-Aissa, K., Mkannez, G., Attia, H., Laouini, D.: "An *in silico* immunological approach for prediction of CD8⁺ T cell epitopes of *Leishmania major* proteins in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 murine models of infection", 2009, *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 344–350
- 27 | Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N., and Seder, R. A.: "Vaccination with DNA Encoding the Immunodominant LACK Parasite Antigen Confers Protective Immunity to Mice Infected with *Leishmania major*", *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, Volume 186, Nr. 7, 1137–1147
- 28 | Gurunathan, S., Prussin, C., Sacks, D. L. & Seder, R. A.: "Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection", *Nature Medicine*, 1998, Vol. 4, Nr. 12
- 29 | Gurunathan, S., Stobie, L., Prussin, C., Sacks, D. L., Glaichenhaus, N., Fowell, D. J., Locksley, R. M., Chang, J. T., Wu, C., and Seder, R. A.: "Requirements for the Maintenance of Th1 Immunity *In Vivo* Following DNA Vaccination: A Potential Immunoregulatory Role for CD8⁺ T Cells", *J. Immunol.*, 2000, 165, 915-924

-
- 30 | Handman, E.: "Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development", *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, S. 229–243
- 31 | Harndahl, M., Rasmussen, M., Roder, G., Buus, S.: "Real-time, high-throughput measurements of peptide–MHC-I dissociation using a scintillation proximity assay", *Journal of Immunological Methods*, 2011, 374: 5–12
- 32 | Herath, S., Kropf, P. & Müller, I.: "Cross-talk between CD8⁺ and CD4⁺ T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8⁺ T cells are required for optimal IFN γ production by CD4⁺ T cells", *Parasite Immunology*, 2003, 25: 559 – 567
- 33 | Herrera-Najera, C., Piña-Aguilar, R., Xacur-Garcia, F., Ramirez-Sierra, M. J., and Dumonteil, E.: "Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates", 2009, *Proteomics*, 9: 1293–1301
- 34 | Himmelrich, H., Launois, P., Maillard, I., Biedermann, T., Tacchini-Cottier, F., Locksley, R. M., Röcken, M., and Louis, J. A.: "In BALB/c Mice, IL-4 Production During the Initial Phase of Infection with *Leishmania major* Is Necessary and Sufficient to Instruct Th2 Cell Development Resulting in progressive Disease", *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 4819–4825
- 35 | Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M. R., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O’Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B., Myler, P. J.: "The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*", *Science*, 2005, Vol. 309: 436-442
- 36 | Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C., and Vogel, J. C.: "Activation of Cutaneous Dendritic Cells by CpG-Containing Oligodeoxynucleotides: A Role for Dendritic Cells in the Augmentation of Th1 Responses by Immunostimulatory DNA", 1998, *The Journal of Immunology*, 161: 3042–3049

