

**Identifikation und Charakterisierung  
immunogener *Leishmania major*-spezifischer Proteine  
als potentielle Vakzinkandidaten gegen  
die kutane Leishmaniasis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Anja Ingrid Schermann**

geboren am 27.03.1984 in Mainz

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2015



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und mit keinen anderen als den darin angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Die wörtlich oder sinngemäß aus fremden Arbeiten entnommenen Stellen und bildlichen Darstellungen sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht in gleicher oder anderer Form an irgendeiner Stelle als Dissertation vorgelegt worden ist.

---

Anja Schermann

Mainz, den

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1. Leishmaniasis .....	5
2.2. Der Lebenszyklus der <i>Leishmania major</i> Parasiten .....	8
2.3. Experimentelle murine kutane Leishmaniasis (CL) .....	9
2.3.1. Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und Evasionsmechanismen der Leishmanien .....	9
2.3.2. T-Zell-Immunantworten – Die Rolle von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	11
2.3.3. Experimentelle Mauseinfektion .....	14
2.3.4. Relevanz für die humane kutane Leishmaniasis .....	16
2.4. Behandlung und Ansätze zur Prävention von Leishmaniasis .....	18
2.4.1. Vakzinierungsstrategien – Warum es noch keine Vakzine gibt .....	18
2.4.2. Lösliches <i>Leishmania</i> Antigen (SLA) .....	21
2.5. Ziel der Arbeit .....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1. Reaktives Potential von SLA-Komponenten <i>in vitro</i> .....	23
3.2. Dosis- und Adjuvanz-abhängiger protektiver Effekt von SP <i>in vivo</i> .....	26
3.2.1. Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit SP <i>in vivo</i> und Parasitenlasten.....	26
3.3. Die Immunisierung mit SP + CpG induziert T-Zellaktivität in C57BL/6 Mäusen.....	30
3.4. Auftrennung der SP mittels DEAE-Säule .....	32
3.4.1. Reaktive DEAE-Fraktionen induzieren die Th1/Tc1-spezifische IFN $\gamma$ - Produktion <i>in vitro</i> .....	32
3.4.2. Nukleinsäuren haben keinen Einfluss auf das reaktive Potential der SP- Proben <i>in vitro</i> .....	34
3.4.3. Fraktions-spezifische Induktion der T-Zell-Proliferation und intrazellulären Zytokin-Produktion <i>in vitro</i> .....	36
3.5. Auftrennung von Fraktionspools mittels MonoQ 5/50 GL-Säule .....	38
3.5.1. Residuale reaktive Eigenschaften einzelner MonoQ-Fraktionen <i>in vitro</i> .....	38
3.6. Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteinfractionen .....	40
3.6.1. Identifikation <i>L. major</i> -spezifischer Proteine in reaktiven Fraktionen .....	41
3.7. Proteintargets als potentielle Vakzinkandidaten .....	43
3.7.1. Rekombinante Expression ausgewählter <i>L. major</i> -spezifischer Proteine .....	43
3.7.2. Protein-spezifisches reaktives Potential <i>in vitro</i> .....	46
3.7.3. Schutz vor <i>L. major</i> Infektion - Protein C als potentieller Vakzinkandidat .....	51
3.7.4. Parasitenlasten in immunisierten, infizierten C57BL/6 Mäusen .....	53

3.7.5.	Intrazellulärer T-bet- und IFN $\gamma$ -Nachweis in Ohr und dLK immunisierter C57BL/6 Mäuse .....	55
3.8.	Protein-Immunisierung und <i>L. major</i> Infektion von BALB/c Mäusen .....	60
3.9.	BLAST-Analyse ausgewählter Proteinkandidaten aus <i>L. major</i> .....	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1.	SLA als Pool verschiedener immunogener Komponenten .....	63
4.2.	Dosis- und Adjuvanz-abhängiger protektiver Effekt der SP <i>in vivo</i> .....	66
4.3.	Immunisierung mit SP und CpG ODN als Adjuvanz induziert T-Zellaktivität <i>in vivo</i> .....	70
4.4.	Reaktives Potential einzelner SP-Fraktionen .....	71
4.5.	Identifikation <i>L. major</i> -spezifischer Proteine mittels Massenspektrometrie .....	73
4.5.1.	Herstellung rekombinanter Proteinkandidaten .....	76
4.5.2.	Charakterisierung der Proteintargets <i>in vitro</i> .....	76
4.6.	Proteintargets als potentielle Vakzinkandidaten.....	77
4.7.	Ausblick .....	82
<b>5.</b>	<b>Materialien und Geräte .....</b>	<b>84</b>
5.1.	Parasiten .....	84
5.2.	Tiere .....	84
5.3.	Antikörper .....	84
5.4.	Verwendete Kits .....	85
5.5.	Puffer und Verbrauchslösungen.....	85
5.6.	Rekombinante <i>L. major</i> -spezifische Proteine .....	88
5.7.	Reagenzien und Chemikalien .....	88
5.8.	Verbrauchsmaterialien .....	91
5.9.	Geräte .....	93
<b>6.</b>	<b>Experimentelle Methoden .....</b>	<b>95</b>
6.1.	Tierversuche und -haltung .....	95
6.2.	Zellbiologische Methoden .....	95
6.2.1.	Kultivierung von <i>L. major</i> Promastigoten.....	95
6.2.2.	Isolation von metazyklischen <i>L. major</i> Promastigoten.....	95
6.2.3.	Herstellung von löslichem Leishmanien Antigen (SLA) .....	96
6.2.4.	Intradermale Infektion von Mäusen.....	97
6.2.5.	Isolation von <i>L. major</i> Amastigoten aus BALB/c Mäusen .....	97
6.2.6.	Intradermale Immunisierung von Mäusen .....	98
6.2.7.	Messung und Berechnung der Läsionsentwicklung .....	99
6.2.8.	Isolation von Lymphknotenzellen und Herstellung von Zellsuspensionen .....	99
6.2.9.	Ermittlung der Lebendzellzahl.....	99
6.2.10.	Bestimmung von Parasitenlasten in Ohr und Milz .....	100
6.2.11.	Zellgewinnung aus der Ohrdermis .....	101
6.2.12.	Restimulation von drainierenden Lymphknotenzellen .....	101
6.2.13.	Proliferationsnachweis von T-Zellen mittels CFSE.....	102
6.2.14.	Herstellung rekombinanter <i>L. major</i> -spezifischer Proteine .....	102
6.3.	Biochemische Methoden.....	103
6.3.1.	Differentielle Zentrifugation von löslichem <i>Leishmania</i> Antigen (SLA).....	103
6.3.2.	Chromatographische Fraktionierung von SP.....	104

---

6.3.3.	Dialyse der Proteinfraktionspools.....	106
6.3.4.	Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteinfraktionen.....	106
6.3.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay .....	107
6.3.6.	DNA/RNA-Verdau durch Benzoyl-DNAse Nuklease.....	107
6.3.7.	Agarose-Gelelektrophorese .....	108
6.4.	Immunologische Methoden.....	109
6.4.1.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	109
6.4.2.	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS).....	109
6.5.	Auswertung - Statistische Analyse und Software .....	112
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>113</b>
7.1.	Aminosäuresequenzen aller detektierten Proteine in reaktiven MonoQ-Frak-tionen aus SLA .....	113
7.2.	Aminosäuresequenzen der rekombinant exprimierten Proteinkandidaten:.....	119
7.3.	Informationen zu den detektierten Proteinen aus <i>L. major</i> -Lysat.....	120
7.4.	BLAST-Analyse ausgewählter Proteinkandidaten aus <i>L. major</i> .....	122
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>128</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>147</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen und Präsentationen</b> .....	<b>148</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>151</b>

**Abkürzungen**

1x	einfach, einmal
2x	zweifach, zweimal
3x	dreifach, dreimal
10x	zehnfach
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
Ø	unstimuliert
+	in Anwesenheit, mit, positiv
-	in Abwesenheit, ohne, negativ, gegen den Uhrzeigersinn
$\alpha$	anti, alpha
A	area, Feld
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> , erworbenes Immundefektsyndrom
aLm	<i>Leishmania major</i> Amastigote(n)
ALM	autoklavierte <i>Leishmania major</i> Parasiten
APC	Allophycocyanin, <i>antigen presenting cell(s)</i> , Antigen-präsentierende Zelle(n)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
$\beta$	beta
b	Breite
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cell(s)</i> , aus Knochenmark generierte dendritische Zelle(n)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Komplementfaktor
°C	Grad Celsius

CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region(s)</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
CL	<i>cutaneous leishmaniasis</i> , kutane Leishmaniasis
Cl <sup>-</sup>	Chloridion(en)
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	Cathepsin-L- <i>like</i> -Cysteinproteinase
CpG	Cytosin-Guanin-Nukleotide
CR	<i>complement receptor(s)</i> , Komplementrezeptor(en)
Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Kupferion(en)
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d	<i>day(s)</i> , Tag(e); Dicke
DC	<i>dendritic cell(s)</i> , Dendritische Zelle(n)
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dLK	drainierende Lymphknoten
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DTH	delayed-type hypersensitivity, Hypersensitivität vom verspäteten Typ
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii, et aliae, et alia</i> , und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
Fc	<i>fragment, crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
fmol	femtomol
Foxp	<i>forkhead box protein</i>

FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Fr.	Fraktion
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
$\gamma$	gamma
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $1\ g = 9,80665\ \text{m/s}^2$ )
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
gp	Glykoprotein(e)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
H	Histon; <i>hight</i> , Höhe; Hamster
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
His	Histidin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Hsp	<i>heat shock protein(s)</i> , Hitzeschockprotein(e)
HSV	Herpes-simplex-Virus
i.d.	intradermal
IFA	<i>incomplete Freund's adjuvant</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inf	infiziert
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Iono	Ionomycin
JEV	Japanisches Enzephalitis Virus
kDa	Kilodalton
l	Liter; Länge
L	Ligand
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LACK	<i>Leishmania homologue for receptor of activated kinase C</i>
LeIF	<i>Leishmania</i> -Elongations- und Initiationsfaktor
Lip	Liposomen

LmSTI	<i>Leishmania major</i> homologue of the eukaryotic stress-inducible protein
LST	<i>leishmanin skin test</i> , Leishmanin Hauttest
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
<i>m</i>	Ionenmasse
M	molar, (Gewebe-)Makrophage(n)
MAF	Makrophagen-aktivierenden Faktor(en)
mAU	<i>milli absorption unit(s)</i> , Milliabsorptionseinheit(en)
MC	<i>mast cell(s)</i> , Mastzelle(n)
MCL	mukokutane Leishmaniasis
MCMV	muriner Zytomegalievirus
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion(en)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mM	millimolar
MPL-SE	Monophosphoryl-Lipid A plus Squalen
MR	Mannose-Rezeptor(en)
MST	<i>Montenegro skin test</i> , Montenegro Hauttest
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MW	Mittelwert
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
n	Stoffmenge
n.b.	nicht bekannt
Na <sup>+</sup>	Natriumion(en)
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
nT <sub>reg</sub>	natürliche regulatorische T-Zelle(n)
ODN	Oligodeoxynukleotid(e)
OVA	Ovalbumin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell(s)</i> , mononukleären Zelle(n) des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle(n)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PES	Polyester
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKDL	Post-Kala-Azar dermale Leishmaniasis
PMA	Phorbolmyristatactat
PMN	Polymorphonukleäre Neutrophile
Φ	Phi
p.i.	<i>post-infection</i> , nach Infektion
PI	Propidiumiodid
pLm	<i>Leishmania major</i> Promastigote(n)
PKDL	Post-Kala-Azar dermale Leishmaniasis
PP	Polypropylen
Pr.	Promastigote(n); Protein(e)
Prof.	Professor
PS	Polystyrol, Phosphatidylserin
PSA	<i>promastigote surface protein</i> , Promastigoten-Oberflächenprotein
r	rekombinant; Ratten
R	Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROR	<i>retinoid-related orphan receptor(s)</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	<i>second(s)</i> , Sekunde(n)
s.c.	<i>subcutaneous(ly)</i> , subkutan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEB	<i>Staphylococcus Enterotoxin B</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SK	stromale Keratitis
SLA	<i>soluble Leishmania antigens</i> , lösliche Leishmanien Antigene
SLDA	<i>soluble Leishmania donovani antigens</i> , lösliche Antigene von <i>L. donovani</i>
SP	<i>soluble proteins</i> , lösliche Proteine
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Syr.	Syrisch
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
Tc cell	<i>cytotoxic T cell</i> , zytotoxische T-Zelle
TEA	Triethanolamin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
Th cell	<i>T helper cell</i> , T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub> -Zelle	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	<i>Leishmania major homologue of the eucaryotic thiol-specific antioxidant</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Verdünnungsfaktor der Zellsuspension
VL	viszerale Leishmaniasis
vs.	<i>versus</i>

WB	Westernblot
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel

### Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Endemiegebiete der humanen kutanen Leishmaniasis (CL). .....	6
Abb. 2: Der Lebenszyklus der <i>Leishmania</i> Parasiten. ....	8
Abb. 3: Immunreaktion des immunkompetenten Wirtes bei einer Infektion mit <i>L. major</i> . ....	11
Abb. 4: Differenzierungsschema naiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene Effektorzell-Subtypen. ....	13
Abb. 5: IFN $\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität von T-Zellen nach dLK-Restimulation mit SLA-Fraktionen der differentiellen Zentrifugation. ....	25
Abb. 6: Läsionsvolumina SP-immunisierter, Niedrigdosis-infizierter C57BL/6 Mäuse. ....	26
Abb. 7: Adjuvanz-abhängiger protektiver Effekt von SP <i>in vivo</i> . ....	28
Abb. 8: T-Zellproliferation nach Antigen-spezifischer Restimulation von CFSE-gelabelten dLK-Zellen immunisierter, nicht-infizierter C57BL/6 Mäuse. ....	31
Abb. 9: Chromatogramm der Anionenaustauscherchromatographie von filtrierten SP aus SLA mittels DEAE-Säule und Untersuchung des Reaktivitätspotentials titrierter DEAE-Fraktionen <i>in vitro</i> . ....	33
Abb. 10: Testen des DNA/RNA-Einflusses auf die Reaktivität von <i>L. major</i> -spezifischen Komponenten. ....	35
Abb. 11: Kombinierte intrazelluläre IFN $\gamma$ -Produktion und Induktion der T-Zellproliferation durch dLK-Restimulation mit ausgewählten DEAE-Fraktionen. ....	37
Abb. 12: Auswahl von Fraktionspools für eine weitere chromatographische Fraktionierung mittels MonoQ-Säule. ....	39
Abb. 13: Massenspektrometrische Detektion von <i>L. major</i> -spezifischen Proteinen in reaktiven MonoQ-Fraktionen des DEAE-Pool II. ....	41
Abb. 14: Detektion von <i>L. major</i> -spezifischen Proteinen in reaktiven MonoQ-Fraktionen des DEAE-Pool III mittels Massenspektrometrie. ....	42
Abb. 15: Rekombinante Expression und Reinigung ausgewählter Proteinkandidaten. ....	44
Abb. 16: Induktion der T-Zellproliferation durch Protein-spezifische Restimulation von dLK-Zellen ausgeheilter <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6 Mäuse. ....	47
Abb. 17: Zytokin-Produktion nach Protein-spezifischer Restimulation von dLK-Zellen ausgeheilter <i>L. major</i> -infizierter C57BL/6 Mäuse. ....	48
Abb. 18: T-Zellproliferation durch Antigen-spezifische Restimulation von CFSE-gelabelten dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse. ....	50
Abb. 19: Läsionsentwicklung von C57BL/6 Mäusen nach Immunisierung mit Proteintargets und <i>L. major</i> Infektion. ....	52
Abb. 20: Läsionsvolumina, Parasitenlasten und Antigen-spezifische dLK-Restimulation Proteintarget-immunisierter und <i>L. major</i> Niedrigdosis-infizierter C57BL/6 Mäuse. ....	54
Abb. 21: Intrazelluläre durchflusszytometrische Messung von IFN $\gamma$ und T-bet mit dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach <i>L. major</i> Infektion. ....	56
Abb. 22: Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$ und T-bet in dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach <i>L. major</i> Infektion. ....	57

---

Abb. 23: Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$ und T-bet in Ohr-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach <i>L. major</i> Infektion. ....	59
Abb. 24: Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$ und T-bet in Ohr-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach <i>L. major</i> Infektion. ....	60
Abb. 25: Protein-basierte Immunisierung und <i>L. major</i> Infektion von BALB/c Mäusen. ....	60
Abb. 26: Schema der P/B/B-Immunisierung. ....	98
Abb. 27: Schema der differentiellen Zentrifugation von SLA. ....	103

# 1. Zusammenfassung

Infektionen mit *Leishmania spp.* stellen in über 90 Ländern weltweit ein schwerwiegendes Problem dar. Die Zahl der Todesopfer liegt bei etwa 30.000 pro Jahr und ist überwiegend auf betroffene Individuen mit einer Immunsuppression oder Ko-Infektion zurückzuführen. Bisher existiert keine effektive Vakzine gegen die humane kutane Leishmaniasis (CL). Ihre Entwicklung sollte jedoch möglich sein, da immunkompetente Individuen nach einer ausgeheilten Primärinfektion gegen eine Re-Infektion mit derselben *Leishmania*-Subspezies resistent sind. Die Heilung basiert auf der Freisetzung von Th1/Tc1-assoziiertem IFN $\gamma$ .

Für die Identifikation immunogener Proteine, die als potentielle Vakzinkandidaten gegen die CL in Betracht gezogen werden können, wurde stark immunogenes *L. major* Lysat (lösliche Leishmanien Antigene, SLA) zunächst mittels differentieller Zentrifugation in seine Bestandteile aufgetrennt. Zur Untersuchung der protektiven Kapazität isolierter löslicher Proteine (SP) *in vivo* wurden C57BL/6 Mäuse mit unterschiedlichen Proteinmengen (von 10 ng bis 100  $\mu$ g) in Kombination mit CpG als Adjuvanz 3x intradermal in ein Ohr immunisiert. Die physiologisch relevante Niedrigdosis-Infektion mit lebenden metazyklischen *L. major* Promastigoten wurde in das kontralaterale Ohr injiziert. Es zeigte sich ein stark Dosis-abhängiger schützender Effekt der SP *in vivo*, der mit der Entwicklung unterschiedlicher Läsionsvolumina einherging. Im Gegensatz zu nicht geschützten CpG-Kontrollmäusen induzierte die Immunisierung mit 1  $\mu$ g SP + CpG die Antigen-spezifische Proliferation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro*. Demzufolge scheinen SP hochpotente Komponenten zu beinhalten, welche die Ausbildung effektiver Immunreaktionen gegen *L. major* Infektionen fördern.

Zur Identifikation und Charakterisierung einzelner immunogener Antigene aus SP erfolgte die Fraktionierung von SP in zwei Schritten mittels Anionenaustauscherchromatographie. Eluierte Fraktionen wurden *in vitro* in einem Restimulationsassay mit dLK-Zellen aus *L. major*-infizierten C57BL/6 Mäusen getestet. Nach Restimulation mit SP zeigte sich ein dominantes Th1/Tc1-Zytokinprofil, das vergleichbar war mit dem nach Antigen-spezifischer SLA-Stimulation. Es wurden einzelne reaktive Fraktionen des SP gefunden, die im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen *in vitro* hohe IFN $\gamma$ -Levels induzierten.

Die Identifikation von insgesamt 36 *L. major*-spezifischen Proteinen erfolgte mittels quantitativer Massenspektrometrie in reaktiven Fraktionen. Dem detektierten Proteingehalt entsprechend und in Korrelation mit der Fraktions-spezifischen Kapazität, hohe IFN $\gamma$ -Levels zu induzieren, wurden 4 Proteinkandidaten (Protein A, C, D und E) für weitere Analysen ausgewählt.

Die rekombinant exprimierten Proteine A, C bzw. E zeigten immunogenes Potential, in dem sie *in vitro* die Aktivierung und Proliferation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten. Es folgte die Untersuchung ihrer schützenden Kapazität *in vivo* mit unterschiedlichen Proteindosen. Interessanterweise waren nur die mit Protein C behandelten Mäuse gegen die *L. major* Infektion geschützt. Diese Tiere zeigten im Gegensatz zu den anderen Gruppen nahezu keine Läsionsentwicklung. Nach Behandlung mit CpG, SP, Protein A oder Protein C (jeweils 1 µg kombiniert mit CpG) waren in Woche 6 nach Infektion keine Unterschiede in den Parasitenlasten der Ohren aller Gruppen sichtbar. Die intrazelluläre Produktion des Th1-induzierenden Transkriptionsfaktors T-bet sowie des Th1-spezifischen Zytokins IFN $\gamma$  war in den geschützten Mäusen nach SP + CpG- oder Protein C + CpG-Immunisierung jedoch geringer.

Eine initiale Immunisierung suszeptibler BALB/c Mäuse mit den Proteinkandidaten war sehr vielversprechend. Alle Gruppen, die mit SP, Protein C oder E (jeweils 1 µg + CpG) behandelt worden waren, entwickelten nach der Infektion nahezu keine Ohrläsionen. Im Gegensatz dazu musste der Versuch der mit Protein D + CpG oder CpG allein behandelten Mäuse frühzeitig aufgrund eines progressiven Krankheitsverlaufs beendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das erstmals identifizierte Protein C eine potentielle Quelle für protektive T-Zell-Epitope gegen *L. major* Parasiten gleichermaßen für sowohl resistente als auch empfindliche Mäuse darstellt und damit maßgeblich zu der Entwicklung einer Vakzine gegen die CL beitragen könnte.

## Summary

Infections with *Leishmania spp.* represent a serious health problem in more than 90 countries worldwide. Mainly because of affected individuals with immunosuppression and co-infections, a death toll of around 30,000 annually is observed. So far, an effective vaccine against human cutaneous leishmaniasis does not exist, but its development should be feasible due to the fact that immunocompetent hosts are resistant against re-infection with the same *Leishmania* subspecies. Healing requires the production of Th1/Tc1-associated IFN $\gamma$ .

To identify immunogenic proteins which could serve as potential vaccine candidates against this disease, we first partitioned highly immunogenic *L. major* lysate (soluble *Leishmania* antigen, SLA) by differential centrifugation into its components. The protective features of isolated soluble proteins (SP) *in vivo* were investigated by immunizing C57BL/6 mice i.d. in one ear with different amounts of protein (ranging from 10 ng up to 100  $\mu$ g) combined with CpG as adjuvant in triplicate. Physiologically relevant low dose-infection was initiated with live metacyclic *L. major* promastigotes in the alternate ear. The protective effect of SP *in vivo* was strongly dose-dependent and accompanied by the progression of different lesion sizes at the site of infection. In contrast to non-protected CpG-control mice, immunization with 1  $\mu$ g SP+CpG induced both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antigen-specific T cell proliferation *in vitro*. Thus, SP seem to contain highly potent components, which are beneficial for mediating effective immune responses against *L. major* infections.

SP was fractionated by two-step anion exchange chromatography to identify and characterize single immunogenic antigens from SP. Eluted fractions were tested *in vitro* in a restimulation assay using dLN from *L. major*-infected C57BL/6 mice. Restimulation with SP revealed a dominant Th1/Tc1 cytokine profile similar to that observed after antigen-specific stimulation with SLA. Only few reactive fractions from SP were found, which induced high IFN $\gamma$  levels compared to unstimulated controls. Overall, we identified 36 *L. major*-specific proteins in reactive fractions by quantitative mass spectrometry. Comparing the revealed protein content with the respective reactivity profile, i.e. the fraction-specific capacity to induce IFN $\gamma$  production, we chose 4 candidates (protein A, C, D, and E) for further analysis.

The recombinant proteins A, C, and E also induced activation and proliferation of both T cell subsets in dLN restimulation assays *in vitro*. In addition, their immunizing capabilities were tested *in vivo* with different protein doses. Interestingly, only mice treated with protein C were protected against *L. major* infection as they showed almost no lesion development in contrast to the other groups. No obvious differences in parasite loads were detectable in ears of C57BL/6 mice treated with CpG, SP, protein A or protein C (1  $\mu$ g of each + CpG) at week

6 p.i., however, the intracellular production of the Th1-inducing transcription factor T-bet and the Th1-specific cytokine IFN $\gamma$  was lower in protected mice immunized with SP or protein C with adjuvant.

Finally, an initial immunization of susceptible BALB/c mice revealed promising results as all groups immunized with SP, protein C, or E (1  $\mu$ g of each + CpG) showed almost no ear lesion development p.i.. In contrast, BALB/c mice treated with protein D + CpG or CpG alone needed to be sacrificed at week 9 p.i. due to disease progression.

In summary, the newly identified protein C may serve in particular as a potential source for protective T cell epitopes for both resistant and susceptible mice and significantly contributes to the vaccine development against CL.