-
- 37 | Jordan, K. A., Hunter, C. A.: "Regulation of CD8⁺ T cell responses to infection with parasitic protozoa", 2010, *Experimental Parasitology*, 126: 318-325
- 38 | Julia, V., Rassoulzadegan, M., Glaichenhaus, N.: "Resistance to *Leishmania major* Induced by Tolerance to a Single Antigen", *Science*, Vol. 274, 1996, 421-423
- 39 | Kedzierska, K., Curtis, J. M., Valkenburg, S. A., Hatton, L. A., Kiu, H., Doherty, P. C., Lukasz Kedzierski, L.: "Induction of Protective CD4⁺ T Cell-Mediated Immunity by a *Leishmania* Peptide Delivered in Recombinant Influenza Viruses", 2012, *PLoS ONE*, Vol. 7, 3: 1-10
- 40 | Kellina, O.I., Passova, O. M., Alekseev, A. N.: "Experimental proof of the heterogeneous composition of natural *Leishmania major* populations for the virulence trait", *Med Parazitol (Mosk.)*, 1981, 50(6):4-11
- 41 | Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H.-D., Volkmer-Engert, R., and Kern, F.: „ Analysis of Antigen-Specific T-Cell Responses With Synthetic Peptides - What Kind of Peptide for Which Purpose?", *Human Immunology*, 2004, 65: 523-536
- 42 | Kloetzel, P.-M.: "Antigen Processing by the Proteasome", *Nature Reviews*, 2001, Vol. 2: 179-187
- 43 | Kloetzel, P. M.: "Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII", *Nat. Immunol.*, 2004, S. 661-669
- 44 | Kronenberg, K., Brosch, S., Butsch, F., Tada, Y., Shibagaki, N., Udey, M. C. und von Stebut, E.: "Vaccination with TAT-Antigen Fusion Protein Induces Protective, CD8⁺ T Cell-Mediated Immunity Against *Leishmania Major*", *Journal of Investigative Dermatology*, 2010, S. 1-9
- 45 | Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W.: "Generation and Analysis of Interleukin-4 Deficient Mice", *Science*, 1991, Vol. 254, S. 707-710
- 46 | Launois, P., Pingel, S., Himmelrich, H., Locksley, R., Louis, J.: "Different epitopes of the LACK protein are recognized by V β 4 V α 8 CD4⁺ T cells in H-2^b and H-2^d mice susceptible to *Leishmania major* ", 2007, *Microbes and Infection*, 9: 1260-1266
- 47 | Lima H. C., Bleyenbergh J. A. und Titus R.G.: "A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals", *Parasitology Today*, 1997, Vol. 13, Nr. 2
- 48 | Limberis, M. P., Bell, C. L. and Wilson, J. M.: "Identification of the murine firefly luciferase-specific CD8 T-cell epitopes", 2009, *Gene Therapy*, 16: 441-447

-
- 49 | Lockey TD, Slobod KS, Caver TE, D'Costa S, Owens RJ, McClure HM, Compans RW, Hurwitz JL: "Multi-envelope HIV vaccine safety and immunogenicity in small animals and chimpanzees", *Immunol Res.*, 2000, 21(1): 7-21
- 50 | Locksley, R. M., Heinzl, F. P., Fankhauser, J. E., Nelson, C. S., und Sadick, M. D.: "Cutaneous Host Defense in Leishmaniasis: Interaction of Isolated Dermal Macrophages and Epidermal Langerhans Cells with the Insect-Stage Promastigote", *Infection and Immunity*, 1988, Vol. 56, Nr. 2, S. 336-342
- 51 | Mauël, J.: "Vaccination Against Leishmania Infections", *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2002, 2, 201-226
- 52 | Mojtahedi, Z., Clos, J., Kamali-Sarvestani, E.: "Leishmania major: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes", *Experimental Parasitology*, 2008, 119, 422-429
- 53 | Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A. E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z.-E., Waldmann, R., Locksley, R. M., Glaichenhaus, N.: "Expression Cloning of a Protective Leishmania Antigen", *Science*, 1995, Vol. 268, 563-566
- 54 | Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G.: "Advances in Leishmaniasis", *Lancet*, 2005, 366: 1561-77
- 55 | Müller, I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J., und Milon, G.: "Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells", *International Immunology*, 1991, Vol. 3, Nr. 6, S. 587-597
- 56 | Nabors, G. S., Afonso, L. C. C., Farrell J. P., und Scott, P.: "Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Immunology*, 1995, Vol. 92, S. 3142-3146
- 57 | Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidruni, G., Ghorbani, M.: "Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis", *Bull Soc Pathol Exot Filiales.*, 1983, 76(4): 377-83
- 58 | New Science Press 2007, Kapitel 4: „Adaptive Immunity and the Detection of Infection by T Lymphocytes“, S. 8
- 59 | Okwor, I., Liu, D., Uzonna, J.: "Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis", *Vaccine*, 27, (2009), 2554-2562