## 2. Einleitung

### 2.1. Leishmaniasis

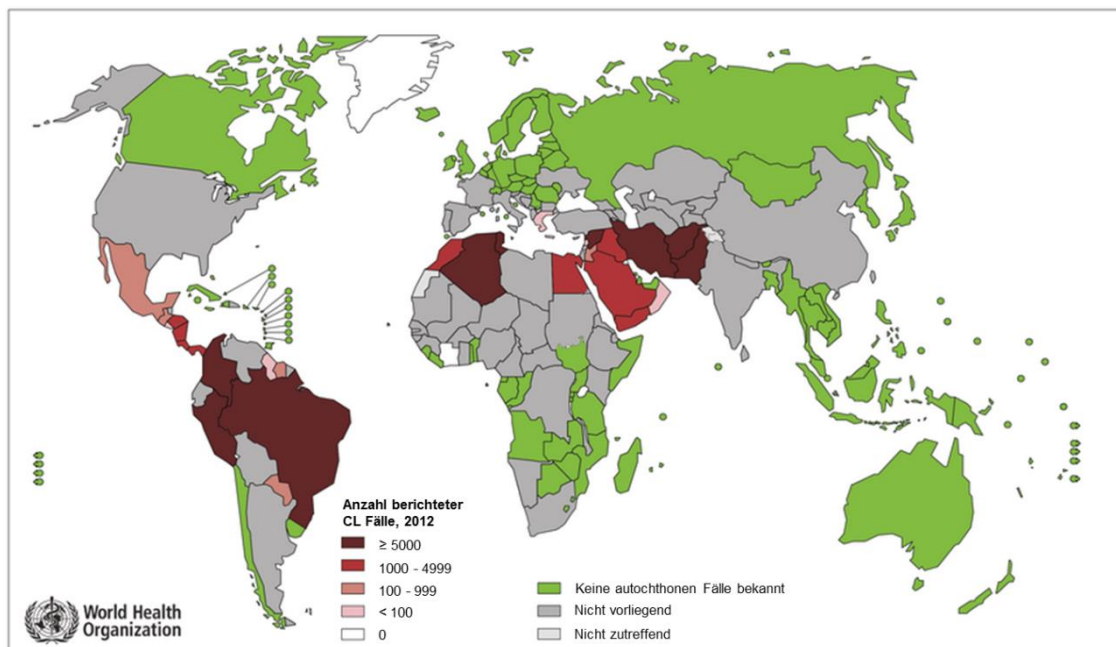
Die Leishmaniasis ist eine Infektionskrankheit, welche durch *Leishmania (L.) spp.*, eine Gattung humanpathogener, protozoischer Parasiten der *Trypanosomatidae*-Familie, ausgelöst wird. Die Transmission erfolgt dabei während der Blutmahlzeit einer infizierten weiblichen Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* in der „Alten Welt“ bzw. *Lutzomyia* in der „Neuen Welt“. In 98 überwiegend tropischen und subtropischen Ländern, in denen die Leishmaniasis endemisch ist, sind derzeit etwa 12 Millionen Menschen infiziert [1]. Pro Jahr liegt die Zahl der Todesopfer bei 20.000-30.000, wobei bis zu 1,3 Millionen neu auftretende Infektionen hinzukommen [1]. Etwa 310 Millionen Menschen sind dem täglichen Risiko einer Infektion ausgesetzt [1;2].

Obwohl die Leishmaniasis zu den zehn global am häufigsten auftretenden Infektionskrankheiten gehört, zählt sie doch zu den am wenigsten bekannten und beachteten [3]. Als zu den „*neglected tropical diseases*“ gehörend, trifft diese Krankheit vor allem ärmste Menschen und Randschichten überwiegend in Entwicklungsländern [1]. In Mitteleuropa hat die Anzahl importierter Infektionen in den letzten Jahren infolge der regen weltweiten Reisetätigkeit sowie durch Menschen, die aus Endemieregionen stammen (Migranten) bzw. in ihnen arbeiten (z.B. zivile Hilfskräfte, Soldaten) zugenommen und an Bedeutung erlangt [3-5]. Aufgrund des globalen Klimawandels haben sich die Verbreitungsgebiete der Sandmücken bereits ausgedehnt. Das natürliche Vorkommen zweier Sandmücken-Arten mit vermuteter Vektorkompetenz ließ sich bisher in Deutschland nachweisen, in deren Zusammenhang von elf Infektionsfällen die Rede ist, die vermutlich autochthon entstanden sind [6].

Es sind über 20 verschiedene Leishmanien-Spezies bekannt, welche in Abhängigkeit der Immunitätslage des befallenen Wirtsorganismus für die unterschiedlichen klinischen Symptome sowie Form und Schweregrad der resultierenden Krankheit verantwortlich sind [1;7]. Insbesondere Kinder und ältere Menschen sowie Patienten mit beeinträchtigter Immunantwort (z.B. einer manifesten Immunsuppression) sind schwerer betroffen [3;5]. Es wird zwischen den folgenden drei Hauptformen der humanen Leishmaniasis unterschieden:

### *Kutane Leishmaniasis (Hautleishmaniasis)*

Mit etwa 90% aller Fälle ist die kutane Leishmaniasis (CL) die am häufigsten auftretende Form (siehe Abb. 1). Für immunkompetente Patienten ist diese nicht lebensbedrohlich. Auslöser der CL ist in der „Alten Welt“ die Infektion mit *L. major*, *L. tropica* oder *L. aethiopica*, in der „Neuen Welt“ überwiegen die durch *L. (Viannia) braziliensis*, *L. mexicana* oder *L. amazonensis* auftretenden Fälle [3;8;9]. An den exponierten Körperregionen - wie Gesicht, Armen und Beinen - bildet sich nach einigen Wochen am Inokulationsort eine rötliche Papel, welche im Verlauf ulzeriert („Orientbeule“), jedoch auch symptomlos bleiben kann. Mit Ausnahme der drainierenden Lymphknoten (dLK) kommt es zu keiner weiteren systemischen Beteiligung [10]. Die Heilung der Hautläsionen erfolgt durchschnittlich nach 6-12 Monaten selbstlimitierend unter Narbenbildung und geht üblicherweise mit einer Resistenzentwicklung gegen die Re-Infektion mit derselben Leishmanien-Spezies einher [3;11;12]. Bei beeinträchtigtem Immunstatus können jedoch im Problemfall - z.B. bei Ko-Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) - disseminierte Hautläsionen mit Übergang in die Mukosa oder schlimmstenfalls eine Viszeralisierung der Parasiten mit Milz-, Leber- und Knochenmarkbefall auftreten [3;11;13;14].



**Abb. 1: Endemiegebiete der humanen kutanen Leishmaniasis (CL).** Die Weltkarte zeigt die Regionen, in denen das häufigste Krankheitsbild der Leishmaniasis, die kutane Form, verbreitet ist. Den endemischen Gebieten sind die Zahlen der im Jahr 2012 berichteten Fälle farblich zugeordnet [15].

### *Mukokutane Leishmaniasis*

Bei der mukokutanen Leishmaniasis (MCL) handelt es sich um eine schwere Form der CL, welche nach Jahren der Infektion mit einer Disseminierung der Leishmanien aus den ursprünglich kutan lokalisierten Herden in die Schleimhäute assoziiert ist und zur Gewebedestruktion führt. Auslöser für dieses Krankheitsbild sind Parasiten des *L. (Viannia) braziliensis*-Komplexes [3;9]. 90% aller MCL-Fälle sind in Bolivien, Brasilien und Peru präsent [16]. Ohne Behandlung führt die Infektion zu einer vollständigen Zerstörung der Nasen-, Mund- und Rachenschleimhäute und ist mit einer hohen Mortalitätsrate behaftet [5].

### *Viszerale Leishmaniasis*

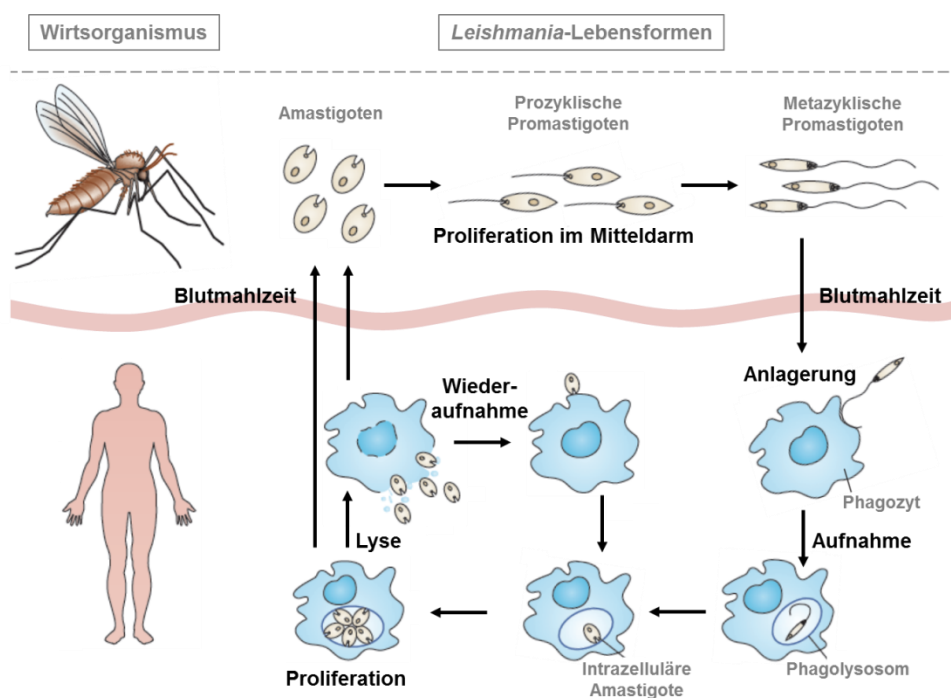
Die viszerale Form (VL), auch Kala-Azar genannt, ist die schwerwiegendste der drei Hauptformen. Bei ihr kommt es zu einem Befall der inneren Organe durch Parasiten, welche mit dem Anschwellen von Leber und Milz (Hepato-, Splenomegalie) einhergeht. Begleitsymptome sind in der Regel Fieberschübe, Erbrechen, starker Gewichtsverlust und eine Anämie [1;17]. Auslöser der VL sind die Spezies *L. donovani* in der „Alten Welt“ sowie außerdem *L. infantum* in der „Neuen Welt“ [9;18]. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden jährlich 200.000 bis 400.000 neue Fälle der VL gemeldet, wobei über 90% aller Fälle in nur sechs Ländern auftreten: Bangladesch, Brasilien, Äthiopien, Indien, Südsudan und dem Sudan [1]. Unbehandelt führt die VL in nahezu 100% der Fälle zum Tode.

Den einzelligen Parasiten dienen neben dem Menschen in direkter Nachbarschaft lebende Nagetiere, Hunde und andere Mammalia (Zoonose) als natürliches Reservoir und eigentliche Zielwirte, was das Hauptproblem der Epidemiologie dieser Infektionskrankheit darstellt [1;19]. Jedoch kann die Übertragung der Leishmanien auch durch infizierte Patienten selbst erfolgen (Anthroponose). Dabei wird Patienten mit dermalelem Post-Kala-Azar (PKDL) eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung und Unterstützung der Leishmanien-Transmission in der VL zugeschrieben [1;20].

Im Laufe der letzten Jahre wurde zudem ein vermehrtes Auftreten von *Leishmania*/HIV-Ko-Infektionen registriert [18;21;22]. Dabei zeigte sich, dass eine klinisch ausgeheilte, primäre *Leishmania*-Infektion bei HIV-Patienten mit zunehmender Verschlechterung der Immunabwehr reaktiviert wird [5;23]. Im umgekehrten Fall führt eine bestehende Leishmaniasis zu einer erhöhten Replikation des HI-Virus [24-26]. Insgesamt verläuft die Leishmaniasis im Falle einer Ko-Infektion schwerer als die Primärinfektion und zeichnet sich durch eine Therapieresistenz aus [5;27].

## 2.2. Der Lebenszyklus der *Leishmania major* Parasiten

*Leishmania*-Spezies existieren in zwei verschiedenen Lebensformen. Dem vorliegenden Milieu und Wirtsorganismus entsprechend passen sich diese Stadien an und durchlaufen eine Umwandlung. Einerseits sind dies die schlanken, 6-10  $\mu\text{m}$  langen Promastigoten, welche anterior eine lange bewegliche Geißel tragen. Andererseits handelt es sich um die obligat intrazellulär vorliegenden Amastigoten. Diese sind mit einer Länge von 1-5  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 1-2  $\mu\text{m}$  nahezu kugelförmig und tragen keine Geißel. Einer der verantwortlichen Erreger für die CL ist *L. major*, an dessen Beispiel der Lebenszyklus der Parasiten dargestellt ist (siehe Abb. 2).



**Abb. 2: Der Lebenszyklus der *Leishmania* Parasiten.** *Leishmania* sind in zwei verschiedenen Lebensformen existent, die sich entsprechend der vorliegenden Bedingungen in der Sandmücke oder dem Säugetier als Wirtsorganismus umwandeln können. Die Transmission der Parasiten auf den jeweils anderen Wirt erfolgt dabei durch die Blutmahlzeit der Sandmücken (Graphik verändert nach [9]).

Der Lebenszyklus beginnt mit der Blutmahlzeit einer dämmerungs- und nachtactiven Sandmücke, welche hochinfektiöse metazyklische Promastigoten in sich trägt. Nur weibliche Sandmücken benötigen Blut, dessen Nährstoffe der Eientwicklung von Nutzen sind. Bei der Blutmahlzeit werden über den Stechrüssel 100-1000 hochinfektiöse Promastigoten mit dem Speichel der Mücke in die Oberhaut des Säugers inokuliert, wo sie von Phagozyten, wie Gewebemakrophagen (M $\Phi$ ), phagozytiert werden [11;28]. Im sauren Milieu des Phagolysosoms der M $\Phi$  wandeln sich die Promastigoten in die obligat intrazelluläre, amastigote Lebensform um und proliferieren ungestört. Bei eintretender M $\Phi$ -Ruptur werden

die Amastigoten in das Gewebe freigesetzt, wo sie weitere lokal vorliegende Phagozyten infizieren. Der Lebenszyklus schließt sich durch die Aufnahme unbegeißelter Parasiten aus dem infizierten Gewebe bei der erneuten Blutmahlzeit einer Sandmücke. In deren Mitteldarm erfolgt die Umwandlung der amastigoten Form über Zwischenstadien in prozyklische Promastigoten, welche unter den dort vorherrschenden Bedingungen proliferieren. Die finale Differenzierung erfolgt nach einigen Tagen in die hochinfektiöse metazyklische, promastigote Lebensform bei dem Übertritt vom Mittel- in den Vorderdarm [9].

## **2.3. Experimentelle murine kutane Leishmaniasis (CL)**

### **2.3.1. Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems und Evasionsmechanismen der Leishmanien**

In der CL führt die Inokulation von *L. major* Promastigoten in die Haut des Säugetierorganismus zunächst zu einer Aktivierung des humoralen angeborenen Immunsystems, welches für die Abwehr von Pathogenen und damit für die Elimination von Pathogen-spezifischen Antigenen verantwortlich ist.

Das Komplementsystem ist wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems und setzt sich aus mehr als zwanzig verschiedenen Serumproteinen zusammen. Diese aktivieren sich in Anwesenheit eines Erregers gegenseitig in einem kaskadenartigen proteolytischen Mechanismus. Durch Opsonisierung der Erregeroberfläche ermöglichen sie den Phagozyten die Erkennung und Elimination dieser Erreger. Lagern sich die Komplementfaktoren zusammen, führt dies schließlich zur Bildung eines lytischen Komplexes, auch Membranangriffskomplex (C5b-C9-Komplex) genannt.

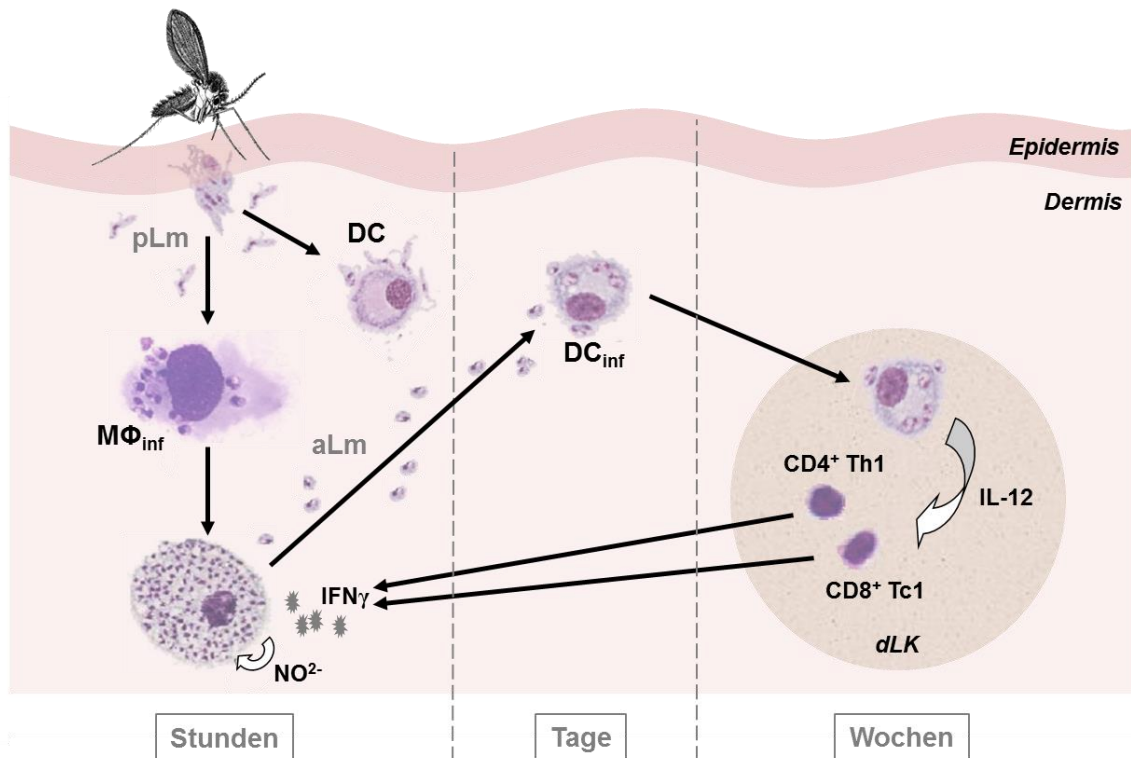
Als obligat intrazelluläre Parasiten, die langfristig nur in Wirtszellen des M $\Phi$ -Phagozyten-Systems existieren können (siehe Abb. 3), entwickelten die Leishmanien spezielle Evasionsmechanismen. So machen sich inokulierte Promastigoten die Opsonisierung mit C3b und C3bi durch Komplement zunutze, um Komplementrezeptor 3 (CR3)-vermittelt phagozytiert zu werden [29;30]. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die beiden Hauptkomponenten der Leishmanien-Oberfläche, Lipophosphoglycan (LPG) sowie Leishmanolysin (gp63). Nach proteolytischer Umwandlung der Komplementuntereinheit C3b in C3bi unterstützen sie die Bindung von C3i an die Promastigoten-Oberfläche. Dadurch wird einerseits die Komplement-vermittelte Lyse der extrazellulären Parasiten verhindert, andererseits hat dies eine erleichterte CR3-vermittelte Phagozytose durch M $\Phi$  zur Folge [31;32]. Einen weiteren Schutzmechanismus stellt die Expression von Proteinkinasen dar. Diese ermöglicht es den Parasiten, bestimmte Komplementfaktoren durch Phosphorylierung zu inhibieren [32].

Diese erste Phase der *L. major* Infektion wird aufgrund der noch ausbleibenden Antwort des adaptiven Immunsystems nach reiner M $\Phi$ -Infektion auch „stille Phase“ („*silent phase*“) genannt [30;33;34]. Während dieser 4-5 Wochen anhaltenden Phase wird noch keine Entzündungsreaktion initiiert [35]. Stattdessen erfolgt die gezielte Blockade von Auslösern, die für eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion wichtig sind: Darunter zählen neben der Freisetzung des Schlüsselzytokins Interleukin (IL)-12 [36-39], die Antigenpräsentation [40-42] sowie die Hochregulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) [43]. Dadurch wird die ungestörte Transformation der internalisierten Promastigoten innerhalb des Phagolysoms infizierter M $\Phi$  in die amastigote Lebensform ermöglicht.

Infolge der Freisetzung von Amastigoten ins umliegende Gewebe durch lysierte M $\Phi$  werden dendritische Zellen (DC) angezogen. In dieser zweiten Phase der CL lassen sich erstmals Hautläsionen am Inokulationsort nachweisen [33;34]. Durch Immunglobulin G (IgG)-vermittelte Mechanismen sowie Mastzell-spezifische Mediatoren angezogen, wandern die DC in das infizierte Gewebe ein [44;45]. Die mit IgG opsonisierten Amastigoten werden von den DC schließlich über die Rezeptoren (R) Fc $\gamma$ R I und III aktiv aufgenommen [35;44;46;47]. Im Falle der IgG wird angenommen, dass es sich bei ihnen ebenfalls um Antikörper des natürlichen Immunsystems handeln kann, welche von B1-Zellen produziert werden und ohne Beteiligung einer T-Zell-vermittelten Induktion von B-Zellen entstehen können [48;49].

Die mit Amastigoten infizierten DC migrieren daraufhin in die benachbarten dLK (siehe Abb. 3) [50]. Charakteristische Merkmale für die DC-Ausreifung sind die Hochregulation der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) I und II sowie bestimmter kostimulatorischer Moleküle wie CD54 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche [51-54].

In den dLK induzieren die infizierten DC schließlich IL-12-vermittelte T-Zell-abhängige Immunreaktionen und gelten daher als Vermittler zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem [47;55-57]. Neben den migrierten DC wird den bereits in den dLK-residenten DC ebenfalls eine bedeutende Rolle zugesprochen [58]. Von besonderer Relevanz ist dabei, dass die Präsentation der prozessierten Leishmanien-Antigene durch die DC gegenüber sowohl naiven CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt und durch das Schlüsselzytokin IL-12 zur Aktivierung beider T-Zellsubtypen führt (siehe Abb. 3) [7;59;60].



**Abb. 3: Immunreaktion des immunkompetenten Wirtes bei einer Infektion mit *L. major*.** Die Beteiligung wichtiger Zellpopulationen des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems bei einer *L. major* Infektion ist im Rahmen einer schützenden Immunantwort in ihrem zeitlichen Kontext dargestellt. pLm = promastigote *L. major*; aLm = amastigote *L. major* Parasiten, MΦ<sub>inf</sub> = infizierte Makrophagen, DC<sub>inf</sub> = infizierte dendritische Zellen, Th = T-Helferzellen, Tc = zytotoxische T-Zellen (Quelle: Esther von Stebut).

Das Priming von T-Helferzellen (Th1) und zytotoxischen T (Tc1)-Zellen führt in einem immunkompetenten Wirt zur Freisetzung von proinflammatorischem Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [46;54]. Dieses Zytokin induziert die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (bspw. NO) durch infizierte MΦ, wodurch der Großteil intrazellulärer Parasiten abgetötet wird (siehe Abb. 3) [7;61;62].

### 2.3.2. T-Zell-Immunantworten – Die Rolle von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für den Verlauf von *Leishmania*-Infektionen sind zelluläre Immunreaktionen von entscheidender Bedeutung.

In der CL führt die Präsentation Parasiten-spezifischer Antigene durch die DC immunkompetenter Individuen zur Aktivierung von sowohl CD4<sup>+</sup> Th1- als auch CD8<sup>+</sup> Tc1-Zellen und auf diesem Weg zur Resistenzentwicklung gegen eine Re-Infektion mit derselben *Leishmania*-Subspezies (siehe Abb. 3). Dabei erfolgt die Präsentation exogener Antigene gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe von MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) [63]. Im Falle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden überwiegend

endogene Antigene über Moleküle der MHC Klasse I präsentiert [64;65]. Die Präsentation exogener Antigene durch MHC Klasse I und CD8-positiver DC gegenüber CD8<sup>+</sup> Tc-Zellen ist mittels Kreuzpräsentation (*cross-priming*) jedoch ebenfalls möglich [66].

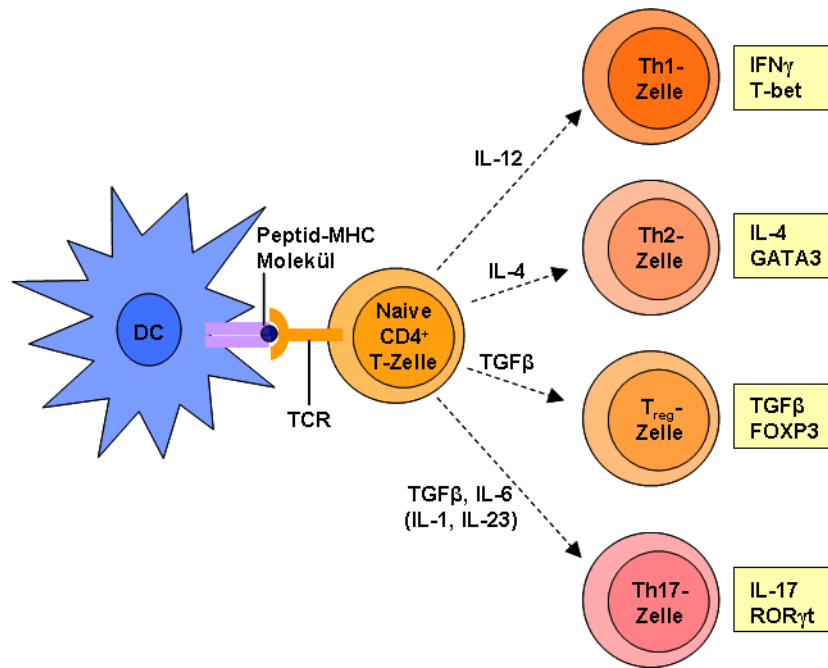
In verschiedenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass eine *L. major* Infektion bei vollständiger T-Zell-Defizienz mit Kontrollverlust der Erregerverbreitung im Wirtsorganismus und einem daraus resultierenden progressiven Krankheitsverlauf einhergeht [67;68]. Während L3T4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) T-Zellen ausreichen, um athymische, suszeptible BALB/c Mäuse vor einer *L. major* Infektion zu schützen [69], zeigten BALB/c Mäuse nach CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion Anzeichen einer protektiven Immunantwort (wie die Elimination von *L. major*), die den vorhandenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugesprochen wurden [70;71].

Die Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Primärinfektion mit *L. major* wurde bisher kontrovers diskutiert. Da CD8<sup>-/-</sup> Mäuse nach einer primären Infektion ausheilten, wurde den CD8<sup>+</sup> Tc-Zellen zunächst keine essentielle Bedeutung auf die Entwicklung protektiver Immunantworten zugeordnet [72]. Belkaid und Kollegen zeigten jedoch, dass immunkompetente Mäuse mit einer CD8-T-Zelldefizienz nach der intradermalen (i.d.) Inokulation von nur 100 *L. major* Promastigoten einem progressiven Krankheitsverlauf nicht entgegensteuern konnten [60].

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als Hauptquelle des schützenden Schlüsselzytokins IFN $\gamma$  identifiziert, welches in der primären Infektionsphase das Wachstum intrazellulärer Parasiten durch die Aktivierung *L. major*-infizierter M $\Phi$  kontrolliert [73;74]. In dieser frühen Phase einer Infektion sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls von besonderer Wichtigkeit, in dem sie mittels zytotoxischer Mechanismen zur Zytolyse infizierter Zellen beitragen [60;75].

Verschiedene Depletionsansätze in suszeptiblen BALB/c Mäusen dienten zudem als Nachweis, dass vor allem der „*cross-talk*“ zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei dem Verlauf und der Heilung einer Infektion mit *L. major* Parasiten von besonderer Wichtigkeit ist [76].

Nach der Antigenpräsentation durch APC werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK aktiviert und entwickeln sich in Abhängigkeit des Immunstatus des betroffenen Individuums in verschiedene Th-Zellsubtypen mit verschiedenen Zytokin-Profilen und Effektor-Funktionen. Dem vorliegenden Zytokin-Milieu entsprechend wird so die Immunreaktion in Richtung eines bestimmten Th-Zelltyps gelenkt (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Differenzierungsschema naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene Effektorzell-Subtypen.**

Infolge der Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie DC können naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit des vorliegenden Zytokin-Milieus in Th1-, Th2, T<sub>reg</sub>- bzw. Th17-Zellen polarisieren. Die Anwesenheit von z.B. IL-12 initiiert und stabilisiert die Entwicklung zu Th1-Zellen, welche mit der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und dem Th1-spezifischen Zytokin IFN<sub>γ</sub> assoziiert ist. TCR = T-Zellrezeptor, Th-Zelle = T-Helferzelle, Treg = regulatorische T-Zelle (vereinfacht nach [77]).

Im Falle einer *L. major* Infektion ist die Generierung einer dominierenden Th1- oder Th2-Immunantwort für den klinischen Verlauf entscheidend [30;78-80]. Es ist von einem „Th1/Th2-Dualismus“ die Rede. Wichtige Immunbotenstoffe für die Generierung einer schützenden CD4<sup>+</sup> Th1-Zell-vermittelten Immunantwort sind die Schlüsselzytokine IL-12 und IFN<sub>γ</sub>, während IL-4 die Entwicklung in Richtung einer Th2-Immunantwort mit progressivem Krankheitsverlauf lenkt [11;30]. Dabei unterdrücken IFN<sub>γ</sub> und IL-4 wechselseitig die Entwicklung und Aktivierung des jeweils anderen Th-Zellsubtyps [81].

Im Laufe der letzten Jahre zeigte sich zudem, dass weitere T-Zellsubtypen bei der Ausbildung von Immunantworten gegen *L. major* ebenfalls von Bedeutung sind. In der Haut befinden sich ruhende, natürliche regulatorische T-Zellen (nT<sub>reg</sub>), welche aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung Gewebeschäden durch inflammatorische Immunreaktionen limitieren. T<sub>reg</sub> wurden als endogene Population von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert, welche 5-10% der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen in naiven Mäusen und dem Menschen ausmachen und mittels IL-10-Freisetzung die Erregerpersistenz fördern [82-85]. Gezeigt wurde dies, indem die Heilung *L. major*-infizierter, IL-10-defizienter Mäuse zum Verlust der Langzeitimmunität gegen eine Re-Infektion führte [82]. Die Wichtigkeit einer Erregerpersistenz für die Resistenzentwicklung wird jedoch kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass sich anti-

*Leishmania* CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus sowohl Parasit-abhängigen T-Effektorzellen sowie -unabhängigen zentralen T-Gedächtniszellen zusammensetzen, was das Überleben der Parasiten für die Ausbildung einer schützenden Immunantwort nicht zwingend notwendig machen würde [86]. In immunkompetenten Wirten kontrollieren T<sub>reg</sub> protektive Th1-Anworten, die Erregerpersistenz und Entwicklung von Gedächtnisantworten, während sie in suszeptiblen Individuen Th2-Immunantworten supprimieren [84].

Th17-Zellen wurden erst vor einigen Jahren als eigene Subpopulation IL-17-produzierender CD4<sup>+</sup> Th-Zellen beschrieben [87]. Th17-Zell-spezifische proinflammatorische Zytokine regulieren und verstärken eine Vielzahl proinflammatorischer Reaktionen [88;89]. So spielt das Zytokin IL-17 eine Rolle bei der Rekrutierung, Migration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und M $\Phi$  in das infizierte Gewebe [90]. Neben ihrer Schutzfunktion gegen extrazelluläre Erreger können Th17-Zellen selbst jedoch ebenfalls pathologisch wirken [91;92]. Das Auftreten von Th17-Effektorzellen steht außerdem in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen [93]. Es finden sich bspw. erhöhte IL-17-Levels in Patienten mit rheumatoider Arthritis [94]. Bei der Infektion von suszeptiblen Mäusen mit *L. major* Parasiten unterstütze IL-17A die Parasitenpersistenz und förderte einen progressiven Krankheitsverlauf der CL [95]. Im Gegensatz dazu wurde für die VL ein synergistischer Effekt von IL-17A und IFN $\gamma$  nach Infektion mit *L. infantum* gezeigt, welcher gezielt die Parasiten-Replikation durch Unterdrückung der T<sub>reg</sub>-Expansion kontrollierte [96].

Ein weiteres, unter anderem von Th17-Zellen produziertes, prominentes Zytokin ist IL-22. In der experimentellen CL mit C57BL/6 Mäusen wurden  $\alpha\beta$  T-Zellen als Hauptquelle identifiziert [157]. Während IL-22-defiziente C57BL/6 Mäuse nach *L. major* Infektion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keinen Unterschied im Krankheitsverlauf aufwiesen [157], zeigte die intramuskuläre Injektion von IL-22 vor der Challenge mit *L. major* in BALB/c Mäusen einen schützenden Effekt, welcher mit der Induktion einer erhöhten IFN $\gamma$  Produktion assoziiert war [158].

### 2.3.3. Experimentelle Mausinfektion

Die Relevanz der CD4<sup>+</sup> Th1/Th2-Dichotomie *in vivo* wurde erstmals im Modell der experimentellen CL mit *L. major* Parasiten gezeigt [30;80]. Bisher sind mehrere gut etablierte Mausmodelle bekannt, deren Ziel es ist, die humane Erkrankung unter physiologischen Bedingungen möglichst exakt zu imitieren.

Bei einer natürlichen Infektion erfolgt die Transmission von 100 bis 1000 metazyklischen *L. major* Promastigoten durch *Phlebotomus*-Sandmücken in die Haut exponierter Körperregionen [11]. Die vielfach angewandte subkutane (s.c.) Inokulation der Parasiten in die Fußsohlen von Mäusen mittels Kanüle ist somit eher ungeeignet. Das intradermale (i.d.)

Einbringen der hochinfektiösen Leishmanien in die Ohren hingegen kommt der Nachahmung einer natürlichen Infektion unter Laborbedingungen bedeutend näher [11;60]. Im Gegensatz zu der s.c. Infektion, bei der sich lediglich die Pfotenschwellung messen lässt, ist bei der Ohr-Infektion eine exaktere Messung der Granulome in drei Dimensionen möglich. Die für weitere Untersuchungen relevanten submandibulären dLK sind zudem leicht zugänglich [39]. Neben der Infektion von Mäusen mit einer hohen Parasiten-Anzahl von  $10^4$  bis  $10^7$  (Hochdosis), bei der die entsprechenden Immunreaktionen beschleunigt eintreten, ist das Niedrigdosismodell mit  $10^3$  Leishmanien von besonderer Relevanz für die Imitation einer physiologischen humanen Infektion, bringt jedoch einen größeren Zeitaufwand mit sich [11;34].

Verschiedene Mausstämme sind entsprechend ihres genetischen Hintergrundes suszeptibel gegenüber einer Infektion oder entwickeln eine lebenslange Resistenz gegen die Re-Infektion mit derselben *Leishmania*-Subspezies. Während Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 eine *L. major* Infektion kontrollieren können, was mit der Heilung der CL und Immunitätsentwicklung einhergeht, entwickeln suszeptible BALB/c Mäuse nekrotische Läsionen und eine systemische Erkrankung (Viszeralisierung) mit Todesfolge [7;11;30].

Der progressive Krankheitsverlauf der BALB/c Maus ist mit der Entwicklung einer Th2-Immunantwort sowie humoralen Antwort assoziiert [30]. Dabei hat die durch B-Zellen initiierte Antikörper-Freisetzung keinen Einfluss auf die systemische Ausbreitung der Pathogene. Die erhöhte IL-4-Freisetzung hat die Unterdrückung einer Th1-Immunreaktion zur Folge und lenkt naive T-Zellen in Richtung des Th2-Subtyps. Es wurde gezeigt, dass das für den progressiven Verlauf entscheidende „frühe IL-4“ von  $V\beta 4V\alpha 8^+$   $CD4^+$  T-Zellen freigesetzt wird, welche das Leishmanien-Protein *Leishmania homolog of receptors for activated C-kinase* (LACK) erkennen [97]. Allgemein wird die Infektion von BALB/c Mäusen bevorzugt als Modell für die humane VL mit beteiligter Viszeralisierung eingesetzt.

Bei *L. major*-infizierten C57BL/6 Mäusen dominiert hingegen die Th1-Immunantwort. IL-12-vermittelt aktivierte Th1/Tc1-Zellen produzieren gesteigerte Mengen an  $IFN\gamma$ , welches wiederum durch Aktivierung der infizierten  $M\Phi$  die vor einer Re-Infektion schützenden Immunreaktionen einleitet [7;30;55;60]. Aufgrund dieser immunkompetenten Eigenschaften kommen C57BL/6 Mäuse bevorzugt als Modellorganismus für die humane CL immunkompetenter Individuen und damit verbundener Immunisierungsstudien zum Einsatz.

Da sich *in vitro*-kultivierte, transformierte Zelllinien oder T-Zellklone anders verhalten als naive T-Zellen oder Gedächtniszellen im Organismus, ist die *in vivo*-Untersuchung Antigen-spezifischer Immunantworten für das Verständnis der direkten Interaktion zwischen Pathogen und Wirtsorganismus und für eine mögliche Einflussnahme in dieses System von besonderer Wichtigkeit [98]. Das experimentelle murine Modell der Leishmaniasis eignet sich zur Untersuchung der Ursache und Entstehung Antigen-spezifischer T-Zellantworten *in vivo*

und ermöglicht die Überwachung des Transports und der Präsentation sowie die Analyse der aus der Haut abgeleiteten *L. major*-Antigene.

#### **2.3.4. Relevanz für die humane kutane Leishmaniasis**

Obwohl sich die im Modellorganismus Maus gewonnenen Erkenntnisse meist nicht vollständig auf die *in vivo*-Situation im Menschen übertragen lassen, leisten sie einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung physiologischer Prozesse, der Entwicklung von Therapieverfahren und zur Überprüfung der Medikamentensicherheit [99]. Eine dabei vielfach rege diskutierte Fragestellung ist jedoch, inwieweit sich die Wirkungsweise gleicher Stoffe (z.B. eine Vakzine) im Organismus der unterschiedlichen Spezies – Mensch und Maus – bei der strukturellen und funktionellen Gleichartigkeit vieler Organe tatsächlich ähnelt.

Bei einer humanen *Leishmania*-Infektion entscheidet neben der Parasiten-Spezies ebenfalls der individuelle Immunstatus des Wirtes über den Verlauf und Schweregrad der Krankheit. Viele Mechanismen und Immunreaktionen, die im infizierten Patienten ablaufen, ähneln denen der murinen Erkrankung. Jedoch gibt es nicht nur Parallelen und noch einige Unklarheiten.

Analog zur Maus-Infektion sind die M $\Phi$  im humanen Organismus die primär infizierten Phagozyten und dazu befähigt, die promastigote sowie amastigote Lebensform der Leishmanien zu internalisieren [100;101]. Im murinen Modell wie auch im humanen System reifen die DC der Haut durch die Aufnahme der Parasiten aus und primen naive T-Zellen in den dLK, wobei sie durch Freisetzung von IL-12 die protektive Th1/Tc1-Immunantwort initiieren. Es wird vermutet, dass nach Infektion mit *L. major* im Gegensatz zu den epidermalen DC (Langerhanszellen) und plasmazytoiden DC (pDC) nur die dermalen inflammatorischen DC zum Schutz von Maus und Mensch beitragen [101;102].

Während bei der murinen Infektion von dem sogenannten Th1/Tc1-Dualismus ausgegangen wird, ist die Erkrankung des Menschen durch Leishmanien komplexer und von gemischten Th1/Tc1-Immunantworten begleitet. Gezeigt wurde dies durch die vergleichende Untersuchung von dLK-Proben aus CL-Patienten mit Lymphadenopathie in Zusammenhang mit lokal ulzerierenden Läsionen oder ohne Ulzeration [103]. Beide Gruppen wiesen vergleichbare Levels des Th1/Tc1-Zell-spezifischen Zytokins IFN $\gamma$  und des Th2-Zell-spezifischen IL-4 auf. Untersuchungen von Faktoren (wie GATA3, T-bet und proinflammatorische Zytokine), welche die T-Zelldifferenzierung und Zytokin-Freisetzung in einer asymptomatischen, aktiven, chronischen oder wiederkehrenden *Leishmania* (*Viannia*)-Infektion regulieren, zeigten, dass die Regulation von Entzündungsreaktionen eine entscheidendere Rolle für den Krankheitsverlauf spielte als die Th1/Th2-Immunantworten [104]. Wobei auch weitere Mechanismen vermutet werden, da die isolierten mononukleären

Zellen des peripheren Blutes (PBMC) asymptomatischer Menschen in endemischen Regionen bzw. von Patienten mit lokaler CL gleiche Zytokin-Profile aufwiesen [105]. Castellano und Kollegen wiesen nach, dass die aus Patienten mit aktiver CL isolierten PBMC eine Th1/Tc1-Mischantwort mit hohen IFN $\gamma$ -, IL-12-, IL-4- und IL-10-Werten zeigten, während die PBMC ausgeheilter Patienten sich durch die vermehrte Produktion Th1-Zell-spezifischer Zytokine auszeichneten [106]. Die klinische Heilung der humanen milden CL ist demnach wie im Mausmodell mit einer dominierenden Th1-Immunantwort und vermehrter IFN $\gamma$ -Freisetzung assoziiert [106;107]. Die Leishmanien-Antigen-spezifische *ex vivo*-Stimulation von PBMC *L. braziliensis*-Infizierter zeigte, dass die vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen war [108]. Hautbiopsien lokaler Läsionen von CL-Patienten wiesen ein erhöhtes Vorkommen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, die für den Chemokinrezeptor CXCR3 positiv und vom Th1/Tc1-Typ waren [109]. Beide T-Zellsubtypen entscheiden demnach bei Mensch und Maus gleichermaßen über die Heilung sowie Ausprägung von Langzeit-Immunantworten der kutanen Infektion [110].

Wie bei der murinen Erkrankung spielt IFN $\gamma$  ebenfalls bei der humanen Infektion eine Schlüsselrolle. Die Aktivierung der M $\Phi$  durch dieses Zytokin hat die Induktion der NO-Synthase-Aktivität zur Folge, welche für die Elimination der intrazellulären Parasiten essentiell ist [100;111]. Während susceptible Mäuse mit Leishmaniasis nach der Applikation von IFN $\gamma$  heilen, zeigte auch die tägliche s.c. Injektion des rekombinanten Zytokins über einen Zeitraum von 28 d bei einem CL-Patienten mit ulzerierenden Läsionen positive Wirkung [111]. Die Monotherapie mit IFN $\gamma$  führte nebenwirkungslos zu vergleichbaren Immunreaktionen wie bei einer Resistenzentwicklung und stellt daher auch im humanen System eine effektive Behandlungsmethode der CL dar.

Neben den „klassischen“ involvierten Th1/Th2-Zell-spezifischen Zytokinen wurde außerdem gezeigt, dass aktive Hautläsionen von *L. braziliensis*-Patienten mit erhöhten IL-10-Levels assoziiert waren [112]. IL-10 wurde von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>) produziert, welche gleichermaßen bei resistenten, als auch Patienten mit aktiven Läsionen detektierbar waren [112]. Th17-Zellen sind ebenfalls in den Krankheitsverlauf einer humanen *Leishmania*-Infektion involviert. Th17-Zell-spezifische Marker (IL-23, IL-17, ROR $\gamma$ t) waren lokal und systemisch in verstärktem Ausmaß bei Patienten mit PKDL nach Infektion mit *L. donovani* präsent [113]. Eine erfolgreiche Chemotherapie hatte hingegen die Herunterregulation dieser Th17-Marker zur Folge.

Trotz scheinbarer Differenzen in der Rolle und Ausprägung schützender zellulärer Immunantworten während der aktiven murinen bzw. humanen CL sind wesentliche Mechanismen, Immunzellen sowie Zell-spezifischer Faktoren in ihrer Funktion, die Heilung zu unterstützen, bei Maus und Mensch gleichermaßen involviert. Dies rechtfertigt den

Einsatz eines experimentellen Mausmodells zu Forschungszwecken und Vakzination gegen die humane CL.

## **2.4. Behandlung und Ansätze zur Prävention von Leishmaniasis**

Die therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung einer Leishmaniasis reichen je nach Form und Schweregrad der Infektion von der lokalen Behandlung bis zur systemischen Therapie [5]. Im Jahr 2007 bzw. 2008 wurden von der WHO zwei neue Arzneimittel gegen die Leishmaniasis in die „Liste der unentbehrlichen Medikamente“ aufgenommen: Paromomycin und Amphotericin B [1]. Zur Behandlung der VL hat sich neben pentavalenten Antimonverbindungen bisher vor allem die orale Gabe des Antiparasitikums Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) als wirksam erwiesen [114-117]. Insgesamt machen der hohe Kostenfaktor, die Art und Dauer der Therapie, toxische Nebeneffekte sowie die mögliche Resistenzentwicklung der Parasiten einige dieser unterschiedlichen Behandlungsansätze jedoch für viele Leishmaniasis-Patienten in Entwicklungsländern unzugänglich und gestalten sich problematisch [16;118;119]. Ein effektiver Impfstoff zur Prävention dieser Infektionskrankheit existiert derzeit nicht.

### **2.4.1. Vakzinierungsstrategien – Warum es noch keine Vakzine gibt**

Die Entwicklung einer effektiven Vakzine als Prävention gegen die CL ist von besonderer Relevanz und sollte aufgrund der beschriebenen erlangten Immunität immunkompetenter Individuen gegen eine Re-Infektion mit derselben *Leishmania*-Subspezies nach einer ausgeheilten Primärinfektion möglich sein [11]. Besondere Anforderungen an eine protektive Impfung sind die Generation eines immunologischen „Anti-*Leishmania*“-Langzeitgedächtnisses, ein niedriger Kostenfaktor, eine praktikable Darreichung sowie das Fehlen schwerwiegender Nebenwirkungen.

Verschiedene Vorgehensweisen und Impfstrategien wurden bisher in Mausmodellen, aber auch im Menschen selbst getestet. Ein seit Langem in endemischen Gebieten verbreiteter Ansatz ist die Impfung mit lebenden, virulenten Leishmanien, die „Leishmanization“ [10;11;19;120]. Dabei erfolgt die bewusste Infektion von Kleinkindern in einen Arm oder das Gesäß, um späteren Läsionen und entstellenden Narben an exponierten Körperstellen wie dem Gesicht vorzubeugen. Aufgrund von damit einhergehenden Risiken bei einer vorliegenden oder z.B. durch eine Ko-Infektion erlangten Immunsuppression, wie der Entwicklung nicht-heilender Läsionen mit Übergang in einen schlimmstenfalls viszeralen Verlauf, gilt diese Methode als ethisch kaum vertretbar.

Eine weitere Strategie stellt die Vakzinierung mit ganzen, nicht-virulenten Leishmanien bzw. Parasiten abgeschwächter Virulenz dar, welche mittels verschiedener genetischer Modifikationen - wie die gezielte Gen-Inaktivierung, (z.B. des *Imcpa* Cystein-Proteinase-Gens in *L. mexicana*) oder durch Bestrahlung - erhalten werden können [10;121]. Dieser Ansatz zeigte im Tiermodell, dass die Parasiten über den üblichen Weg von Phagozyten des Wirtsorganismus internalisiert werden und im Phagolysosom persistieren, ohne zu replizieren, wodurch stabile Immunantworten gegen die Leishmanien-Antigene in Gang gesetzt wurden [10]. Der Einsatz solcher genetisch veränderten Erreger mit abgeschwächter Virulenz birgt jedoch die Gefahr, dass sich die Virulenz nachträglich wieder ausbildet, was mit dem Ausbruch einer Leishmaniasis assoziiert wäre.

Die erste randomisierte Doppelblindstudie zur Vakzinierung gegen die humane CL wurde mit autoklavierten, getöteten *L. major* Parasiten (ALM) kombiniert mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) als Adjuvanz im Iran durchgeführt [16;122]. Als Referenz diente eine Kontrollgruppe Freiwilliger, welche nur mit Adjuvanz behandelt worden war. Nach der Behandlung zeigten beide Gruppen ähnliche Nebenwirkungen wie einen lokalen Schmerz und Ulkusbildung. Die mit ALM + BCG behandelten Individuen reagierten jedoch stärker auf den Leishmanin Hauttest (LST  $\geq 5$  mm), der als Maß für die Entwicklung einer schützenden Immunantwort angewandt wird [122]. Diese LST-Reaktion war ebenfalls verglichen mit vorangegangenen Phase-I/II-Studien signifikant stärker ausgeprägt [123;124]. Die autoklavierten Parasiten vermittelten jedoch keinen dauerhaften Schutz und sind für den klinischen Einsatz nur schwer standardisiert herstellbar [16;125;126]. Bisher wird außerdem kontrovers diskutiert, inwieweit persistierende lebende Leishmanien im menschlichen Organismus für einen Langzeitschutz von Relevanz sind. Dies ist ein weiterer schwerwiegender Punkt, der dem Einsatz toter Parasiten als Impfstrategie kritisch gegenübersteht.

Mit der vollständigen Sequenzierung des *L. major* Genoms im Jahr 2005 wurden Gene identifiziert, welche für knapp 8300 Proteine kodieren [127]. Diese Daten ermöglichten erstmals die Identifizierung und gezielte Herstellung einzelner *L. major*-spezifischer Proteine, die potentiell einzeln oder in Kombination an der protektiven Immunreaktion gegen diesen Parasiten beteiligt sind und als mögliche Vakzinkandidaten in Betracht gezogen werden können. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl bereits untersuchter *Leishmania*-spezifischer Proteine. Mehrere Leishmanien-Antigene - wie das Leishmanien-Oberflächen-Glykoprotein (gp) 63 oder Promastigoten-Oberflächen-Antigen (PSA)-2 wurden bereits DNA- oder Protein-basiert im Mausmodell auf ihre Immunogenität hin analysiert [11;16;129;130]. Sie induzierten schwächere bis stärkere Th1-Zellantworten *in vivo*, die mit erhöhten Frequenzen Antigen-spezifischer IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen und reduzierten Parasitenlasten einhergingen. Alle in Tabelle 1 aufgeführten Einzelproteine waren als Vakzine jedoch nur dazu befähigt, Immunität über einen kurzen Zeitraum zu induzieren (*reviewed* in [128]).

Vielfersprechend ist das bisher erste als Vakzin in Phase-I- und –II-Studien eingesetzte, rekombinante „Multiuntereinheiten-Protein“ Leish-111F. Es besteht aus den drei Komponenten *L. major*-Homolog des eukaryotischen Thiol-spezifischen Antioxidans (TSA), *L. major*-Stress-induzierbares Protein-1 (LmSTI1) sowie dem *L. braziliensis*-Elongations- und Initiationsfaktor (LeIF) und wurde den Studienteilnehmern in Kombination mit Monophosphoryl-Lipid A plus Squalen (MPL-SE) als Adjuvanz verabreicht. Derzeit laufen diese Studien mit gesunden Teilnehmern in Kolumbien [131] und Indien [132], CL-Patienten in Brasilien [133] sowie MCL-Patienten in Peru [134]. Erste Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Vakzinierung waren die Beobachtungen, dass es sich bei Leish-111F um eine sichere, gut verträgliche Vakzine handelt, die sowohl humorale als auch Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren scheint.