-
- 60 | Pagán, A. J., Peters, N. C., Debrabant, A., Ribeiro-Gomes, F., Pepper, M., Karp, C. L., Jenkins, M. K., and Sacks, D. L.: "Tracking antigen-specific CD4⁺ T cells throughout the course of chronic *Leishmania major* infection in resistant mice", 2012, *Eur. J. Immunol.*, 43: 1–12
- 61 | Pamer, E. G.: „Immune Responses to *Listeria Monocytogenes*“, *Nature Review*, 2004, Vol. 4, 812-823
- 62 | Parker, K. C., Bednarek, M. A., und Coligan, J. E.: "Scheme for Ranking Potential HLA-A2 Binding Peptides Based on Independent Binding of Individual Peptide Side-Chains", *Journal of Immunology*, 1994, 152: 163-175
- 63 | Pelte, C., Cherepnev, G., Wang, Y., Schoenemann, C., Volk, H.-D., and Kern, F.: "Random Screening of Proteins for HLA-A*0201-Binding Nine-Amino Acid Peptides Is Not Sufficient for Identifying CD8 T Cell Epitopes Recognized in the Context of HLA-A*02011", 2004, *The Journal of Immunology*, 172: 6783–6789
- 64 | Peters, N. C., Kimblin, N., Secundino, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Sacks, D. L.: "Vector Transmission of *Leishmania* Abrogates Vaccine-Induced Protective Immunity", *PLoS Pathogens*, 2009, Volume 5, Issue 6
- 65 | Peters, N. C., Bertholet, S., Lawyer, P. G., Charmoy, M., Romano, A., Ribeiro-Gomes, F.L., Stamper, L. W., and Sacks, D. L.: "Evaluation of Recombinant *Leishmania* Polyprotein Plus Glucopyranosyl Lipid A Stable Emulsion Vaccines against Sand Fly-Transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 Mice", 2012, *The Journal of Immunology*, 189: 4832–4841
- 66 | Pompeu, M. M. L., Brodskyn, C., Teixeira, M. J., Clarencio, J., Van Weyenberg, J., Coelho, I. C. B., Cardoso, S. A., Barral, A., and Barral-Netto, M.: "Differences in Gamma Interferon Production *In Vitro* Predict the Pace of the *In Vivo* Response to *Leishmania amazonensis* in Healthy Volunteers", 2001, *Infection and Immunity*, Vol. 69, 12: 7453–7460
- 67 | Qudaihi, G. A., Lehe, C., Dickinson, A., Eltayeb, K., Rasheed, W., Chaudhri, N., Aljurf, M., Dermimea, S.: "Identification of a novel peptide derived from the M-phase phosphoprotein 11 (MPP11) leukemic antigen recognized by human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes", 2010, *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 3, 1: 24-33
- 68 | Ramírez, L., Santos, D. M., Souza, A. P., Coelho, E. A. F., Barral, A., Alonso, C., Escutia, M. R., Bonay, P., de Oliveira, C. I., Soto, M.: "Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous", 2013, *Vaccine*

-
- 69 | Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N. P. N., Bachor, O. A., Stevanović, S.: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs", *Immunogenetics*, 1999, 50: 213–219
- 70 | Reiner, S. L. und Locksley, R. M.: "Cytokines in the Differentiation of Th1/Th2 CD4⁺ subsets in Leishmaniasis", *Journal of Cellular Biochemistry.*, 1993, Vol. 53: 323-328
- 71 | Reiner, S. L. und Locksley, R. M.: "The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*", *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, 13: 151-77
- 72 | Richmond JF, Mustafa F, Lu S, Santoro JC, Weng J, O'Connell M, Fenyö EM, Hurwitz JL, Montefiori DC, Robinson HL: "Screening of HIV-1 Env glycoproteins for the ability to raise neutralizing antibody using DNA immunization and recombinant vaccinia virus boosting", *Virology*, 1997, 230(2): 265-74
- 73 | Sacks, D. und Noben-Trauth, N.: "The Immunology of Susceptibility and Resistance to *Leishmania Major* in Mice", *Nature Reviews, Immunology*, 2002, Vol. 2, 845-858
- 74 | Sadick, M. D., Heinzl, F. P., Holaday, B. J., Pu, R. T., Dawkins, R. S., and Locksley R. M.: "Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism", 1990, *J. Exp. Med.* 171:115-127
- 75 | Sato, K. und Fujita, S.: "Dendritic Cells-Nature and Classification", *Allergology International.*, 2007, 56:183-191
- 76 | Schmidt, H., and Peter, F. M.: „Advances in the therapeutics of antimony“, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 1938
- 77 | Scott, P., Artis, D., Uzonna, J., Zaph, C.: "The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development", *Immunological Reviews*, 2004, Vol. 201: 318–338
- 78 | Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., und Klenk, D. C.: "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid", *Analytical Biochemistry*, 1985, 19, 76-85
- 79 | Trost, B., Bickis, M., and Kusalik, A.: "Strength in numbers: achieving greater accuracy in MHC-I binding prediction by combining the results from multiple prediction tools", *Immunome Research*, 2007, 3:5