**Tab. 1: Auswahl untersuchter Antigene als Vakzinkandidaten.**

<i>Leishmania</i> -Oberflächen-Glykoprotein (gp) 63 [129;135]	<i>L. major</i> homologue of the eucaryotic thiol-specific antioxidant (TSA) [141;142]
Histon (H) 1 [136]	<i>L. major</i> homologue of the eucaryotic stress-inducible protein-1 (LmSTI1) [142]
Promastigoten-Oberflächen-Antigen (PSA)-2 [130;137]	<i>Leishmania</i> -Elongations- und Initiationsfaktor (LeIF) [56;143]
<i>Leishmania</i> homologue of receptors for activated C kinase (p36/LACK) [138-140]	Leish-111f [144]

Die vergleichsweise kostengünstige Herstellung rekombinanter Proteine nach Standardverfahren und der mögliche Einsatz definierter Proteinmengen in Kombination mit einem Adjuvanz machen Proteine zu attraktiven Vakzinkandidaten gegen die Leishmaniasis. Die Identifikation eines einzelnen spezifischen Proteins oder Peptids, das *in vitro* immunogene Kapazität aufweist und in Immunisierungsstudien *in vivo* eine protektive Th1/Tc1-Zell-vermittelte Immunantwort gegen *Leishmania* Parasiten initiiert, ist von höchster Priorität.

Neben Algorithmus-basierten *in silico*-Verfahren zur Vorhersage theoretisch geeigneter Proteine und Peptide ist das schrittweise manuelle Herunterbrechen von Leishmanien-Lysat in seine verschiedenen Antigen-Bestandteile sowie deren Charakterisierung *in vitro* und *in vivo* eine geeignete Vorgehensweise, um dem Ziel, einer Impfstoffgenerierung näher zu kommen.

### 2.4.2. Lösliches *Leishmania* Antigen (SLA)

Als „lösliches Leishmanien Antigen“ (SLA) wird *Leishmania*-Lysat aus *in vitro*-generierten Promastigoten bezeichnet. Es stellt ein komplexes Gemisch aller *Leishmania*-Antigene in Form degradierter Parasiten dar, das immunogene Eigenschaften aufweist.

Der Einsatz von SLA als Vakzine wurde bisher überwiegend in Mausmodellen untersucht. Im Jahr 1987 zeigten Phillip Scott und Kollegen erstmals einen schützenden Effekt empfindlicher BALB/c Mäuse gegen eine *L. major* Infektion, welche zuvor intraperitoneal (i.p.) mit einem löslichen, Membran-freien Parasitenextrakt behandelt worden waren [145]. Dabei entwickelten 89% der Tiere eine Leishmanien-spezifische Immunität, welche mit einer verstärkten T-Zellantwort und vermehrten Produktion von M $\Phi$ -aktivierenden Faktoren (MAF) einherging und sich, verglichen mit den Kontrollgruppen, in signifikant geringeren Hautläsionen äußerte.

Der Einsatz von Adjuvanzen als Wirkungsverstärker der Vakzinierung rückte im Laufe der Jahre immer mehr in den Fokus, um die Ausbildung protektiver Immunantworten zu unterstützen. So führte die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit SLA aus *L. major* Promastigoten in Kombination mit rekombinanten IL-12 (rIL-12) als Adjuvanz zum Kurzzeitschutz vor dermalen Läsionen und einer gesteigerten Produktion von Th1/Tc1-Zell-spezifischem IFN $\gamma$  in den dLK [128;146]. Der adoptive Transfer IL-12-transduzierter, *L. donovani*-SLA-gepulster DC in naive nu<sup>+</sup>/BALB/c-Mäuse induzierte ebenfalls hohe IFN $\gamma$ -Levels und führte nach Infektion mit *L. donovani* zu keiner Viszeralisierung der Parasiten in die Leber [53]. Mehrere Ansätze mit Adjuvanz-Trägersystemen wie Liposomen (Lip), in denen SLA eingekapselt vorliegt, sind bekannt und zeigen das Potential liposomaler Antigene als mögliche Vakzinierungsstrategie. BALB/c Mäuse, die mit Lip-SLA (aus *L. donovani* oder *L. major*) immunisiert worden waren, zeigten entscheidende Merkmale der Immunitätsentwicklung gegen eine Infektion mit derselben *Leishmania*-Subspezies. Dazu zählten die vermehrte Produktion des Th1/Tc1-Zell-spezifischen Zytokins IFN $\gamma$ , bei gleichzeitig vernachlässigbaren Levels der Th2/T<sub>reg</sub>-Zell-spezifischen Zytokine IL-4 sowie IL-10. Im Gegensatz zu den Kontrolltiergruppen wurden des weiteren kleinere Läsionen, verminderte Parasitenlasten, die gesteigerte Expression kostimulatorischer Moleküle auf APC, teilweise Anzeichen einer Hypersensitivität vom verspäteten Typ (DTH) sowie eine höhere IgG2a/IgG1-Ratio in den Seren gefunden [147-150].

Im humanen System wurde die Schutzwirkung von SLA bisher nur *ex vivo* mit aus *L. braziliensis*-infizierten Patienten isolierten PBMC analysiert [108]. Dabei wurden hohe Frequenzen IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-, IL-4/IL-10<sup>-</sup>-produzierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert neben einer verstärkten Freisetzung des Tumornekrosefaktors (TNF)- $\alpha$ .

Neben dem Effekt, dass SLA nur einen Kurzzeit-, jedoch keinen Langzeitschutz im Wirtsorganismus initiiert [139;151], gibt es weitere Gründe, die *Leishmania*-Lysat für die

Applikation als Vakzine in das humane System ungeeignet machen. Die schlechte Reproduzierbarkeit in der SLA-Präparation macht die Herstellung unter strengen klinischen Standards unzureichend. Bedingt durch die Variabilität der Leishmanien-Kulturen selbst (z.B. durch Genpolymorphismus), ist der Erhalt eines definierten, einheitlichen Produktes nicht gewährleistet.

Allerdings macht die Erkenntnis, dass einzelne mittels chromatographischer oder gelelektrophoretischer Verfahren erhaltenen Fraktionen von *L. major* Lysat in Immunisierungsstudien mit BALB/c Mäusen sehr unterschiedliches immunogenes Potential aufwiesen, SLA zu einem für weitere Analysen interessanten Antigenpool [152;153].

## 2.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung *L. major*-spezifischer Antigene als mögliche Vakzinkandidaten in der experimentellen murinen CL.

Zu diesem Zweck wird nachfolgend untersucht, inwieweit sich immunogenes Parasitenlysat (SLA) metazyklischer *L. major* Promastigoten mittels verschiedener Verfahren in seine Komponenten separieren lässt bei gleichzeitiger Erhaltung residualer reaktiver Eigenschaften. Im Fokus der Untersuchung stehen dabei die für die Heilung einer *L. major* Infektion relevanten CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren freigesetzte Zytokine sowie Immunisierungsstudien mit C57BL/6 Mäusen.

Einzelne reaktive Fraktionen der löslichen SLA-Bestandteile (*soluble proteins*, SP) werden anhand ihres Antigen-spezifisch induzierten Zytokin-Profiles *in vitro* massenspektrometrisch auf ihre Protein-Zusammensetzung hin analysiert. Identifizierte *L. major*-spezifische Proteine werden in Korrelation ihres quantitativen Vorkommens in reaktiven Fraktionen ausgewählt und rekombinant exprimiert. Untersucht wird neben dem reaktiven Potential der hergestellten Proteine in Restimulationsassays mit dLK-Zellen infizierter C57BL/6 Mäuse *in vitro* die protektive Kapazität gegen eine *L. major* Infektion in Immunisierungsstudien *in vivo*. Die Ermittlung von Proteintargets ermöglicht deren Einsatz als potentielle Vakzinkandidaten und trägt zu weiteren Erkenntnissen für die Vakzingerierung gegen diese Parasiten bei.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden separierte Antigene des humanpathogenen Parasiten *L. major* auf ihr immunogenes Potential hin getestet, *in vitro* eine dominante Th1/Tc1-Immunreaktion zu induzieren. In diesem Zusammenhang erfolgte neben Proliferationsassays der Nachweis CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-spezifischer Zytokine mit Hilfe von Restimulationsassays mit dLK-Zellen *L. major*-infizierter C57BL/6 Mäuse. In Immunisierungsstudien *in vivo* wurde zusätzlich die protektive Kapazität definierter Antigene gegen eine Infektion mit *L. major* untersucht. Für die Identifikation und spätere Charakterisierung *L. major*-spezifischer Antigene aus Promastigotenlysat (SLA) kamen verschiedene hintereinander geschaltete Verfahren zum Einsatz:

- Differentielle Zentrifugation zur Isolation der löslichen Proteine (SP) aus SLA
- Fraktionierung der SP in zwei Schritten mit verschiedenen Anionenaustauscherchromatographie-Säulen
- Identifikation der Proteine in reaktiven Fraktionen mittels *Label*-freier, quantitativer Massenspektrometrie
- Rekombinante Expression ausgewählter Proteinkandidaten für die *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung

#### 3.1. Reaktives Potential von SLA-Komponenten *in vitro*

Für die Identifikation immunogener *L. major*-spezifischer Antigene diente Parasitenlysat als Ausgangsmaterial, das aus hochinfektösen metazyklischen Promastigoten (hier:  $9,9 \times 10^{10}$  Parasiten) hergestellt worden war und mit Hilfe verschiedener Techniken systematisch in seine Bestandteile gesplittet wurde.

Um in einem ersten Schritt eine grobe Abtrennung der Parasitenbestandteile von den gelöst vorliegenden Komponenten zu erzielen, wurden einzelne Organellen (Nuklei, Mitochondrien sowie Membranproteine) mittels differentieller Zentrifugation nacheinander isoliert und in Tris-Puffer resuspendiert. Die final im Überstand vorliegenden löslichen Komponenten, nachfolgend als lösliche Proteine (SP) deklariert, wurden zusätzlich sterilfiltriert.

Die gewonnenen Organellen wurden nicht näher analysiert, jedoch ließen sich die als Nuklei bzw. Membranproteine bezeichneten Komponenten als weißliche Pellets isolieren. Die Mitochondrien-Fraktion wurde hingegen als braunes Pellet separiert.

Alle Fraktionen wurden in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit Tris-Puffer angesetzt und in einem Restimulationsversuch mit dLK-Zellen aus *L. major*-infizierten C57BL/6 Mäusen getestet.

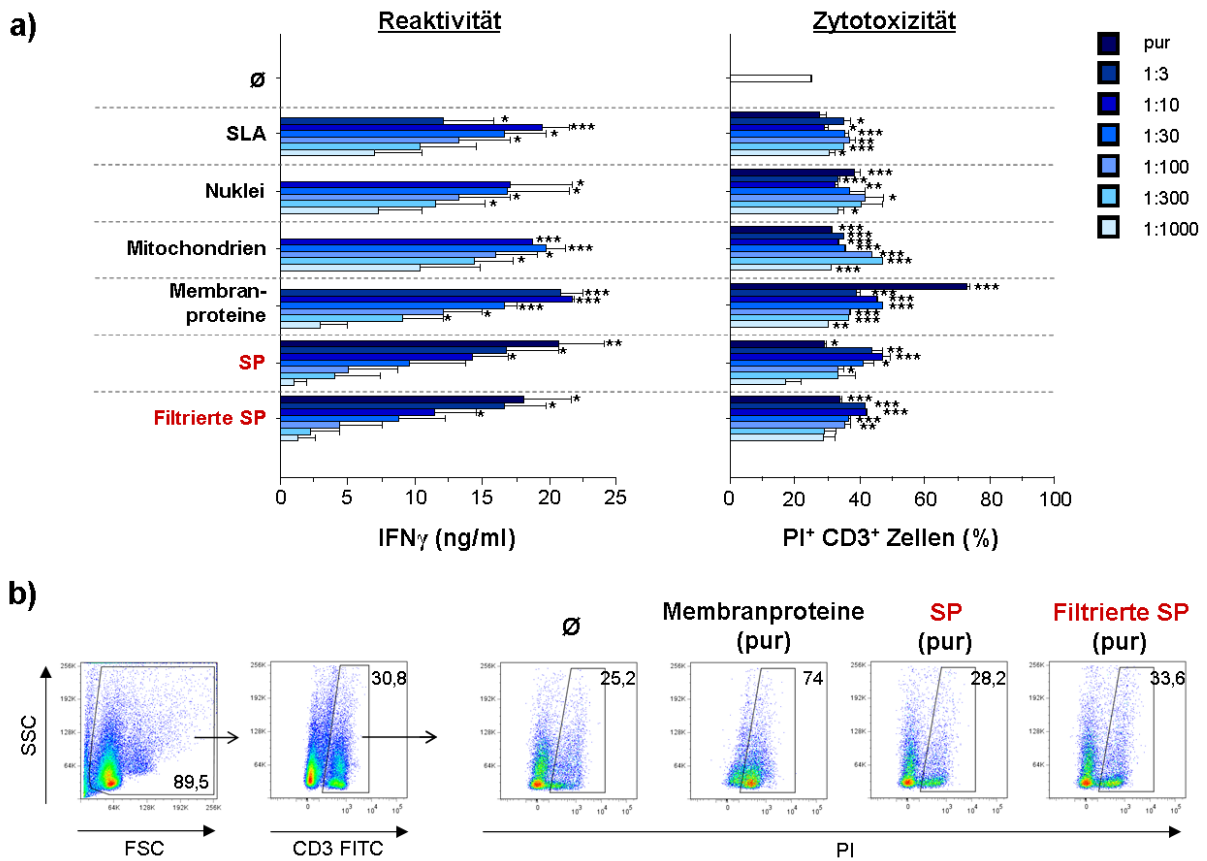
In den nachfolgenden *in vitro*-Assays wurde dabei gleichermaßen vorgegangen: Jeweils  $1 \times 10^6$  der isolierten dLK-Zellen wurden in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  zusammen mit 10  $\mu\text{l}$  der unterschiedlichen SLA-Proben Antigen-spezifisch restimuliert und inkubiert. Unstimulierte dLK-Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle. Nach 48 h wurde die Zytokin-Produktion mittels spezifischer ELISA in den Medienüberständen ermittelt.

Dargestellt wurde die T-Zell-Aktivität-induzierende Kapazität des Gesamtlysats und der verschiedenen SLA-Bestandteile in der Verdünnungsreihe in Form einer Th1/Tc1-vermittelten  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung *in vitro* in Zusammenhang mit der prozentualen Zytotoxizitätsrate (siehe Abb. 5a). Letztere wurde durch Färbung der  $\text{CD}3^+$  T-Zellen mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI) durchflusszytometrisch ermittelt (siehe exemplarische DotPlots in Abb. 5b).

Anhand des Th1-spezifischen  $\text{IFN}\gamma$ -Profils *in vitro* zeigte sich, dass Nuklei und restliche Parasitentrümmer, Mitochondrien, Membranproteine, SP sowie filtrierte SP gleichermaßen starke immunogene Eigenschaften aufweisen. Dabei war die  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung im Vergleich zu dem Ansatz unstimulierter dLK-Zellen signifikant erhöht.

Insgesamt nahm die Zytokin-Produktion mit steigender Probenverdünnung ab, was jedoch nicht mit der Toxizitätsrate korrelierte. Es lag eine durchschnittliche Rate von 24-45% toter  $\text{CD}3^+$  Zellen pro Ansatz vor. Lediglich die pur eingesetzten Proben der Membranproteine zeigten eine erhöhte Mortalitätsrate (75% PI-positiver  $\text{CD}3^+$  Zellen), womit sich die hier ausbleibende Zytokin-Produktion erklären ließe.

Der Fokus lag bei den nachfolgenden Versuchen bei den SP, die aufgrund ihrer Löslichkeit in definierten Proteinmengen einsetzbar waren.



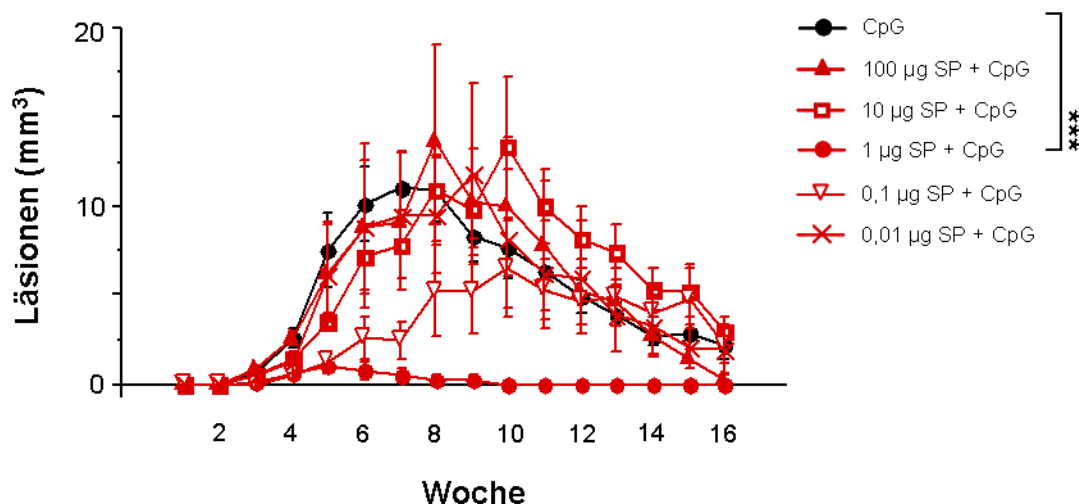
**Abb. 5: IFN $\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität von T-Zellen nach dLK-Restimulation mit SLA-Fraktionen der differentiellen Zentrifugation.** Nuklei, Mitochondrien, Membranproteine und lösliche Proteine (SP) wurden mittels verschiedener Zentrifugationsschritte des Parasitenlysats (SLA; 3,5 ml *L. major* Promastigoten-Pellet) separiert. Die Organellen wurden jeweils in einem adäquaten Volumen von 0,1-4,5 ml Tris-Puffer resuspendiert. Die SP lagen im Überstand vor und wurden zusätzlich durch einen 0,2  $\mu$ m-Filter filtriert. dLK von mit  $2 \times 10^5$  *L. major*-infizierten C57BL/6 Mäusen wurden nach 3-4 Wochen isoliert. Die 48 h-Restimulation von  $1 \times 10^6$  dLK-Zellen/200  $\mu$ l erfolgte mit jeweils 10  $\mu$ l der unterschiedlich verdünnten SLA-Suspensionen. a) Die IFN $\gamma$ -Freisetzung wurde mittels ELISA in den Medienüberständen nachgewiesen. Die Zytotoxizität von  $\alpha$ -CD3-FITC gelabelten T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch Färbung mit Propidiumiodid (PI; 1  $\mu$ g/ml) ermittelt. Dargestellt sind die Prozentsätze PI-positiver CD3<sup>+</sup> Zellen. Zu sehen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n \geq 2$  unabhängigen Ansätzen eines Experiments von insgesamt zwei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen SLA-Chargen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,002$  vs. unstimulierte Kontrolle (Ø)). b) Die Zytotoxizität wurde exemplarisch für einige Proben als DotPlot dargestellt.

### 3.2. Dosis- und Adjuvant-abhängiger protektiver Effekt von SP *in vivo*

#### 3.2.1. Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit SP *in vivo* und Parasitenlasten

Nachdem die filtrierte SP aus SLA bereits im dLK-Restimulationsassay *in vitro* ihr immunogenes Potential gezeigt hatten (siehe Abb. 5), wurde getestet, ob sich dieses ebenfalls *in vivo* in Form einer Schutzfunktion gegen die CL wiederfinden ließe.

Dafür wurden C57BL/6 Mäuse in einem *prime/boost/boost* (P/B/B)-Ansatz intradermal (i.d.) mit unterschiedlichen Mengen der SP (von 0,01 µg bis 100 µg) in Kombination mit 10 µg CpG 1826 als Adjuvant in ein Ohr immunisiert und eine Woche nach der letzten Injektion mit lebenden metazyklischen *L. major* Promastigoten in das andere Ohr infiziert. Es wurde hierbei die Niedrigdosis-Infektion gewählt und in den 16 nachfolgenden Wochen der Verlauf der Läsionsentwicklung am Infektionsort gemessen.



**Abb. 6: Läsionsvolumina SP-immunisierter, Niedrigdosis-infizierter C57BL/6 Mäuse.** C57BL/6 Mäuse wurden in einem P/B/B-Ansatz mit SP-Mengen von 0,01 µg (n=1 Experiment), 0,1 µg (n=1), 1 µg (n=2), 10 µg (n=3) bzw. 100 µg Protein (n=1) zusammen mit je 10 µg CpG 1826 intradermal in ein Ohr immunisiert. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Tiere in das kontralaterale Ohr mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten infiziert. Der Verlauf der Granulombildung am Infektionsort wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 16 Wochen gemessen und ist als Ellipsoid dargestellt. Als Negativkontrolle dienten Mäuse, denen nur das Adjuvant CpG injiziert worden war (Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $\geq 4$  Tieren pro Gruppe pro Experiment; \*\*\*  $p \leq 0,002$ ).

Neben einem für Resistenz-entwickelnde C57BL/6 Mäuse charakteristischen Krankheitsverlauf [34], zeigte sich ein stark Dosis-abhängiger protektiver Effekt der SP (siehe Abb. 6). Lediglich die mit 1 µg SP + CpG immunisierten Mäuse entwickelten nahezu keine Ohrläsionen. Im Gegensatz dazu lagen die Läsionsvolumina bei mit höheren sowie

niedrigeren SP-Dosen + Adjuvanz behandelten Tieren im Bereich der Läsionen der CpG-Negativkontrolltiere (mit Läsionsmaxima in den Wochen 6-10 nach Infektion). Lediglich die Immunisierung mit 0,1 µg SP kombiniert mit CpG hatte noch eine im Gegensatz zu der Negativkontrolle und den anderen SP-Dosen verminderte Läsionsentwicklung zur Folge.

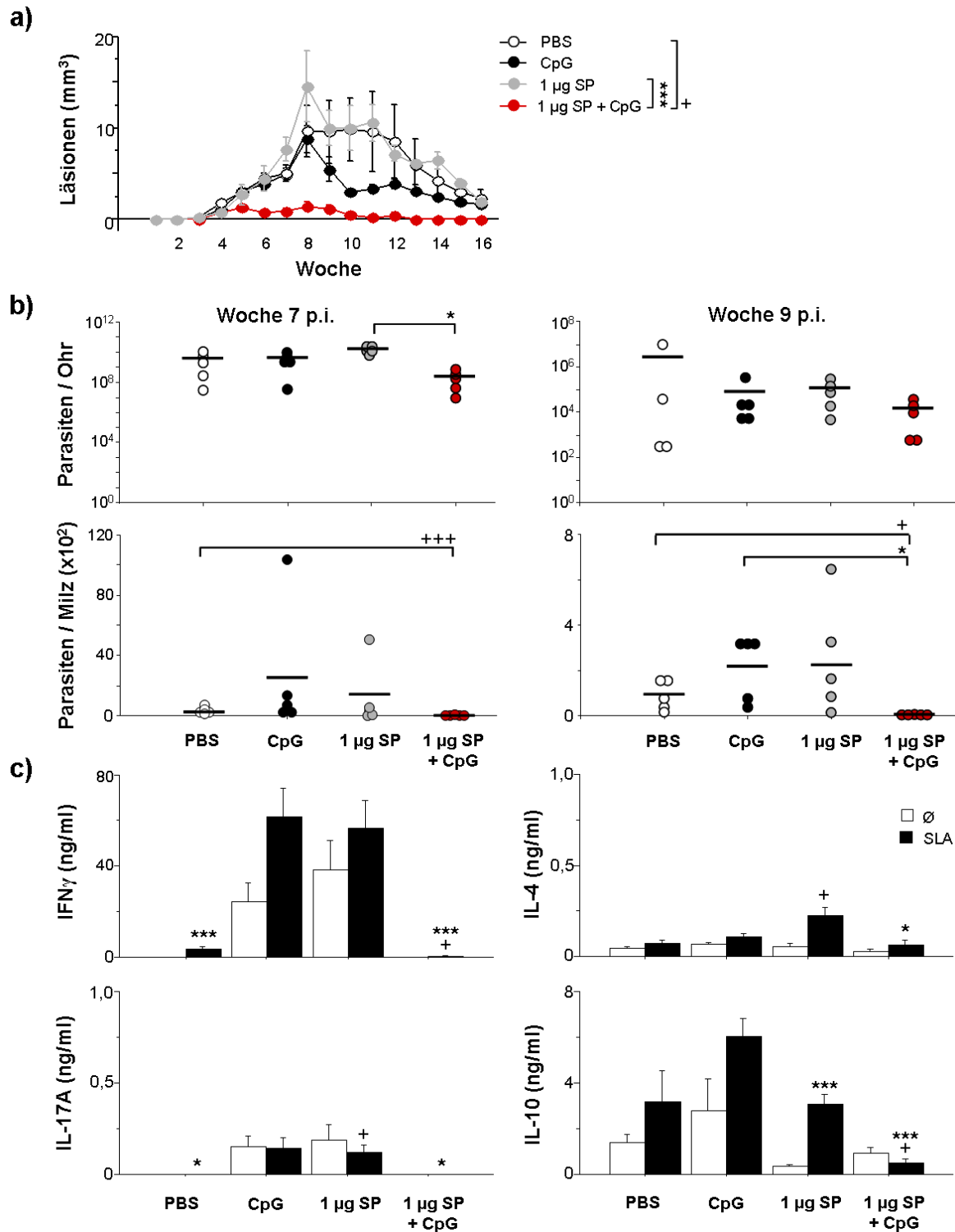
Die nahezu vollständige Unterdrückung der Läsionsausbildung bei den mit 1 µg SP und Adjuvanz behandelten Tiere zeigte, dass eine Schutzwirkung gegen die Infektion mit *L. major* Parasiten auch noch mit den separierten löslichen SLA-Komponenten gegeben ist. In den weiteren Immunisierungsexperimenten *in vivo* wurde diese SP-Dosis zusammen mit CpG als Adjuvanz daher stets als Positivkontrolle mitgeführt.

Inwieweit der schützende Effekt der SP von der additiven Gabe der Adjuvanz CpG abhängig ist, wurde nachfolgend untersucht.

Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäuse 3x i.d. mit 1 µg SP in An- bzw. Abwesenheit von CpG immunisiert und anschließend mit einer Niedrigdosis von *L. major* Promastigoten infiziert. Zum einen wurde der Krankheitsverlauf über einen Zeitraum von 16 Wochen verfolgt, zum anderen erfolgte die Organentnahme zu ausgewählten Zeitpunkten für eine nähere Analyse (siehe Abb. 7). Als Negativkontrolle dienten Tiere, denen PBS bzw. nur 10 µg CpG injiziert worden war.

Bei Mäusen, die mit 1 µg SP allein behandelt worden waren, zeigte sich eine mit der Negativkontrolle vergleichbare Granulombildung, die in Woche 8 ihr größtes Ausmaß erreichte (siehe Abb. 7a). Die Läsionsentwicklung bei mit SP + CpG als Adjuvanz immunisierten Tieren blieb nahezu aus (analog zu Abb. 6).

Für die Bestimmung der Parasitenanzahl in den immunisierten Tieren wurden in Woche 7 und Woche 9 nach Infektion jeweils Ohr und Milz der getöteten Mäuse entnommen.



**Abb. 7: Adjuvanz-abhängiger protektiver Effekt von SP *in vivo*.** C57BL/6 Mäuse wurden im P/B/B-Ansatz mit 1 µg SP +/- CpG als Adjuvanz intradermal in ein Ohr immunisiert. Als Kontrollgruppen dienten Tiere, denen entweder CpG allein oder PBS injiziert worden war. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte die Infektion mit 10<sup>3</sup> *L. major* Promastigoten in das kontralaterale Ohr. **a)** Die Läsionsvolumina wurden über 16 Wochen gemessen und sind als Mittelwerte dargestellt (n≥1 Experiment, ≥2 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt). **b)** Die Parasitenzahl in den Ohren und der Milz wurden nach 7 bzw. 9 Wochen nach Infektion (p.i.) mittels Titrationsserie bestimmt (n=1 je Zeitpunkt; ≥4 Mäuse pro Gruppe). **c)** Die Zytokin-Produktion nach 48 h Antigen-spezifischer dLK-Restimulation ist für Woche 7 p.i. dargestellt (n=5 Ansätze). Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± SEM dargestellt; \* p≤0,05, \*\*\* p≤0,002; „+“ vs. PBS-Gruppe, „“ vs. CpG- oder SP + CpG-Gruppe.

In dem Infektionsort war die Zahl der Parasiten der mit SP + CpG behandelten Mäuse im Vergleich zu den in Abwesenheit von CpG immunisierten Tieren in Woche 7 signifikant kleiner (siehe Abb. 7b). In Woche 9 war diese Beobachtung lediglich noch als Tendenz ersichtlich. Zu beiden Zeitpunkten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den Parasitenzahlen am Infektionsort, was die beiden Negativkontrolltiergruppen und die lediglich mit 1 µg SP behandelte Gruppe betraf. In Woche 9 war die Gesamtzahl der Parasiten durchschnittlich geringer im Vergleich zu dem früheren Zeitpunkt.

Die Bestimmung der Parasitenlasten in der Milz ist als Maß für die Viszeralisierung der *L. major* Infektion zu betrachten. Aufgrund des genetischen Hintergrundes der C57BL/6 Mäuse mit einer einhergehenden Th1/Tc1-Immunreaktion gegen *L. major* ist hier die Parasitenanzahl im Gegensatz zu der in den Ohren vorliegenden um ein Vielfaches geringer (siehe Abb. 7b). Keine Leishmanien fanden sich zu beiden Erntezeitpunkten in den Milzen der Tiergruppe, welche zuvor mit der protektiven Menge an SP in Kombination mit der Adjuvanz behandelt worden war.

Die zeitgleich mit den Ohren und Milzen geernteten dLK wurden Antigen-spezifisch mit SLA restimuliert und nach 48 h Inkubation die Zytokin-Produktion in den Medienüberständen mittels ELISA ermittelt. Dargestellt ist die Freisetzung der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 sowie IL-17A der in Woche 7 gewonnenen dLK-Zellen (siehe Abb. 7c). Alle vier Zytokine wurden signifikant vermindert von dLK-Zellen der geschützten Mäuse (1 µg SP + CpG Gruppe) produziert. Im Gegenzug wurden Th1-spezifisches IFN $\gamma$  und Th2-spezifisches IL-4 bzw. IL-10 vermehrt von T-Zellen der anderen Versuchstiergruppen hergestellt. Pro-inflammatorisches IL-17A wurde – ähnliche wie IL-10 - insgesamt in geringen Mengen produziert und lediglich für die CpG-Kontrollgruppe und die mit 1 µg SP ohne CpG behandelte Gruppe detektiert. Hier jedoch gleichermaßen in den unstimulierten sowie Antigen-spezifisch mit SLA restimulierten Ansätzen.

Insgesamt gesehen ging die ausbleibende Läsionsentwicklung nach einer Leishmanien-Infektion der mit 1 µg SP + Adjuvanz immunisierten C57BL/6 Mäuse mit verminderten Parasitenlasten in den Ohren und keinem *Leishmania*-Vorkommen in der Milz einher mit einer im Gegensatz zu den anderen Tiergruppen stark verminderten Zytokin-Produktion der dLK-Zellen. Bei fehlender Ko-Injektion von CpG als Adjuvanz wurden diese Effekte aufgehoben.

### 3.3. Die Immunisierung mit SP + CpG induziert T-Zellaktivität in C57BL/6 Mäusen

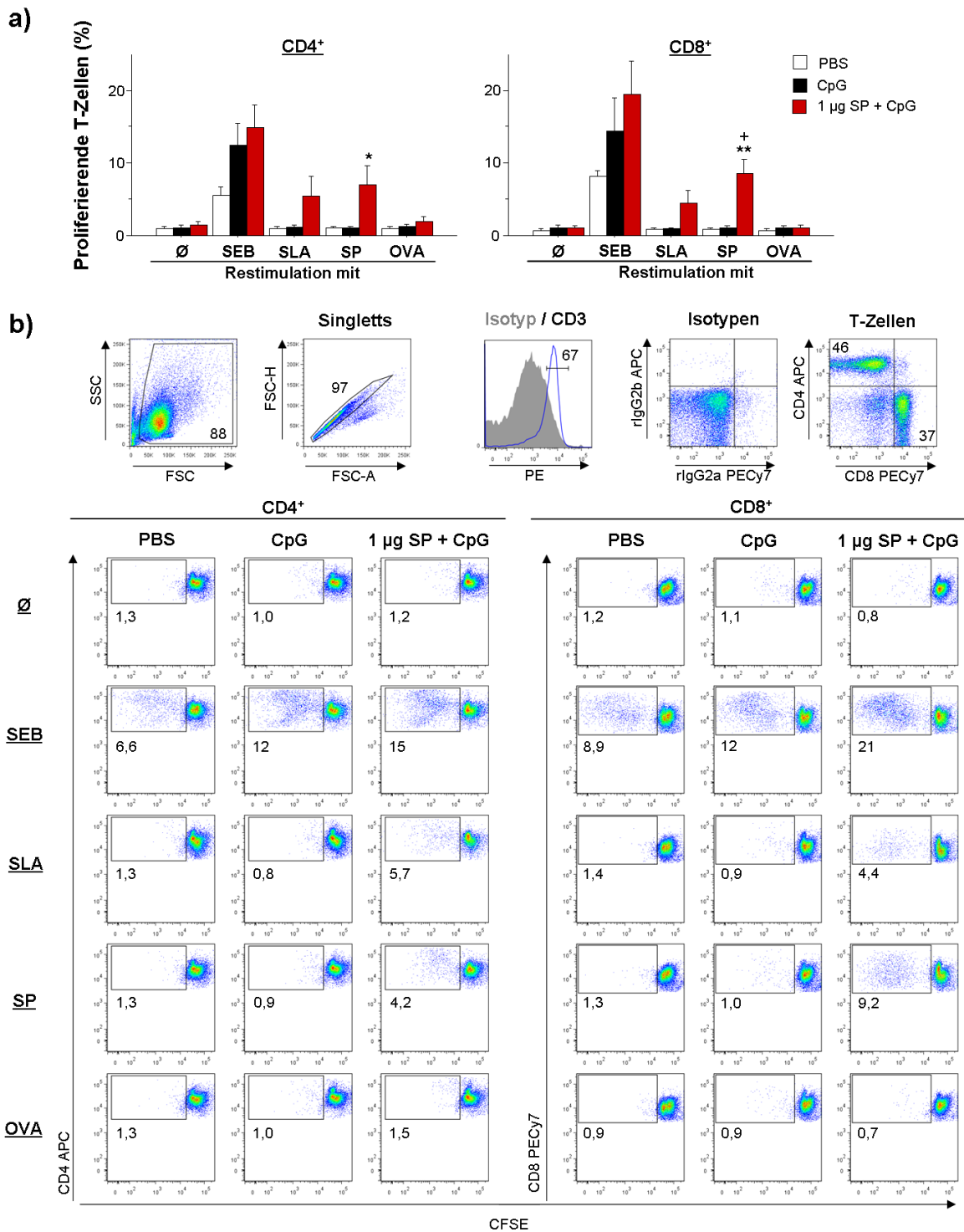
Um näher zu spezifizieren, inwieweit T-Zellen aus dLK geschützter immunisierter C57BL/6 Mäuse geprimt sind und sich *in vitro* Antigen-spezifisch stimulieren lassen, wurden die dLK von mit PBS, CpG bzw. 1 µg SP + CpG im P/B/B-Ansatz immunisierter Mäuse unmittelbar geerntet.

Zur Ermittlung der T-Zell-Proliferationsraten wurden die dLK-Zellen zunächst mit CFSE gelabelt und nach Zusatz verschiedener Stimulantien für 5 d inkubiert. Als Negativkontrollen dienten einerseits unstimulierte Zellen (∅), andererseits Ansätze, die Antigen-unspezifisch mit Ovalbumin (OVA; 100 µg/ml) [156] stimuliert wurden. Zur Überprüfung der Intaktheit der eingesetzten Zellen aller Versuchstiergruppen wurde zur polyklonalen Stimulation das Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB; 0,1 mg/ml) eingesetzt. Des Weiteren wurden die T-Zellen aus dLK Antigen-spezifisch mit Gesamtlysat (50 µg/ml SLA) und SP (50 µg/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung der T-Zellen mittels spezifischer FACS-Antikörper und durchflusszytometrische Messung der Proliferationsraten von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Die eingesetzten T-Zellen aus dLK aller Ansätze waren intakt und ließen sich mit Hilfe von SEB zu Proliferationsraten zwischen knapp 7% und 21% anregen (siehe Abb. 8a). Die durch Antigen-spezifische Restimulation mit SLA und SP erreichte Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ließ sich gleichermaßen nur für die Zellen aus mit SP + CpG immunisierten Mäusen detektieren. Im Falle der mit SP behandelten Ansätze waren die Proliferationsraten beider T-Zell-Subtypen dabei im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht und erreichten bis zu etwa 6% (siehe Abb. 8a). Die Anregung der T-Zellen zur Proliferation mittels SLA zeigte in diesem Ansatz, dass die lösliche Proteinfraction (SP) als Bestandteil des Gesamtlysats erkannt worden war.

Bei den Ansätzen der aus entweder mit PBS oder CpG behandelten Tieren lag die T-Zellproliferation bei jeweils unter 1,5% (mit Ausnahme der nach SEB-Zugabe erzielten Raten). T-Zellen aus mit SP immunisierten Mäusen, die unstimuliert oder zusammen mit OVA inkubiert worden waren, induzierten Proliferationsraten von bis zu 1,3% (siehe Abb. 8a).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Immunisierung mit 1 µg SP in Kombination mit einem Adjuvanz Antigen-spezifisch T-Zellen induzierte. Dabei wurden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert, welche gleichermaßen für die Ausheilung einer *L. major* Infektion von Bedeutung sind.



**Abb. 8: T-Zellproliferation nach Antigen-spezifischer Restimulation von CFSE-gelabelten dLK-Zellen immunisierter, nicht-infizierter C57BL/6 Mäuse.** In Woche -4, -3 und -1 wurde C57BL/6 Mäusen PBS, CpG bzw. 1 µg SP + CpG intradermal in ein Ohr injiziert. In Woche 0 erfolgte die Ernte der submandibulären dLK. dLK-Zellen wurden mit CFSE (1 µM) gelabelt und je  $1 \times 10^6$  Zellen/200 µl stimuliert und für 5 d inkubiert. Als Stimulantien dienen SEB (0,1 mg/ml), SLA, SP (je 50 µg/ml) und Ovalbumin (OVA; 100 µg/ml). Als Kontrolle blieben die Zellen unstimuliert (Ø). **a)** Die Proliferationsraten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt ( $n \geq 4$ ; +  $p \leq 0,05$  vs. PBS-Gruppe, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  vs. CpG-Gruppe). **b)** Die *Gating*-Strategie sowie je ein DotPlot pro Ansatz der FACS-Analyse, orientiert nach dem jeweiligen Isotypen, sind exemplarisch dargestellt.

In Zusammenhang mit der nahezu ausbleibenden Läsionsentwicklung nach Infektion (siehe Abb. 6 und Abb. 7) berechtigten diese Ergebnisse den weiteren Einsatz der SP aus Parasitenlysat als Quelle zur Identifikation einzelner immunogener *L. major*-spezifischer Antigene.

### **3.4. Auftrennung der SP mittels DEAE-Säule**

Um die löslichen Proteine als komplexes Gemisch aus verschiedenen *Leishmania*-spezifischen Komponenten weiter in ihre Bestandteile aufzutrennen, wurde die Methode der Anionenaustauscherchromatographie angewandt.

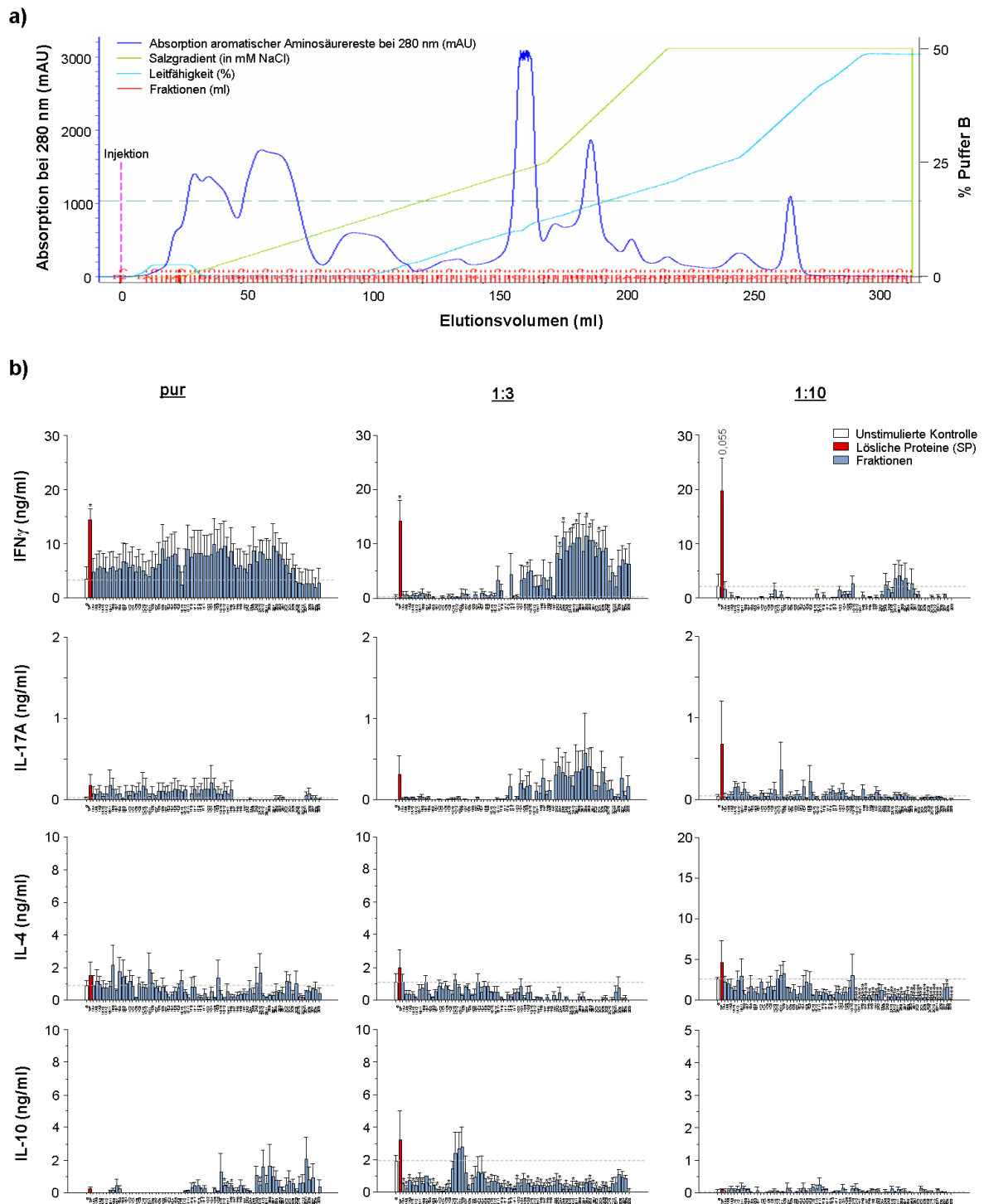
Diesem Trennprinzip liegt der Austausch negativ geladener Teilchen durch Verdrängung aus der Säulenmatrix zugrunde.

#### **3.4.1. Reaktive DEAE-Fraktionen induzieren die Th1/Tc1-spezifische IFN $\gamma$ -Produktion *in vitro***

Zunächst erfolgte die Fraktionierung von 34 mg filtrierter, reaktiver SP in 22 ml Tris-Puffer mittels einer DEAE-Säulenmatrix aus Diethylammoniummethyl (DEAE)-Cellulose.

Die Elution der Proteine erfolgte mit einem zunehmenden Salzgradienten bis zu maximal 500 mM NaCl (50% Puffer B). Durch die unterschiedlich anteiligen Ladungen war die Bindung der Proteine an die positiv geladenen Gruppen des Säulenmaterials unterschiedlich stark. Proteine mit überwiegend positiven Ladungen wurden im Austausch mit zugeführten Chloridionen (Cl<sup>-</sup>) daher schneller aus der Säule verdrängt als solche mit überwiegend negativ geladenen Seitengruppen. Das Chromatogramm zeigt die Menge an eluierten Proteinen des SP mit aromatischen Aminosäureresten in Form eines UV-Absorptionsspektrums bei 280 nm (blau) und in Abhängigkeit des angelegten Salzgradienten (grün; siehe Abb. 9a). Gesammelt wurden die Eluate in jeweils 2 ml-Fraktionen.

Zur Überprüfung des reaktiven Potentials einzelner Fraktionen *in vitro*, wurden diese in Tris-Puffer titriert. Um ein möglichst authentisches Verhältnis der in *L. major* natürlich vorliegenden Proteinanteile zu erhalten, wurde für die dLK-Restimulationsassays – ungeachtet der Proteinkonzentration - das gleiche Probenvolumen von 10  $\mu$ l eingesetzt. Die Detektion der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 sowie IL-17A in den Medienüberständen erfolgte schließlich nach 48 h Inkubation der Ansätze mit pur, 1:3- oder 1:10-vorverdünnt verwendeten DEAE-Fraktionen (siehe Abb. 9b).



**Abb. 9: Chromatogramm der Anionenaustauscherchromatographie von filtrierten SP aus SLA mittels DEAE-Säule und Untersuchung des Reaktivitätspotentials titrierter DEAE-Fractionen *in vitro*.** 22 ml verdünnte, gefilterte lösliche Proteine (SP) aus Promastigoten SLA wurden mit Hilfe der DEAE-Säule entsprechend ihrer Ladungen aufgetrennt. **a)** Das Chromatogramm zeigt die Menge an eluierten Proteinen in Form eines UV-Absorptionsspektrums bei 280 nm (blau). Die Elution der Proteine aus dem Säulenmaterial erfolgte mit zunehmendem Salzgradienten (grün). Es wurden 2 ml-Fractionen gesammelt (rot; n=1). **b)** Die Proteinfractionen wurden titriert und je 10  $\mu$ l zusammen mit  $1 \times 10^6$  dLK-Zellen aus Hochdosis-infizierten C57BL/6 Mäusen in 200  $\mu$ l Endvolumen inkubiert. Als Kontrollen dienten unstimulierte sowie mit SP restimulierte Ansätze. Die Produktion von IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-4 und IL-10 wurde mittels ELISA nach 48 h in den Medienüberständen nachgewiesen (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3; \* p $\leq$ 0,05).

Lediglich nach Antigen-spezifischer dLK-Restimulation mit den 1:3 verdünnten Fraktionen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zytokin-Freisetzung (siehe Abb. 5b). Insbesondere die durch hohe Salzkonzentrationen von 250 mM bis 500 mM eluierten DEAE-Fraktionen induzierten eine mit dem Ausgangsmaterial SP vergleichbar hohe Produktion von Th1/Tc1-spezifischem  $\text{IFN}\gamma$ . Die Produktion pro-inflammatorischen IL-17A war für diese Ansätze ebenfalls im Vergleich zu den Ansätzen mit den anderen 1:3-verdünnten Fraktionen erhöht. Während  $\text{IFN}\gamma$  durch Zugabe der pur eingesetzten Fraktionen nahezu gleichermaßen von T-Zellen aus dLK-Zellsuspensionen produziert worden war, hob sich dieser induzierende Effekt bei einer 1:10-Verdünnung der Fraktionen vollständig auf (siehe Abb. 9b).

Die mit einer Th2-spezifischen Reaktion assoziierten Zytokine IL-4 und IL-10 wurden hingegen bei allen Ansätzen lediglich in Konzentrationen detektiert, die denen der unstimulierten Kontrollen entsprachen (siehe Abb. 9b).

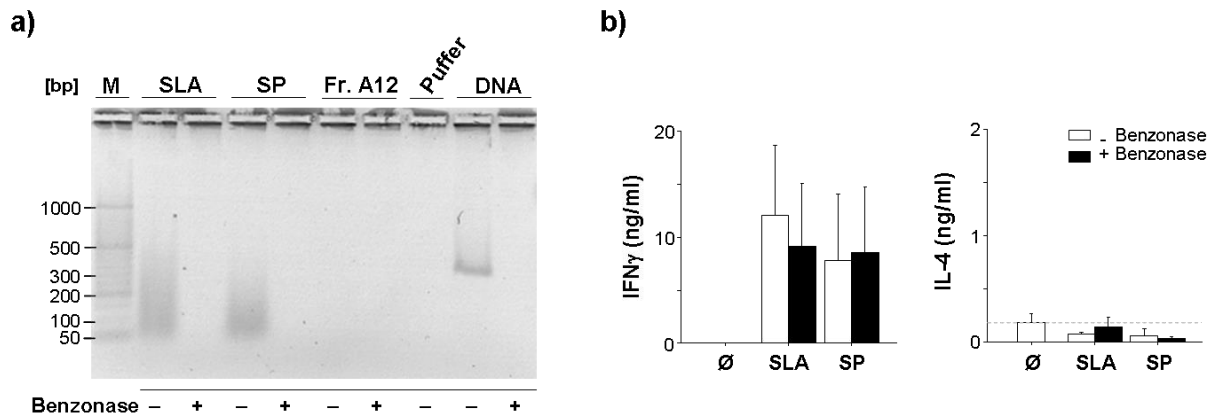
Aufgrund dieser *in vitro* gefundenen verbliebenen Reaktivität einzelner 1:3-verdünnter DEAE-Fraktionen, wurde im Folgenden ausschließlich mit dieser Verdünnung weiter gearbeitet. Da die eine vermehrte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion induzierenden Fraktionen erst zu einem späten Zeitpunkt chromatographisch eluiert worden waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um SP-Bestandteile mit überwiegend negativ geladenen Seitengruppen handelte (siehe Abb. 9a+b).

### **3.4.2. Nukleinsäuren haben keinen Einfluss auf das reaktive Potential der SP-Proben *in vitro***

Es ist bekannt, dass DNA als Vakzine der dritten Generation ebenfalls zu guter Schutzwirkung mit einhergehenden zellulären und humoralen Immunantworten *in vivo* führen können [154;155].

Um auszuschließen, dass die Th1/Tc1-vermittelte Reaktivität der spät eluierten DEAE-Fraktionen *in vitro* (siehe Abb. 9) durch verbliebene negativ geladene Nukleinsäure-Buchstücke bedingt ist, wurde ein enzymatischer Verdau von DNA und RNA durchgeführt. Entsprechend ihres bekannten Reaktivitätsmaximums wurden SLA, filtrierte SP nach der differentiellen Zentrifugation sowie die immunogene DEAE-Fraktion 1A12 in An- bzw. Abwesenheit des Enzyms Benzonase Nuklease 1:3 verdünnt eingesetzt. Alle Proben wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Für die Detektion der Nukleinsäuren wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der mit 1x Ladepuffer versetzten Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Tris-Puffer sowie ein DNA-Fragment von 300 bp Länge dienten als Kontrollen. Detektieren ließen sich die Nukleinsäuren im Gel schließlich unter Ultraviolett (UV)-Licht nach Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die vorliegenden Basen (siehe Abb. 10a).

Zur Überprüfung des Einflusses von DNA/RNA auf die Reaktivität der Parasiten-spezifischen Komponenten wurden je 10 µl der Ansätze mit (+) bzw. ohne (-) Benzonase für die *in vitro* Restimulation von dLK-Zellen aus *L. major*-infizierten C57BL/6 Mäusen eingesetzt. Unstimulierte dLK-Zellen dienten als Negativkontrolle (Ø) und die Freisetzung der Zytokine IFN $\gamma$  und IL-4 wurde nach 48 h in den Medienüberständen analysiert (siehe Abb. 10b).



**Abb. 10:** Testen des DNA/RNA-Einflusses auf die Reaktivität von *L. major*-spezifischen Komponenten. SLA, SP aus SLA sowie die DEAE-Fraktion 1A12 wurden entsprechend ihrer bekannten reaktiven Eigenschaften 1:3 mit Tris-Puffer verdünnt. Die Proben wurden dann zusammen mit Kontroll-DNA (300 bp) in Ab- bzw. Anwesenheit von Benzonase Nuklease (90 U/ml) für 6 h auf Eis inkubiert. **a)** Verdünnt wurden die so behandelten Proben 1:6 mit 6x Ladepuffer und anschließend auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief für 2 h bei 120 V. Detektiert wurden die Nucleinsäuren durch Inkubation des Gels für 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml). Die Banden ließen sich unter UV-Licht detektieren. Als Referenz dienten Banden einer DNA-Leiter (M). Dargestellt ist exemplarisch ein Gel-Bild von drei unabhängigen Gelelektrophorese-Experimenten. **b)** Nach der Inkubationszeit +/- Enzym wurden je 10 µl der Proben für die Restimulation von  $1 \times 10^6$  dLK-Zellen/200 µl mit  $2 \times 10^5$  *L. major*-infizierter C57BL/6 Mäuse eingesetzt. Nach 48 h Inkubation erfolgte die Detektion von IFN $\gamma$  und IL-4 in den Medienüberständen (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3).

In den SLA- und SP-Ansätzen ohne Benzonase waren Nucleinsäure-Bruchstücke in Form einer jeweiligen Schmierbande im Größenbereich von etwa 50-500 Basenpaaren (bp) detektierbar (siehe Abb. 10a). Der Anteil an Nucleinsäureresten war in der unverdauten DEAE-Fraktion 1A12 vernachlässigbar gering. Die Fragment-Größen lagen hierbei unterhalb der nachweisbaren Menge von 2-5 bp [159]. In Ansätzen mit Benzonase-Zusatz waren bei allen Proben keine Nucleinsäuren im Gel detektierbar, der enzymatische Verdau war erfolgreich (siehe Abb. 10a).

Die An- bzw. Abwesenheit von Nucleinsäuren hatte keinerlei Einfluss auf die Produktion von Th1-spezifischem IFN $\gamma$  und Th2-spezifischem IL-4 durch die in den dLK-Zellsuspensionen vorliegenden aktivierten T-Zellen. Dies wurde exemplarisch für die SLA und SP-Proben gezeigt (siehe Abb. 10b). In den Medienüberständen wurden jeweils vergleichbare Konzentrationen des schützenden Zytokins IFN $\gamma$  detektiert, während die IL-4-Produktion bei allen Ansätzen gleichermaßen gering ausfiel.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass verbliebene Nukleinsäuren keinen Einfluss auf die beobachtete Reaktivität der *L. major*-spezifischen Proben ausüben. Diese scheint hingegen allein auf die vorliegenden Proteine zurückzuführen zu sein.

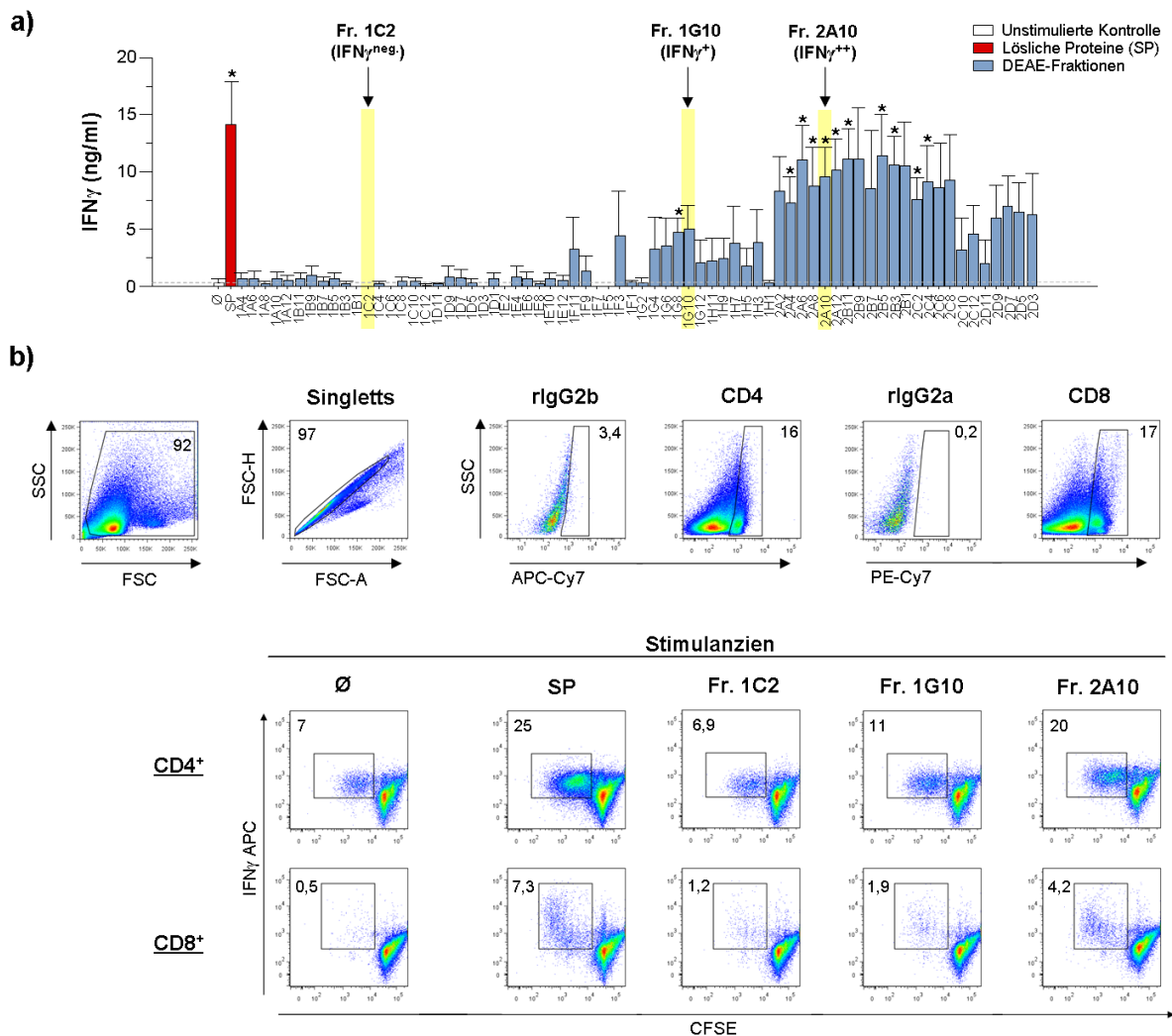
### 3.4.3. Fraktions-spezifische Induktion der T-Zell-Proliferation und intrazellulären Zytokin-Produktion *in vitro*

Die mittels ELISA nachgewiesene Kapazität der DEAE-Fraktionen *in vitro*, die Produktion von IFN $\gamma$  zu induzieren (siehe Abb. 9b), sollte mit Hilfe eines anderen Verfahrens untermauert werden. Dafür wurde die Induktion der T-Zellproliferation in einem Restimulationsassay *in vitro* mit CFSE-gelabelten dLK-Zellen infizierter Mäuse in Kombination mit einer anschließenden FACS-Färbung und durchflusszytometrischen Messung von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie intrazellulär produziertem IFN $\gamma$  angewandt. Dies diente als Nachweis, in welchem Ausmaß die beiden T-Zellsubtypen bei der Herstellung dieses Zytokins von Bedeutung sind.

Abb. 11a zeigt das vergrößerte IFN $\gamma$ -Profil 1:3-verdünnter DEAE-Fraktionen (vergleiche Abb. 9b). Die repräsentativ für keine (IFN $\gamma^{\text{negativ}}$ ), eine erhöhte (IFN $\gamma^+$ ) bzw. verstärkte (IFN $\gamma^{++}$ ) Produktion dieses Zytokins ausgewählten, zu testenden DEAE-Fraktionen 1C2, 1G10 bzw. 2A10 sind gelb hinterlegt.

Neben den aufgeführten 1:3-verdünnt eingesetzten Fraktionen als Stimulanzen dienten unstimulierte dLK-Zellen als Negativkontrolle und mit 1:3-verdünnten SP behandelte Zellen als Positivkontrolle (siehe Abb. 11b). Nach der dLK-Ernte *L. major* Hochdosis-infizierter C57BL/6 Mäuse wurden die hergestellten Zellsuspensionen zu einem Pool von  $146 \times 10^6$  dLK-Zellen vereint. Nach 4 d Restimulation wurden die gepoolten dLK-Zellen gleicher Behandlung unter Zugabe der Stimulanzen Phorbolmyristatactat (PMA; 50 ng/ml), Ionomycin (0,5  $\mu$ g/ml) sowie Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml) für weitere 5 h bis zur Cluster-Bildung inkubiert. Im Anschluss daran folgten die Markierung der T-Zellsubtyp-spezifischen Oberflächen, die intrazelluläre Markierung von IFN $\gamma$  mittels spezifischer Antikörper und die durchflusszytometrische Messung dieser Zellen. Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden - der jeweiligen Restimulation entsprechend - zur Proliferation angeregt (siehe Abb. 11b). Die prozentuale Rate sowie die absolute Zellzahl (#) proliferierender, IFN $\gamma$  produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag insgesamt bis zu 5,8x höher als die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Anteile der in der dLK-Zellsuspension vorliegenden T-Zellsubtypen war mit 16% für CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $\# 20,9 \times 10^6$ ) bzw. 17% ( $\# 22,2 \times 10^6$ ) detektierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen nahezu gleich. Höchste Proliferationsraten wurden jeweils durch Zugabe der SP (50  $\mu$ g/ml) erzielt: diese erreichten 25% für IFN $\gamma^+$ CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $\# 5,2 \times 10^6$ ) und 7,3% ( $\# 1,6 \times 10^6$ ) für IFN $\gamma^+$ CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 11b).

Die dem IFN $\gamma$ -Profil der dLK-Restimulation entsprechende Kapazität der ausgewählten DEAE-Fractionen zur Induktion der Zytokin-Produktion (siehe Abb. 11a) ließ sich durchflusszytometrisch bestätigen (siehe Abb. 11b).



**Abb. 11:** Kombinierte intrazelluläre IFN $\gamma$ -Produktion und Induktion der T-Zellproliferation durch dLK-Restimulation mit ausgewählten DEAE-Fractionen. Ausgewählte Proteinfractionen der Anionenaustauscherchromatographie von SP, die im dLK-Restimulationsassay *in vitro* die IFN $\gamma$ -Produktion unterschiedlich stark induzierten, wurden für die durchflusszytometrische Analyse exemplarisch eingesetzt. **a)** Dargestellt ist das IFN $\gamma$ -Profil der dLK-Restimulation, die gewählten Fractionen sind gelb markiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3; \* p $\leq$ 0,05; siehe Abb. 5b). **b)** dLK-Zellen von mit *L. major* Hochdosis-infizierten C57BL/6 Mäusen wurden mit CFSE (1  $\mu$ M) gelabelt und für 4 d zusammen mit den aufgeführten Stimulanzien inkubiert. Zum Nachweis der intrazellulären Produktion von IFN $\gamma$  erfolgte die Behandlung von  $5 \times 10^6$  dLK-Zellen pro Ansatz mit Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml), Ionomycin (0,5  $\mu$ g/ml) und PMA (50 ng/ml) für 5 h. Dargestellt ist die Gating-Strategie der FACS-Analyse, die IFN $\gamma$ -Produktion sowie die Proliferationsrate in Prozent (%) restimulierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (n=1).

Die mit Fraktion 2A10 restimulierten Ansätze wiesen vergleichbar hohe Raten proliferierender IFN $\gamma$ -bildender CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf wie sie nach Behandlung mit SP detektierbar waren. Etwa halb so hoch waren die Raten doppelt-positiv gefärbter CFSE-

gelabelter T-Zellen nach Restimulation mit Fraktion 1G10. Die Zytokin-Produktion der durch die DEAE-Fraktion 1C2 aktivierten CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag hingegen im Bereich der unstimulierten Kontrollansätze (siehe Abb. 11b).

Die verschiedenen DEAE-Fractionen zeigten unterschiedliches Potential, *in vitro* sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Proliferation anzuregen und deren IFN $\gamma$ -Produktion zu induzieren. Dabei zeigten die später eluierten Proteinfractionen (ab DEAE-Fraktion 2A2) eine besondere Relevanz für die Identifikation immunogener Antigene gegen Infektionen mit dem Parasiten *L. major*. Der Großteil des Zielzytokins IFN $\gamma$  wurde hierbei dominierend von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert.

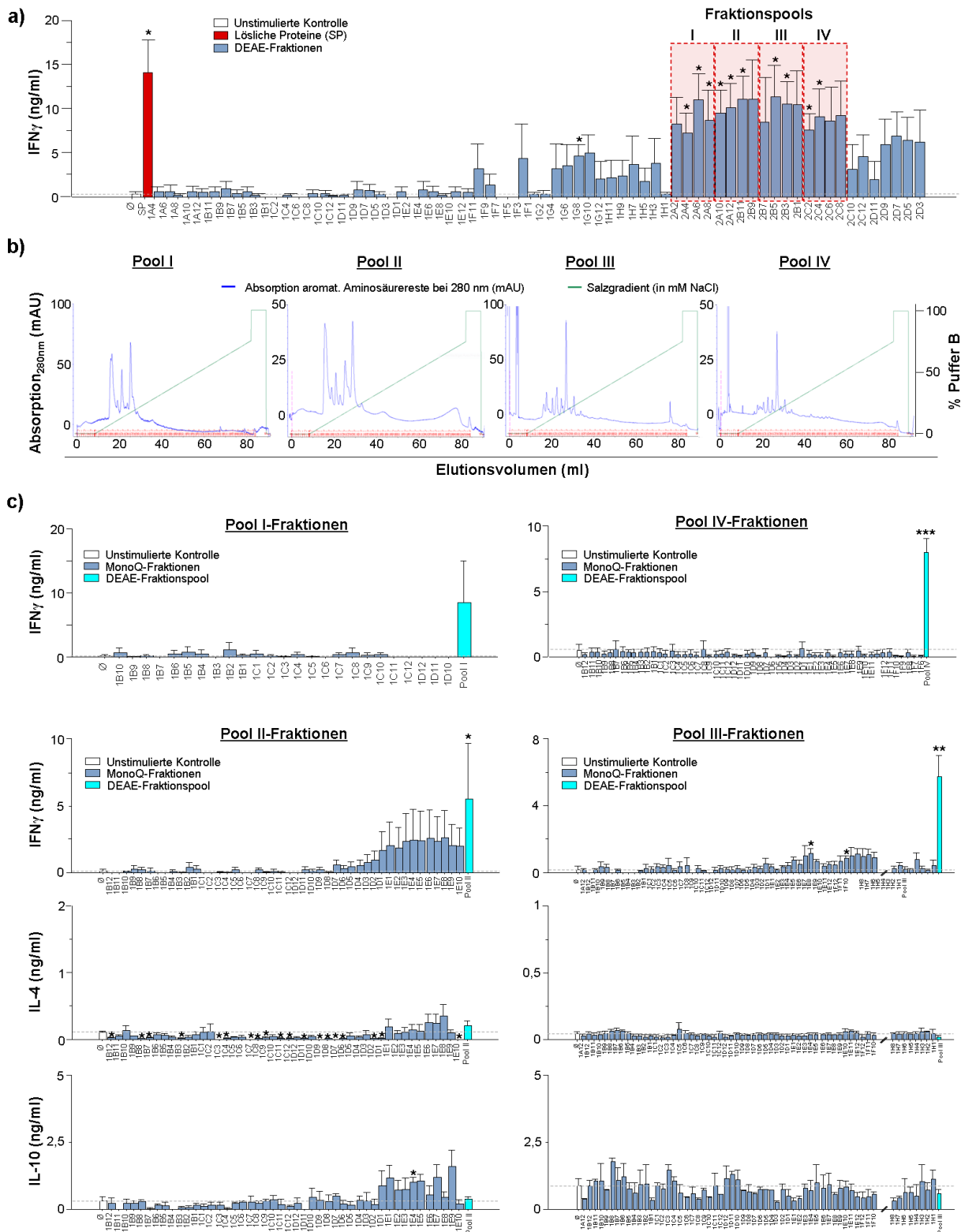
### **3.5. Auftrennung von Fraktionspools mittels MonoQ 5/50 GL-Säule**

#### **3.5.1. Residuale reaktive Eigenschaften einzelner MonoQ-Fractionen *in vitro***

Zur weiteren Analyse *in vitro* reaktiver Proteinfractionen der aufgetrennten SP (siehe Abb. 9, Abb. 11) wurden diese chromatographisch in ihre Bestandteile separiert. Zu diesem Zweck wurden aus den sechzehn DEAE-Fractionen 2A2 bis 2C8 vier Fraktionspools zusammengestellt (Pool I-IV rot hinterlegt; siehe Abb. 12a). Jeweils 1 ml wurde pro Fraktion eingesetzt, sodass insgesamt 4 ml einen Fraktionspool ausmachten.

Da bei der Anionenaustauscherchromatographie die Verdrängung der Proteine aus der Säulenmatrix mit einem ansteigenden Salzgradienten einhergeht, lagen in den DEAE-Fractionen zwangsläufig überschüssige Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>-Ionen vor. Um eine durch diese Ionen fälschlich beeinflusste Proteinelution in dem zweiten Chromatographie-Schritt mittels Anionenaustauschersäule zu vermeiden, wurden die Fraktionspools I-IV daher zunächst getrennt gegen Tris-Puffer dialysiert. Auf diese Weise wurde die Konzentration vorliegender Salzionen auf ein vernachlässigbares Maß reduziert.

Nach dem Beladen der MonoQ-Säule mit einem dialysierten Fraktionspool erfolgte die Elution der Proteine mit Hilfe eines flach ansteigenden Salzgradienten (grün; siehe Abb. 12b) bis zunächst auf 750 mM NaCl (75% Puffer B) und final mit der maximalen Konzentration von 1 M NaCl (100 % Puffer B). Dargestellt sind die Chromatogramme der separierten DEAE-Fraktionspools I, II, III und IV (siehe Abb. 12b). Die Menge an eluierten Proteinen wurde hier ebenfalls in Form eines UV-Absorptionspektrums bei 280 nm in Milliabsorptionseinheiten (mAU) detektiert (blau). Die Höhe der erhaltenen Peaks korrelierte dabei mit der eluierten Menge an aromatischen Aminosäurereste tragenden Proteinen. Es wurden 800  $\mu$ l-Fractionen der Eluate gesammelt.



**Abb. 12:** Auswahl von Fraktionspools für eine weitere chromatographische Fraktionierung mittels MonoQ-Säule. **a)** *In vitro* stark reaktive DEAE-Fraktionen wurden gepoolt (Pool I-IV, rot markiert; siehe Abb. 9) und **b)** nach erfolgter Dialyse mittels MonoQ-Säule erneut anionenaustauscherchromatographisch mit Hilfe eines zunehmenden Salzgradienten bis zu 1 M NaCl (100% Puffer B) aufgetrennt. Dargestellt sind die Chromatogramme der eluierten Proteine in Form von UV-Absorptionsspektren bei 280 nm. Es wurden 800  $\mu$ l-Fraktionen gesammelt. **c)** Getestet wurden die MonoQ-Fraktionen im Vergleich zu dem jeweiligen Ausgangsfraktionspool mittels dLK-Restimulationsassay *in vitro*. Die Freisetzung der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 in die Medienüberstände nach 48 h sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n $\leq$ 5; \* p $\leq$ 0,05).

Der Großteil der als Peaks detektierten Proteingemische wurde bereits von NaCl-Konzentrationen bis zu 250 mM aus der Säule verdrängt (siehe Abb. 12b), was auf einen größeren Anteil überwiegend positiver Ladungen der darin vorliegenden Aminosäurereste schließen ließ.

Je 10 µl der gesammelten Eluate wurden im Vergleich zu dem entsprechenden dialysierten Fraktionspool im dLK-Restimulationsassay *in vitro* auf ihre reaktiven Eigenschaften hin untersucht. Die Kapazität der aus Pool I und Pool IV gewonnenen Fraktionen, Antigen-spezifisch die Produktion von Zytokinen zu induzieren, war erschöpft. Im Gegensatz zu den mittels Gesamtpool I bzw. Pool IV induzierten hohen IFN $\gamma$ -Levels lagen bei ihnen die Konzentrationen des detektierten IFN $\gamma$  im Bereich der Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz; siehe Abb. 12c).

Einzelne MonoQ-Fraktionen nach Auftrennung der DEAE-Fraktionspools II und III zeigten *in vitro* hingegen restliches reaktives Potential. Vor allem die später eluierten Fraktionen waren noch befähigt, Antigen-spezifisch Konzentrationen des Th1/Tc1-spezifischen IFN $\gamma$  bis zu 5 ng/ml (Pool II-Fraktionen) bzw. bis zu 1,5 ng/ml (Pool III-Fraktionen) zu induzieren (siehe Abb. 12c). Zwar war die Freisetzung dieses relevanten Zytokins im Falle des gesamten DEAE-Pools II etwa doppelt so hoch und die des Gesamtpools III vierfach höher. Dennoch lag bei Ansätzen mit den spät eluierten MonoQ-Fraktionen die IFN $\gamma$ -Konzentration deutlich oberhalb der durch Restimulation mit den zu früheren Zeitpunkten eluierten MonoQ-Fraktionen erzielten (siehe Abb. 12c).

Dem genetischen Hintergrund der C57BL/6 Mäuse entsprechend lagen die Konzentrationen des Th2-spezifischen IL-4 für die Ansätze mit Fraktionen der Pools II und III im Bereich der unstimulierten Kontrolle (siehe Abb. 12c). Die Menge freigesetzten IL-10 war lediglich in Ansätzen der später eluierten MonoQ-Fraktionen des Fraktionspools II leicht erhöht, aber noch unterhalb von 2,5 ng/ml, während die anderen Fraktionen des Pools II sowie alle des Pools III im Konzentrationsbereich der unstimulierten Kontrolle lagen.

Insgesamt gesehen wiesen nur noch MonoQ-Fraktionen zweier der vier aufgetrennten DEAE-Fraktionspools *in vitro* reaktive Eigenschaften auf, welche sich in Form einer erhöhten T-Zellinduktion zur IFN $\gamma$ -Freisetzung äußerte. Die reaktiven MonoQ-Fraktionen der Pools II und III wurden nachfolgend verwendet, um sie massenspektrometrisch auf ihre Bestandteile hin zu analysieren.

### 3.6. Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteinfractionen

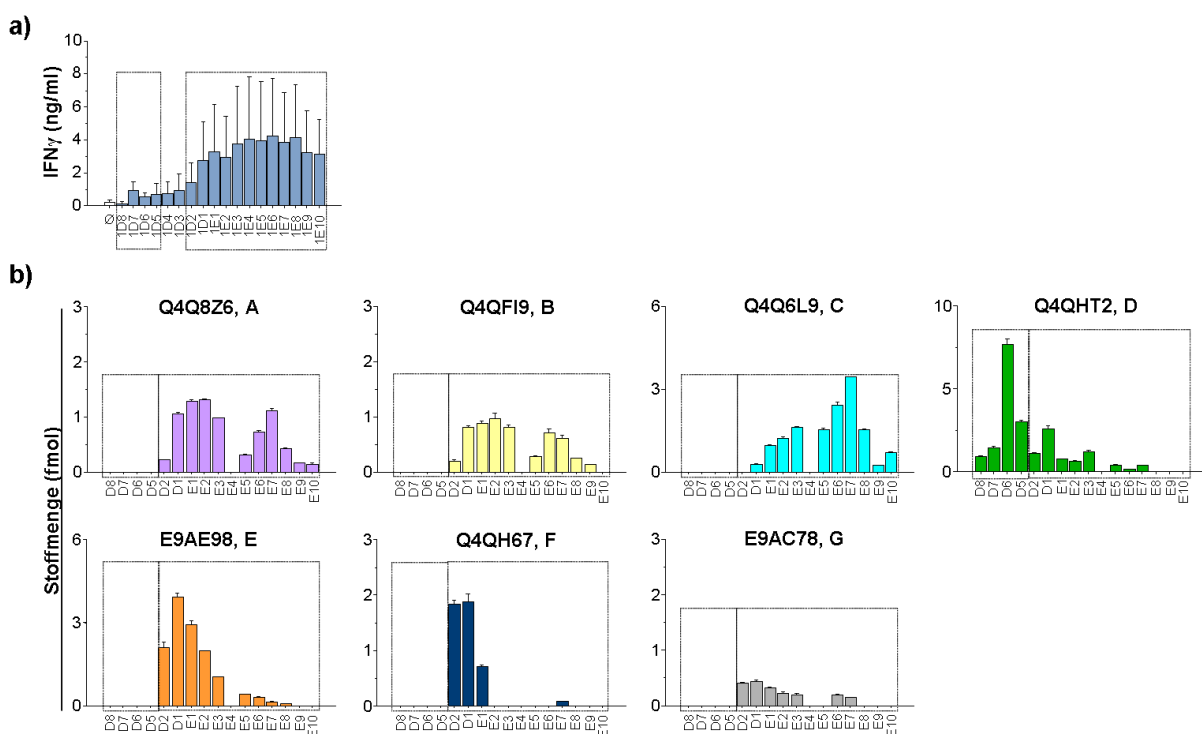
Zur Identifikation der vorliegenden Proteine wurden reaktive MonoQ-Fraktionen aus *L. major* Lysat (siehe Abb. 8) mittels *Label*-freier Massenspektrometrie untersucht. Durchgeführt wurden die Probenvorbereitung sowie die massenspektrometrische Messung

freundlicherweise von Herrn Dr. Stefan Tenzer, *Core Facility* für Massenspektrometrie (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz).