-
- 80 | van der Burg, S. H., Visseren, M. J. W., Brandt, R. M. P., Kast, W. M., und Melief, C. J. M.: "Immunogenicity of Peptides Bound to MHC Class I Molecules Depends on the MHC-Peptide Complex Stability", *Journal of Immunology*, 1996, 156: 3308-3314
- 81 | Vanloubbeeck, Y. und Jones, D. E.: "The Immunology of *Leishmania* Infection and the Implications for Vaccine Development", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2004, 1026: 267-272
- 82 | von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., und Udey, M. C.: "Uptake of *Leishmania major* Amastigotes Results in Activation and Interleukin 12 Release from Murine Skin-derived Dendritic Cells: Implications for the Initiation of Anti-*Leishmania* Immunity", *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, Vol. 188, Nr. 8, 1547-1552
- 83 | von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B. V., Cushing, M., Sacks, D. L. und Udey, M. C.: "*Leishmania major*-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis", *Eur. J. Immunol.*, 2000, 30: 3498-3506
- 84 | von Stebut, E.: "Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity", *Eur J Dermatol*, 2007; 17 (2): 115-122
- 85 | von Stebut, E. und Sunderkötter, C.: "Kutane Leishmaniasis", *Hautarzt* 2007, Springer-Verlag 2007
- 86 | von Stebut E., Schleicher U., Bogdan C.: „Kutane Leishmaniasis als Reise-dermatose“, *Hautarzt* 2012, Springer-Verlag 2012
- 87 | Woelbing, F., Lopez Kostka, S., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C., und von Stebut, E.: "Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity", *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, Vol. 203, Nr. 1, 177-188
- 88 | Wen, J.-S., Jiang, L. F., Zhou, J.-M., Yan, H.-J., Fang, D.-Y.: "Computational prediction and identification of dengue virus-specific CD4⁺ T-cell epitopes", *Virus Research*, 2008, 132: 42-48
- 89 | Wen, J., Duan, Z., and Jiang, L.: "Identification of a Dengue Virus-Specific HLA-A*0201-Restricted CD8⁺ T Cell Epitope", *Journal of Medical Virology*, 2010, 82: 642-648

90 | Wu, W., Weigand, L., Belkaid, Y., and Mendez, S.: “Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides”, *Eur. J. Immunol.*, 2006, 36: 3238–3247

91 | www.who.com

IV DANKSAGUNG

V FÖRDERUNG

VI PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen

- 1 | Michael R. Fischer, Dominik John, Kordula Kautz-Neu, Anja I. Schermann, Kirsten Schwonberg, and Esther von Stebut: "Animal Model for Cutaneous Leishmaniasis", 2013, *Molecular Dermatology: Methods in Molecular Biology*, Vol. 961: 389-402
- 2 | Kordula Kautz-Neu, Kirsten Schwonberg, Anja Schermann, Michael Fischer und Esther von Stebut: "Dendritic cells in *Leishmania major* infections: Mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance", *Med. Microbiol. Immunol*, 2012, Review
- 3 | K. Schwonberg, S. Brosch, G. van Zandbergen, B. Grewe, M. N. Harndahl, S. Buus, H. Schild, S. Tenzer und E. von Stebut: "CD8⁺ T cell epitopes: a new source for vaccination against cutaneous *Leishmania major* infections", *Immunology*, 2012, 137 (Suppl. 1), 185-772
- 4 | Kirsten Schwonberg, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: "*Leishmania major*-specific epitopes: Identification by *in vitro* and *in vivo* analysis", Abstract, *JDDG*, 2012, 21, 3: e37-e38
- 5 | Schwonberg, K, Brosch, S, van Zandbergen, G, Grewe, B, Schild, H, Tenzer, S, and von Stebut, E: "Identification of *Leishmania major*-specific CD8⁺ T cell epitopes using *in vitro* and *in vivo* analysis", Abstract, *JDDG*, 2011, 9: e2-e3
- 6 | Brosch S, Schwonberg K, van Zandbergen K, Grewe B, Harndahl MN, Buus S, Schild H, Tenzer S, von Stebut E: "Characterization of *Leishmania*-derived CD8⁺ T cell epitopes by a combination of proteome analysis, epitope prediction followed by *in vitro* and subsequent *in vivo* analysis", Abstract, *Exp Dermatol* 2011, 20: 190

Vorträge

- 1 | Kirsten Schwonberg, Daniel Deibel, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: "Identification strategy for peptides as possible vaccines against cutaneous *Leishmania major* infections". 16th Woods Hole Immunoparasitology Meeting (WHIP), MBL Woods Hole, 12. –25. April 2012, MA, USA
- 2 | Schwonberg K, Brosch S, van Zandbergen G, Grewe B, Harndahl MN, Buus S, Schild H, Tenzer S, von Stebut E: "A combination of *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods for prediction of epitopes recognized by CD8⁺ T cells from *Leishmania major*-infected mice". 15. Symposium Infektion und Immunabwehr, Burg Rothenfels, 10. –12. März 2011, Rothenfels, Deutschland

Abstracts und Poster

- 1 | Kirsten Schwonberg, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: „CD8⁺ T cell epitopes: a new source for vaccination against cutaneous *Leishmania major* infections“. European Congress of Immunology (ECI) 2012, 05. –08.09.2012, Glasgow, Schottland
- 2 | Kirsten Schwonberg, Daniel Deibel, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: "Identification strategy for peptides as possible vaccines against cutaneous *Leishmania major* infections". 16th Woods Hole Immunoparasitology Meeting (WHIP), MBL Woods Hole, 22. –25. April 2012, MA, USA
- 3 | Kirsten Schwonberg, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: "*Leishmania major*-specific epitopes: Identification by *in vitro* and *in vivo* analysis". Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 01.–03. März 2012, Marburg, Deutschland

-
- 4 | Kirsten Schwonberg, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Mikkel Nors Harndahl, Søren Buus, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: "Identification of *Leishmania major* peptides as possible vaccine-candidates by *in silico* followed by *in vitro* and *in vivo* analysis". 1. ADF Winter School, 26. –28.01.2012, Zugspitze, Deutschland
 - 5 | Schwonberg, K, Brosch, S, van Zandbergen, G, Grewe, B, Schild, H, Tenzer, S, and von Stebut, E: "Identification of *Leishmania major*-specific CD8⁺ T cell epitopes using *in vitro* and *in vivo* analysis". Arbeitsgemeinschaft dermatologische Infektiologie und Tropendermatologie (ADI-TD), 30.09. –01.10.2011, Mainz, Deutschland
 - 6 | Schwonberg K, Brosch S, van Zandbergen G, Grewe B, Harndahl MN, Buus S, Schild H, Tenzer S, von Stebut E: "Identification of *Leishmania major*-specific epitopes recognized by CD8⁺ C57BL/6 T cells". 15th Woods Hole Immunoparasitology Meeting (WHIP), MBL Woods Hole, 17. –20. April 2011, MA, USA
 - 7 | Brosch S, Schwonberg K, van Zandbergen K, Grewe B, Harndahl MN, Buus S, Schild H, Tenzer S, von Stebut E: "Characterization of *Leishmania*-derived CD8⁺ T cell epitopes by a combination of proteome analysis, epitope prediction followed by *in vitro* and subsequent *in vivo* analysis". Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 17. –19. Februar 2011, Tübingen, Deutschland
 - 8 | Kirsten Schwonberg, Sven Brosch, Ger van Zandbergen, Beatrix Grewe, Mikkel Nors Harndahl, Søren Buus, Hansjörg Schild, Stefan Tenzer, and Esther von Stebut: „Identification of *Leishmania*-derived CD8⁺ T cell peptides by epitope prediction and *in vitro* and subsequent *in vivo* analysis“. Arbeitsgemeinschaft dermatologische Infektiologie und Tropendermatologie (ADI-TD), 22. –23. Oktober 2010, Münster, Deutschland

VII CURRICULUM VITAE