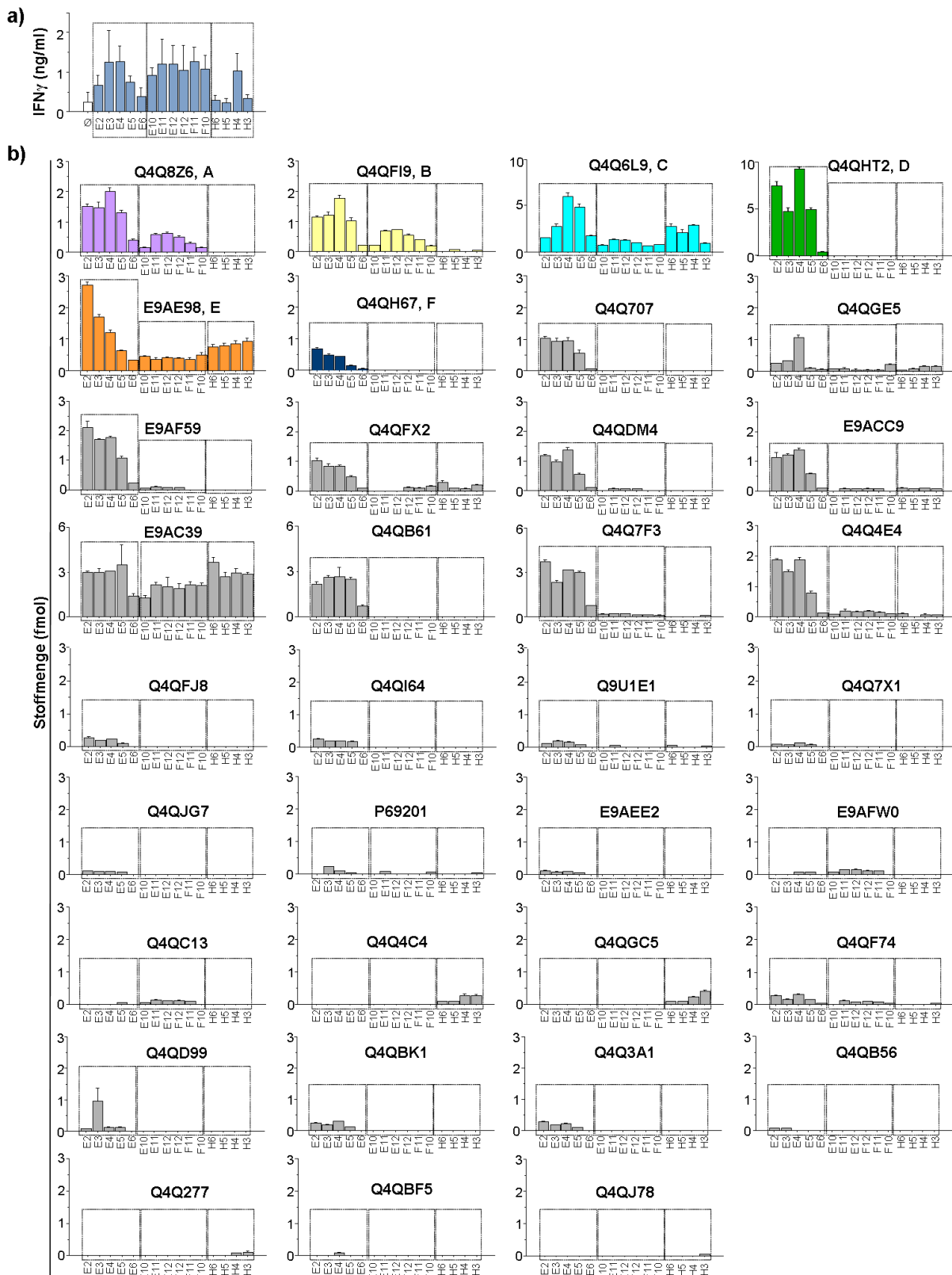
### 3.6.1. Identifikation *L. major*-spezifischer Proteine in reaktiven Fraktionen

Für die massenspektrometrische Analyse wurden 16 MonoQ-Fractionen des Pools II ausgewählt (Fraktion 1D8-1D5 und 1D2-1E10; umrahmt; siehe Abb. 13a), für den aufgetrennten Pool III waren es 15 reaktive MonoQ-Fractionen (Fraktion E2-E6, E10-F10 sowie H6-H3; umrahmt; siehe Abb. 14a).

Anhand eines mitgeführten Referenzproteins definierter Stoffmenge (hier: 5 fmol Hefe Enolase 1), ließen sich die Stoffmengen der in den Proben detektierten Proteine ermitteln. Die auf diese Weise berechneten Stoffmengen sind in Form von Balkendiagrammen, gesplittet nach Proteinen und ihrem Vorkommen in den einzelnen Fraktionen, dargestellt (siehe Abb. 13b, Abb. 14b). Mit Hilfe des hoch-sensitiven Massenspektrometers wurden Stoffmengen einzelner Proteine bis zu 10 fmol detektiert.



**Abb. 13:** Massenspektrometrische Detektion von *L. major*-spezifischen Proteinen in reaktiven MonoQ-Fractionen des DEAE-Pool II. **a)** Ausgewählte reaktive MonoQ-Fractionen wurden massenspektrometrisch auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=5$ ; umrandete Fraktionen; siehe auch Abb. 12c). **b)** Dargestellt sind die Stoffmengen der mittels *Label*-freier Massenspektrometrie detektierten einzelnen Proteine in den jeweiligen MonoQ-Fractionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=6$  Messungen pro Fraktion). Als Referenzprotein für die Berechnung der Stoffmengen diente eine definierte Stoffmenge von Enolase 1 aus *Saccharomyces cerevisiae*.



**Abb. 14:** Detektion von *L. major*-spezifischen Proteinen in reaktiven MonoQ-Fractionen des DEAE-Pool III mittels Massenspektrometrie. **a)** MonoQ-Fractionen des DEAE-Fractionspools III, die im dLK-Restimulationsassay *in vitro* eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion induzierten, wurden mittels Massenspektrometrie auf ihren Proteingehalt hin untersucht (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3; umrahmte Fractionen; siehe auch Abb. 12c). **b)** Die Stoffmengen der massenspektrometrisch detektierten Proteine in den jeweiligen MonoQ-Fractionen wurden anhand des Referenzproteins Hefe Enolase 1 berechnet und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=3 Messungen pro Fraction).

In MonoQ-Fractionen des Pools II ließen sich insgesamt 7 *L. major*-spezifische Proteine nachweisen (siehe Abb. 13b), in Fractionen des Pools III 35 (siehe Abb. 14b). Sechs der identifizierten Proteine ließen sich in den Fractionen beider Pools wiederfinden, was für deren reaktives Potential sprach. Jedem dieser sechs Proteine wurde eine Farbe zwecks Wiedererkennungswert zugeordnet und die Deklaration erfolgte der Übersichtlichkeit halber nachfolgend als Protein A-F (siehe Abb. 13b, Abb. 14b).

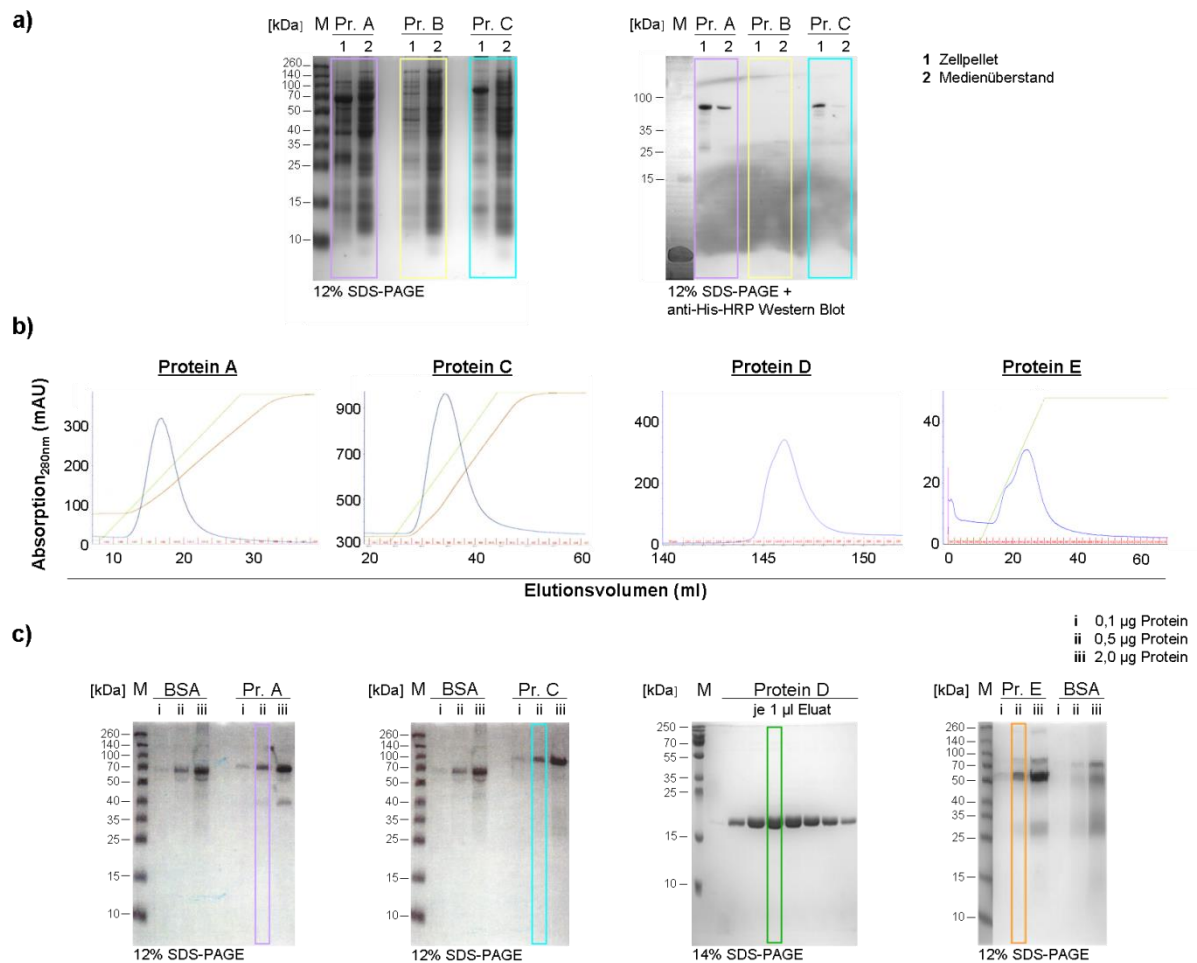
Der Korrelation zwischen der Stoffmenge einzelner Proteine (siehe Abb. 13b, Abb. 14b) und deren Fraktions-spezifischer Reaktivität in Form des *in vitro* induzierten IFN $\gamma$ -Profils (siehe Abb. 13a, Abb. 14a) entsprechend, wurden einzelne Proteinkandidaten für die Herstellung zur weiteren Charakterisierung *in vitro* sowie *in vivo* ausgewählt. Besonders gut korrelierten dabei für Fractionen beider Pools die jeweiligen Profile der Proteine A, B, C und E. Protein D wurde hingegen exemplarisch für eine weniger gute Korrelation dieser Aspekte mitgeführt.

### 3.7. Proteintargets als potentielle Vakzinkandidaten

#### 3.7.1. Rekombinante Expression ausgewählter *L. major*-spezifischer Proteine

Die rekombinante Expression der Parasiten-spezifischen Proteine erfolgte im Falle der Proteine A, B, C und E durch die Firma *Trenzyme* (Konstanz), im Falle des Proteins D freundlicherweise durch Frau Dr. Danielle Arnold-Schild (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz). Als Expressionssystem wurden *Escherichia (E.) coli* Bakterien eingesetzt und die Proteine für die anschließende Reinigung aus den Kulturansätzen mit einem Polyhistidin-*tag* (9xHis- bzw. 6xHis-*tag*) hergestellt.

Abb. 15a zeigt die induzierte Proteinexpression nach Beendigung der *E. coli*-Kulturansätze für die Proteine A, B und C. In den lysierten Bakterienpellets sowie den dazugehörigen Kulturmedienüberständen waren nach Auftragung auf ein Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*; SDS)-Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Färbung viele Proteinbanden verschiedener Größe (zwischen 10 kDa und 260 kDa) detektierbar. Charakteristische Proteinbanden von 80-90 kDa Größe ließen sich hingegen nur für die Proteinkandidaten A und C mittels spezifischer anti-His-HRP Antikörper – dort überwiegend in den Zellpellets – auf einer Western Blot-Membran nachweisen (siehe Abb. 15a).



**Abb. 15: Rekombinante Expression und Reinigung ausgewählter Proteinkandidaten.** Die sowohl in dem Fraktionspool II als auch Pool III massenspektrometrisch detektierten Proteine A-E wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. **a)** Zu sehen ist die Proteinexpression der jeweils N-terminal mit einem His-tag markierten Kandidaten A, B und C nach Auftragung der entsprechenden *E. coli* Pellets nach Beendigung der Kultivierung bzw. der Medienüberstände in ein SDS-Gel. Die exprimierten Proteine ließen sich nach kolloidaler Coomassie-Färbung detektieren. Spezifische Proteinbanden wurden mittels anti-His-HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) Antikörper auf einer Western Blot-Membran sichtbar gemacht. **b)** Dargestellt sind die Chromatogramme nach affinitätschromatographischer Reinigung der erfolgreich exprimierten Proteine A, C, D und E in Form eines UV-Absorptionsspektrums eluierter aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm. Eluiert wurden die His-tagged Proteine mit Hilfe einer zunehmenden Imidazol-Konzentration. **c)** Die gesammelten Proteinfractionen wurden mittels SDS-Gel und Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit hin untersucht. Gezeigt sind die Gelbilder der Targets A, C, D und E. Als Kontrolle dienten definierte Mengen des Rinderserumalbumins (*bovine serum albumin*, BSA). Die Bilder zu den Proteintargets A-C und E wurden von der Firma *Trenzyme GmbH* (Konstanz), die Abbildungen zu Protein D freundlicherweise von Frau Dr. Danielle Arnold-Schild (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

Um die gewünschten Zielproteine aus dem jeweiligen Pool aller exprimierten Proteine zu isolieren, wurden die hergestellten *E. coli*-Suspensionen affinitätschromatographisch gereinigt. Die Chromatogramme der Reinigung der erfolgreich exprimierten Proteine A, C, D und E sind in Form von UV-Absorptionsspektren aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm dargestellt (blau; siehe Abb. 15b). Die Elution der Proteine erfolgte durch Verdrängung aus

dem Trägermaterial mit zunehmenden Konzentrationen des Histidin-Strukturanalogons Imidazol.

Zur Reinheitsüberprüfung der eluierten Proteinkandidaten wurden entweder definierte Proteinmengen (siehe Protein A, C sowie E) oder definierte Volumina der gesammelten Proteinfractionen (siehe Protein D) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Behandlung mit Coomassie-Färbelösung zeigten sich für die jeweiligen Proteinkandidaten einzelne Proteinbanden charakteristischer Größe (siehe Abb. 15c). Die reinen, in Lösung vorliegenden Proteine A, C, D und E wurden dann in den nachfolgenden Versuchen auf ihre immunogenen Eigenschaften hin getestet.

Die Synthese von Kandidat B verlief nicht erfolgreich. Mit über 100 kDa Größe handelt es sich dabei um ein sehr großes Protein mit vielen repetitiven Sequenzabschnitten (siehe Anhang), welche möglicherweise zu einem verfrühten Expressionsabbruch durch die Bakterien führten. Neue Ansätze mit anderen *E. coli*-Stämmen als Expressionswirte waren hingegen zwar erfolgreich (Mitteilung von Dr. Sebastian Krause, Invigate GmbH, Jena; Bestätigung mittels massenspektrometrischer Analyse durch Dr. Stefan Tenzer, Mainz), jedoch erwies sich dabei die Reinigung des Proteins als schwierig. Im SDS-Gel zeigten sich neben der charakteristischen *full-length*-Proteinbande unter reduzierenden Bedingungen mehrere kleinere Proteinbanden, bei denen es sich um Abbruchprodukte oder interagierende bakterielle Proteine handeln könnte (Mitteilung von Herrn Dr. Sebastian Krause; nicht gezeigt). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen verschwanden diese zusätzlichen Banden, was auf eine Zusammenlagerung mit dem Zielprotein schließen ließ (Mitteilung von Herrn Dr. Sebastian Krause). Der hohe Anteil an Cystein-Resten in der Aminosäuresequenz von Protein B, der die Neigung zur Bildung von Disulfidbrückenbindungen fördert, macht diese Vermutung wahrscheinlich. Eine weitere massenspektrometrische Analyse der Eluate soll zukünftig Aufschluss über die Herkunft der vorliegenden Proteine geben. Aufgrund dieser Problematik stand Protein B für weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

### 3.7.2. Protein-spezifisches reaktives Potential *in vitro*

Zunächst wurden die rekombinanten Proteine A, C, D und E in dLK-Restimulationsassays *in vitro* auf ihr T-Zell-aktivierendes Potential hin analysiert.

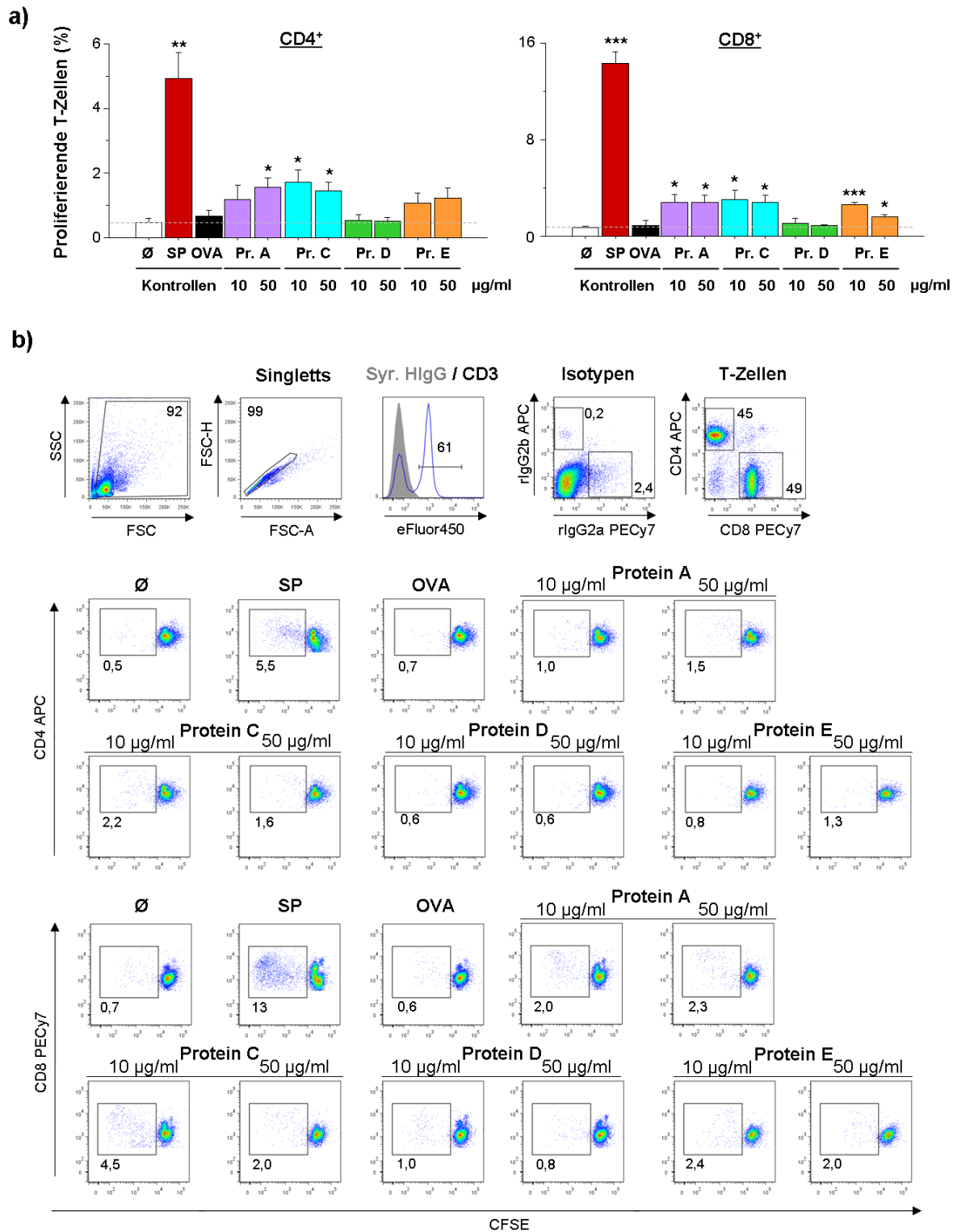
Zu diesem Zweck wurden CFSE-gelabelte dLK-Zellen *L. major*-infizierter, ausgeheilter C57BL/6 Mäuse Antigen-spezifisch mit Konzentrationen der Einzelproteine von 50 µg/ml bzw. 10 µg/ml restimuliert. Als Positivkontrolle dienten Ansätze, die mit SP (50 µg/ml) versetzt worden waren. Unstimulierte dLK-Zellen sowie die Antigen-unspezifische Restimulation mit Ovalbumin (OVA; 50 µg/ml) dienten als Negativkontrollen. Nach 5 Inkubationstagen wurden die Proliferationsraten der spezifisch mit FACS-Antikörpern markierten T-Zellsubtypen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Abb. 16).

Die Proteinkandidaten A, C und E induzierten eine nahezu gleichermaßen starke Proliferation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 16). Erzielt wurden hierbei durchschnittliche Raten von 1-2% für CD4<sup>+</sup> bzw. 2-4% für CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation. Durch den Einsatz der beiden verschiedenen Proteinkonzentrationen zeigte sich dabei kein wesentlicher Unterschied.

Am höchsten waren die Proliferationsraten beider T-Zellsubtypen nach Inkubation mit den SP aus SLA (Positivkontrolle; siehe Abb. 16a+b). Dieser Unterschied war im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen hochsignifikant.

Protein D war als einziger Proteinkandidat nicht dazu befähigt, die Proliferation beider T-Zellsubtypen zu induzieren. Hierbei lagen die Raten proliferierender CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Mittel bei kleiner gleich 1%, was dem Ausmaß der beiden Negativkontrollansätze gleichkam (siehe Abb. 16a).

In Abb. 16b sind exemplarisch die *Gating*-Strategie sowie DotPlots der durchflusszytometrischen Messung einzelner Stimulationsansätze für einerseits CD4<sup>+</sup> und andererseits CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt.



**Abb. 16: Induktion der T-Zellproliferation durch Protein-spezifische Restimulation von dLK-Zellen ausgeheilter *L. major*-infizierter C57BL/6 Mäuse.** Aus nach Infektion mit *L. major* Promastigoten ausgeheilten C57BL/6 Mäusen wurden dLK entnommen. Die dLK-Zellen wurden mit CFSE gelabelt (1 µM) und zusammen mit SP oder OVA (je 50 µg/ml) bzw. den Proteinen A, C, D oder E in Endkonzentrationen von je 50 µg/ml bzw. 10 µg/ml in dem Restimulationsassay eingesetzt. Nach 5 d Inkubation wurden die Proliferationsraten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. a) Die prozentualen Anteile beider proliferierender T-Zellsubtypen sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt (n=3; \* p≤0,05, \*\* p≤0,005, \*\*\* p≤0,002 vs. unstimulierte Kontrolle). b) Ein exemplarisches Experiment der FACS-Analyse wird für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt.

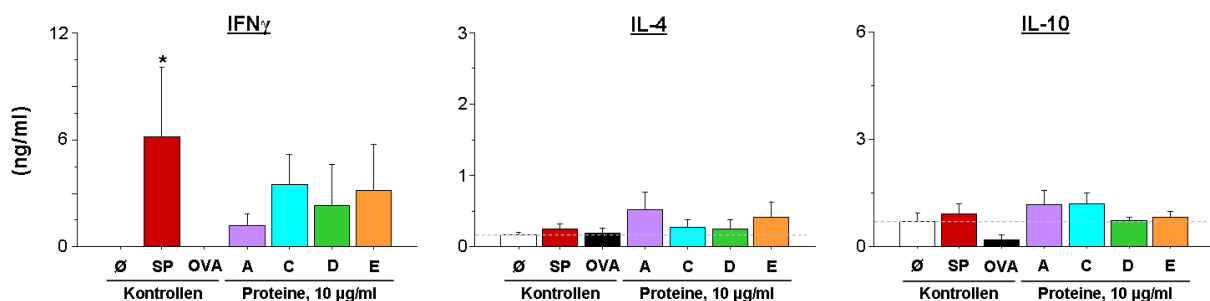
Aufgrund der Beobachtung, dass die Zugabe von 10 µg/ml bzw. 50 µg/ml des jeweiligen Proteins keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Induktion der T-Zellproliferation *in vitro* mit sich führte, wurde in den nachfolgenden Assays mit der geringeren Konzentration weiter gearbeitet.

Des Weiteren wurde mittels dLK-Restimulationsassay und ELISA getestet, inwieweit die 4 *L. major*-spezifischen Proteine die Freisetzung der relevanten Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 sowie IL-10 durch die vorliegenden T-Zellen induzierten (siehe Abb. 17).

Neben der Antigen-spezifischen Restimulation mit 10 µg/ml der rekombinanten Proteine A, C, D bzw. E wurden auch hierbei Ansätze mit SP als Positivkontrolle sowie unstimulierte bzw. unspezifisch mit OVA-stimulierte dLK-Zellen als Negativkontrollen eingesetzt.

Die durchschnittlich detektierte Produktion der Th2- bzw. T<sub>reg</sub>-spezifischen Zytokine IL-4 bzw. IL-10 lag für alle Ansätze mit Einzelproteinen sowie SP unter 1 ng/ml, was dem Konzentrationsbereich der durch die Negativkontrollen induzierten niedrigen Zytokin-Levels entsprach.

Durch Einzelprotein-spezifische Restimulation der dLK-Zellen war die Produktion des Th1/Tc1-spezifischen IFN $\gamma$  hingegen für alle Ansätze der zu untersuchenden Proteinkandidaten im Gegensatz zu den Negativkontrollen gesteigert (siehe Abb. 17).



**Abb. 17: Zytokin-Produktion nach Protein-spezifischer Restimulation von dLK-Zellen ausgeheilter *L. major*-infizierter C57BL/6 Mäuse.** Je  $1 \times 10^6$  dLK-Zellen aus *L. major*-infizierten ausgeheilten C57BL/6 Mäusen wurden in 200 µl Endvolumen Antigen-spezifisch mit SP, Antigen-unspezifisch mit OVA oder den Proteinen A, C, D und E (10 µg/ml) für 48 h restimuliert oder blieben unstimuliert (Ø). Der Nachweis von freigesetztem IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 erfolgte mittels ELISA in den Medienüberständen (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=4; \* p $\leq$ 0,05).

Fasst man diese beiden *in vitro*-Assays zusammen, lässt sich feststellen, dass die rekombinanten Proteine A, C und E Potential aufweisen, Protein-spezifisch T-Zellen aus dLK-Zellen *L. major*-infizierter Mäuse zu aktivieren. Dies zeigte sich in erhöhten Proliferationsraten von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 16) sowie der vermehrten Bildung des protektiven Schlüsselzytokins IFN $\gamma$  (siehe Abb. 17).

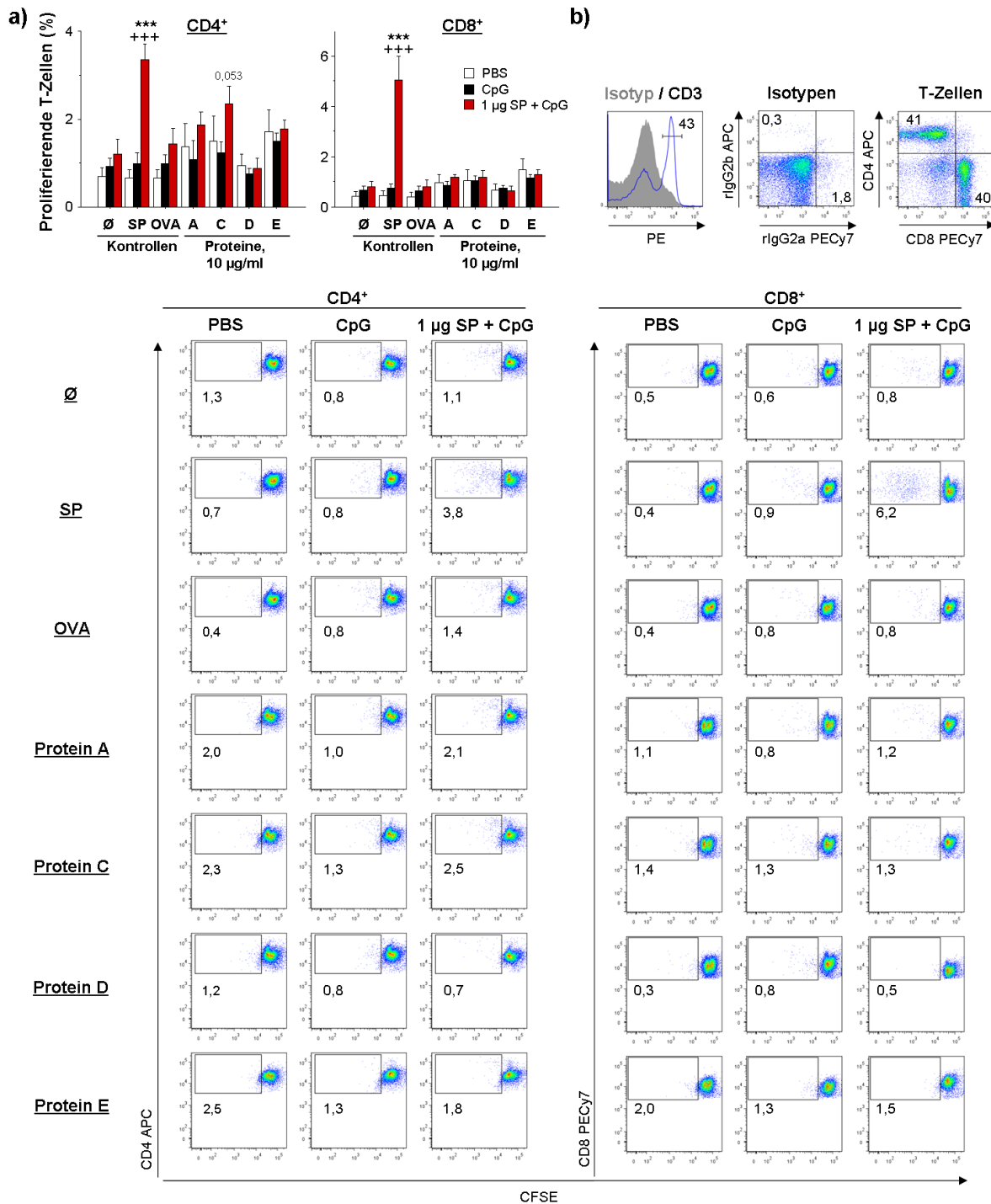
In vorangegangenen Experimenten wurde nachgewiesen, dass die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit 1 µg SP in Kombination mit einem Adjuvanz Antigen-spezifisch T-Zellaktivität induziert (siehe Abb. 8). Wichtig war daher die Untersuchung, ob sich dieser *in vitro* gemessene Effekt ebenfalls in Zusammenhang mit den ausgewählten Proteintargets wiederfinden ließe.

Dabei wurde analog verfahren und den C57BL/6 Mäusen im Rahmen einer P/B/B-Immunisierung die protektive Menge der SP + CpG als Adjuvanz, CpG allein oder nur PBS i.d. in ein Ohr injiziert. Die beiden letztgenannten Mausgruppen dienten als Negativkontrollen. Zellsuspensionen aus einer Woche nach der letzten Injektion entnommenen dLK uninfizierter Mäuse wurden mit CFSE gelabelt und Antigen-spezifisch mit Protein A, C, D oder E (10 µg/ml) restimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurden schließlich die T-Zellproliferationsraten durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Abb. 18).

Durchschnittlich lagen pro Ansatz etwa 40% auf CD3<sup>+</sup> vorgegattete CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor. Im Falle der detektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Ansätzen mit dLK-Zellen SP-immunisierter Tiere wurden mit Protein C die höchsten Proliferationsraten erzielt im Vergleich zu den anderen Proteinkandidaten. Diese waren jedoch verglichen mit den Kontrollansätzen nicht signifikant. Die nach Zugabe von Protein A erzielten Raten CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren im Vergleich zu den beiden Negativkontrollansätzen ebenfalls erhöht, aber nicht so hoch wie die nach mit Protein C erreichten. Die nach der Antigen-spezifischen Restimulation mit SP (50 µg/ml; Positivkontrolle des *in vitro*-Assays; siehe Abb. 18) ermittelten Raten waren im Vergleich zu den Ansätzen mit dLK-Zellen beider Negativkontrolltiergruppen hochsignifikant erhöht (siehe Abb. 18a). Die mit Protein E erzielten Proliferationsraten SP-geprimter dLK-Zellen des CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtyps waren zwar vergleichsweise so hoch wie die durch Restimulation mit Protein A erzielten, unterschieden sich jedoch nicht von denen beider Behandlungen der Negativkontrollansätze.

In mit Protein D versetzten Ansätzen zusammen mit Zellen SP-immunisierter Mäuse wurden lediglich etwa die Hälfte proliferierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert verglichen mit den Ansätzen, denen eines der 3 anderen rekombinanten Protein zugesetzt worden war. Die prozentuale durch Protein D induzierte Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag im Bereich der unstimulierten sowie unspezifisch mit OVA (50 µg/ml) stimulierten Ansätze (siehe Abb. 18).

Die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus mit SP und CpG immunisierten Mäusen wurde von keinem der 4 Proteine verstärkt induziert. Die Proliferationsraten der CD8<sup>+</sup> T-Zellen lagen verglichen mit den Negativkontrolltiergruppen im Bereich der unstimulierten sowie unspezifisch mit OVA restimulierten Kontrolle (siehe Abb. 18).



**Abb. 18: T-Zellproliferation durch Antigen-spezifische Restimulation von CFSE-gelabelten dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse.** C57BL/6 Mäuse wurde in einem P/B/B-Ansatz PBS, CpG bzw. 1 µg SP + CpG intradermal in ein Ohr injiziert. Eine Woche nach der letzten Behandlung wurden die dLK geerntet und die Zellen mit CFSE gefärbt (1 µM).  $1 \times 10^6$  gelabelte dLK-Zellen/200 µl wurden Antigen-spezifisch mit SP (50 µg/ml), 10 µg/ml der Proteine A, C, D und E bzw. unspezifisch mit OVA (50 µg/ml) restimuliert. Nach 5 d Inkubation wurden die T-Zellproliferationsraten durchflusszytometrisch ermittelt. **a)** Dargestellt ist die induzierte prozentuale Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Mittelwert ± SEM (n≥4; \*\*\* p≤0,002 vs. PBS-Kontrolle; \*\*\* p≤0,002 vs. CpG-Kontrolle). **b)** Exemplarisch gezeigt ist eine FACS-Analyse der jeweiligen Ansätze.

Diese Daten zeigen, dass im Speziellen das hergestellte Proteintarget C in der Lage ist, *in vitro* CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivität zu induzieren und als Bestandteil der SP aus Leishmanien-Lysat wiedererkannt wird.

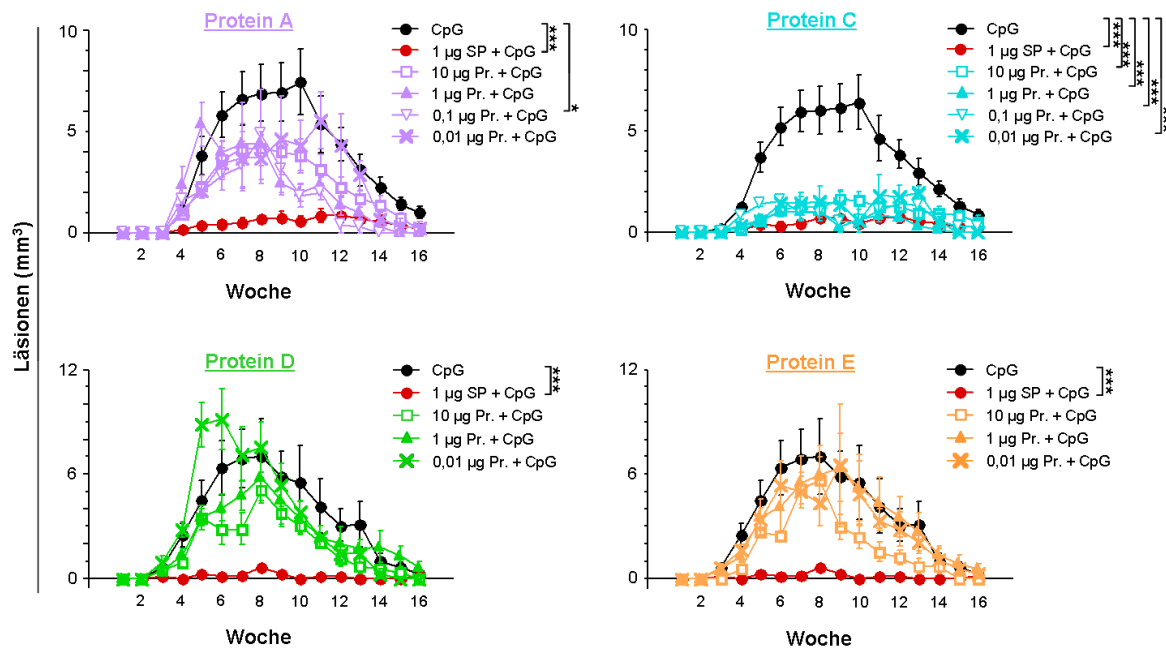
### 3.7.3. Schutz vor *L. major* Infektion - Protein C als potentieller Vakzinkandidat

Nachdem wesentliche Aspekte, die zu den Schutzmechanismen gegen *L. major*-Parasiten gehören, von dreien der 4 Proteine *in vitro* erfüllt worden waren (siehe Abb. 16 - Abb. 18), wurden die Proteinkandidaten in Immunisierungsexperimenten *in vivo* auf ihre protektives Potential im Infektionsmodell hin getestet.

In Kombination mit CpG als Adjuvanz wurden Gruppen von C57BL/6 Mäusen im P/B/B-Ansatz i.d. mit verschiedenen Mengen des Proteins A, C, D bzw. Protein E in je ein Ohr immunisiert. Dabei wurden in Zehnerpotenz-Schritten Proteinmengen von 0,01 µg bis maximal 10 µg eingesetzt. Mäuse, denen lediglich CpG injiziert worden war, dienten als Negativkontrolle. Mit 1 µg SP in Kombination mit CpG als Adjuvanz behandelte Tiere wurden als Positivkontrolle für eine auftretende Schutzwirkung gegen *L. major* Parasiten mitgeführt. Die Niedrigdosis-Infektion mit lebenden *L. major* Promastigoten erfolgte eine Woche nach der letzten Immunisierung in das jeweils andere Ohr und die Läsionen wurden wöchentlich als Ellipsoide am Inokulationsort gemessen.

Es zeigten sich gravierende Unterschiede in der Läsionsentwicklung der verschieden behandelten Gruppen (siehe Abb. 19). Einzig die Mausgruppen, welche mit Protein C + CpG als Adjuvanz immunisiert worden waren, zeigten eine im Vergleich zu der Negativkontrolle signifikant verminderte Läsionsentwicklung unabhängig von der eingesetzten Proteindosis (türkis; siehe Abb. 19). Bei diesen Tieren bildeten sich nahezu keine bis sehr kleine Granulome, vergleichbar mit denen der Positivkontrolltiere (rot).

Bei mit Protein A in Kombination mit CpG immunisierten Mäusen waren lediglich die Läsionen derer reduziert, welche eine Proteindosis von 0,1 µg injiziert bekamen (lilafarben; siehe Abb. 19). Im Gegensatz zu den mit Protein C behandelten Tieren waren die Granulome dabei jedoch noch deutlich stärker entwickelt. Verglichen mit der Negativkontrolle zeigten alle anderen infizierten Gruppen nach der Protein A-Injektion keine Unterschiede zu der CpG-Kontrollgruppe.



**Abb. 19: Läsionsentwicklung von C57BL/6 Mäusen nach Immunisierung mit Proteintargets und *L. major* Infektion.** C57BL/6 Mäuse wurden jeweils i.d. in Kombination mit 10 µg CpG als Adjuvanz mit verschiedenen Mengen der vier Proteintargets, 1 µg SP + CpG (Positivkontrolle) bzw. CpG allein (Negativkontrolle) in Woche -4, -3 und -1 in ein Ohr immunisiert. Eine Woche später wurden die Mäuse jeweils mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten in das kontralaterale Ohr infiziert und die Größe der sich lokal entwickelnden Ohrläsion wöchentlich bestimmt. Die Behandlung der Mäuse vor der Infektion erfolgte mit Protein A (n=3 für 10 µg, n=1 für alle anderen Gruppen), Protein C (n=3 für 10 µg, n=2 für 1 µg, n=1 für 0,1 µg und 0,01 µg), Protein D bzw. Protein E (je n=2 für 1 µg, n=1 für 10 µg und 0,01 µg). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-5 Tieren pro Gruppe pro unabhängigem Experiment (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,002$ ). Die Kontrollgruppen wurden bei jedem Experiment mit angesetzt.

Alle Tiere heilten entsprechend ihres genetischen Hintergrundes mit der einhergehenden Resistenz-Entwicklung gegen *L. major* Parasiten 16 Wochen nach Infektion aus. Die Proteinkandidaten D (grün) und E (orange) zeigten in den Wochen zuvor jedoch keinerlei schützenden Eigenschaften gegen die Infektion. Bei mit diesen Proteinen behandelten Mäusen entwickelten sich für alle eingesetzten Dosen Läsionen, die in ihrem Ausmaß mit denen der CpG-Kontrolltiere (schwarz) vergleichbar waren (siehe Abb. 19).

Zusammengefasst hatte einzig die Immunisierung mit dem Proteinkandidaten C in Kombination mit einer Adjuvanz *in vivo* im Gegensatz zu den mit einem der 3 anderen Proteinen behandelten Tieren sowie den Negativkontrolltiergruppen eine stark verminderte Ausbildung von Läsionen zur Folge. Dieser gegen eine *L. major* Infektion schützende Effekt war unabhängig von den hierfür eingesetzten Proteinmengen.

### 3.7.4. Parasitenlasten in immunisierten, infizierten C57BL/6 Mäusen

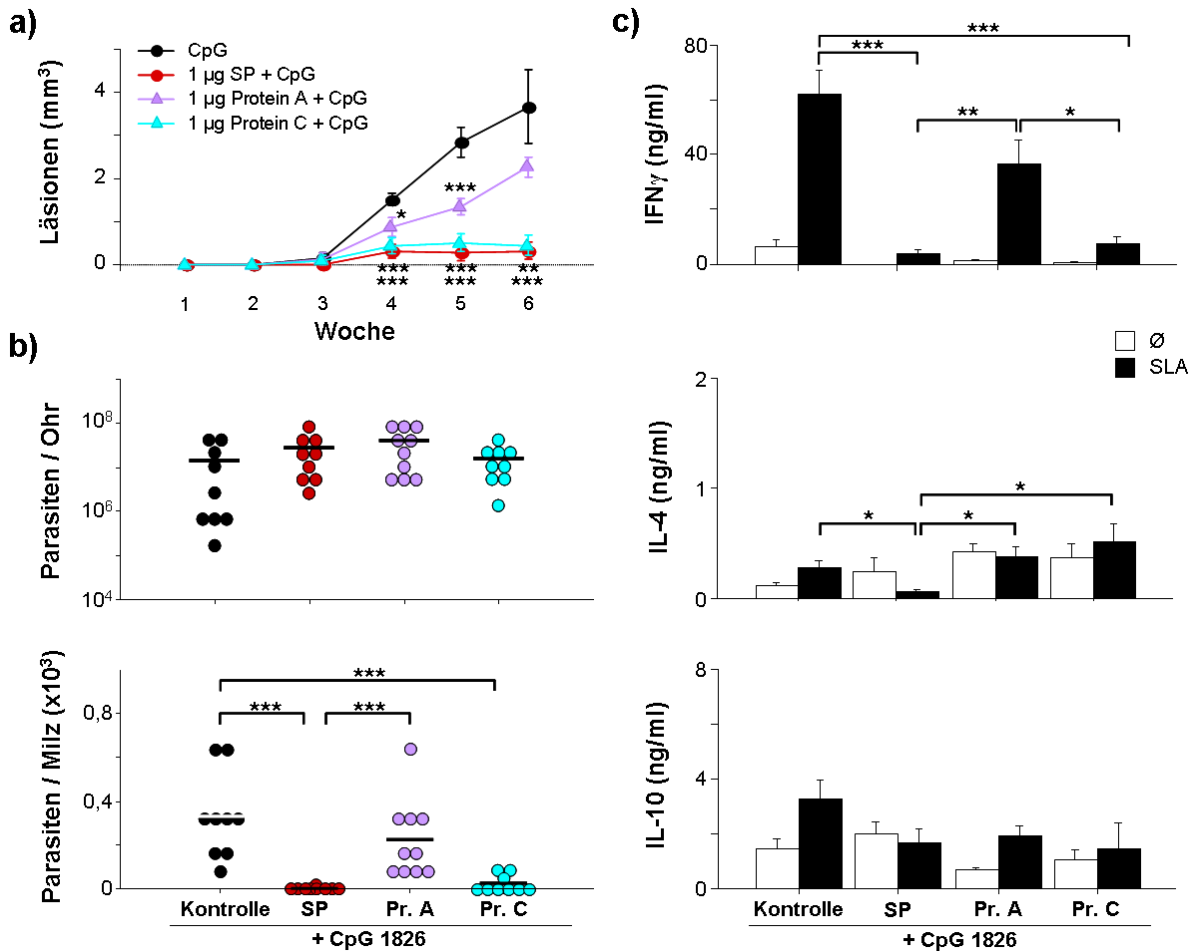
Um das Ausmaß der Infektion mit *Leishmania* Parasiten in mit rekombinanten Proteinen immunisierten C57BL/6 Mäusen exemplarisch zu untersuchen, wurde die Anzahl der Parasiten in Woche 6 nach der Infektion quantifiziert sowie *in vitro* die Zytokin-Produktion nach Antigen-spezifischer Restimulation mit SLA analysiert (siehe Abb. 20). Dafür wurden Gruppen eingesetzt, denen zuvor entweder 1 µg Protein A (ohne Schutzwirkung *in vivo*; siehe Abb. 19) oder 1 µg des schützenden Proteins C zusammen mit der Adjuvanz CpG injiziert worden war.

Abb. 20a zeigt die im Vergleich zur Negativkontrolle (schwarz) signifikant verminderte Läsionsentwicklung der mit Protein C + CpG (türkis) sowie mit SP + CpG (Positivkontrolle; rot) immunisierten Mäuse und die signifikante Zunahme der Läsionsvolumina ab Woche 4 nach *L. major* Infektion von mit Protein A + CpG (lilafarben) behandelten Tieren.

Am Ort der Infektion zeigten sich zwischen den 4 verschiedenen Immunisierungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der vorliegenden Parasiten (siehe Abb. 20b). Die beiden protektiven Behandlungen mit SP bzw. Protein C in Kombination mit der Adjuvanz führten im Gegensatz zu den anderen Gruppen hingegen zu keiner Viszeralisierung der Parasiten innerhalb des Organismus. Bei diesen beiden Gruppen fanden sich keine lebenden Leishmanien in den isolierten Milzen, was im Vergleich zur CpG-Kontrollgruppe signifikant war (siehe Abb. 20b). Die Parasitenanzahl in den Milzen war in mit Protein A behandelten Tieren in Woche 6 signifikant höher als in den Positivkontrollgruppen und lag unterhalb der in den Negativkontrolltieren vorliegenden Anzahl.

Nach Antigen-spezifischer Restimulation der dLK-Zellen immunisierter Mäuse mit SLA wurden signifikant geringere Konzentrationen des Th1/Tc1-spezifischen Zytokins IFN $\gamma$  für die aus mit SP bzw. Protein C immunisierter Tieren stammenden *in vitro*-Ansätze detektiert (siehe Abb. 20c). Die IFN $\gamma$ -Levels lagen bei Ansätzen mit dLK-Zellen ungeschützter Tiere mit größeren Ohrläsionen (Negativkontrolle sowie Protein A + CpG-Gruppe; siehe Abb. 20a), vergleichsweise 6,3-11,5x höher (siehe Abb. 20c).

T-Zellen aus dLK der Positivkontrolltiere setzten im Vergleich zu den 3 anderen Ansätzen signifikant geringere Mengen des Th2-assoziierten Zytokins IL-4 frei. Insgesamt gesehen war die Produktion von IL-4 sowie IL-10 jedoch verhältnismäßig sehr gering (siehe Abb. 20c). Für das Zytokin IL-10 wurden keine Unterschiede in der Freisetzung nach Antigen-spezifischer dLK-Restimulation in den unterschiedlichen Ansätzen detektiert.



**Abb. 20: Läsionsvolumina, Parasitenlasten und Antigen-spezifische dLK-Restimulation Proteintarget-immunisierter und *L. major* Niedrigdosis-infizierter C57BL/6 Mäuse.** Im Zeitraum von 4 Wochen wurden C57BL/6 Mäuse 3x intradermal in die Ohren immunisiert. Dabei kamen je 1 µg SP, Protein A und Protein C in Kombination mit CpG als Adjuvanz zum Einsatz. Nur mit Adjuvanz behandelte Tiere dienten als Negativkontrolle. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte die Infektion der Tiere in das andere Ohr mit 10<sup>3</sup> *L. major* Parasiten. **a)** Die sich entwickelnden Ohrläsionen am Infektionsort sind als Messkurven dargestellt. **b)** 6 Wochen nach der Infektion wurde die Parasitenzahl in Ohren und Milz mit Hilfe der Verdünnungsreihe bestimmt. **c)** Die gepoolten Daten der Zytokin-Produktion nach 48-stündiger Antigen-spezifischer dLK-Restimulation mit 10 µl SLA (25 µg/ml) sind als Balkendiagramme dargestellt (Mittelwerte ± SEM; n=2 unabhängige Experimente mit ≥4 Mäusen pro Gruppe pro Experiment; \* p≤0,05, \*\* p≤0,005, \*\*\* p≤0,002).

### 3.7.5. Intrazellulärer T-bet- und IFN $\gamma$ -Nachweis in Ohr und dLK immunisierter C57BL/6 Mäuse

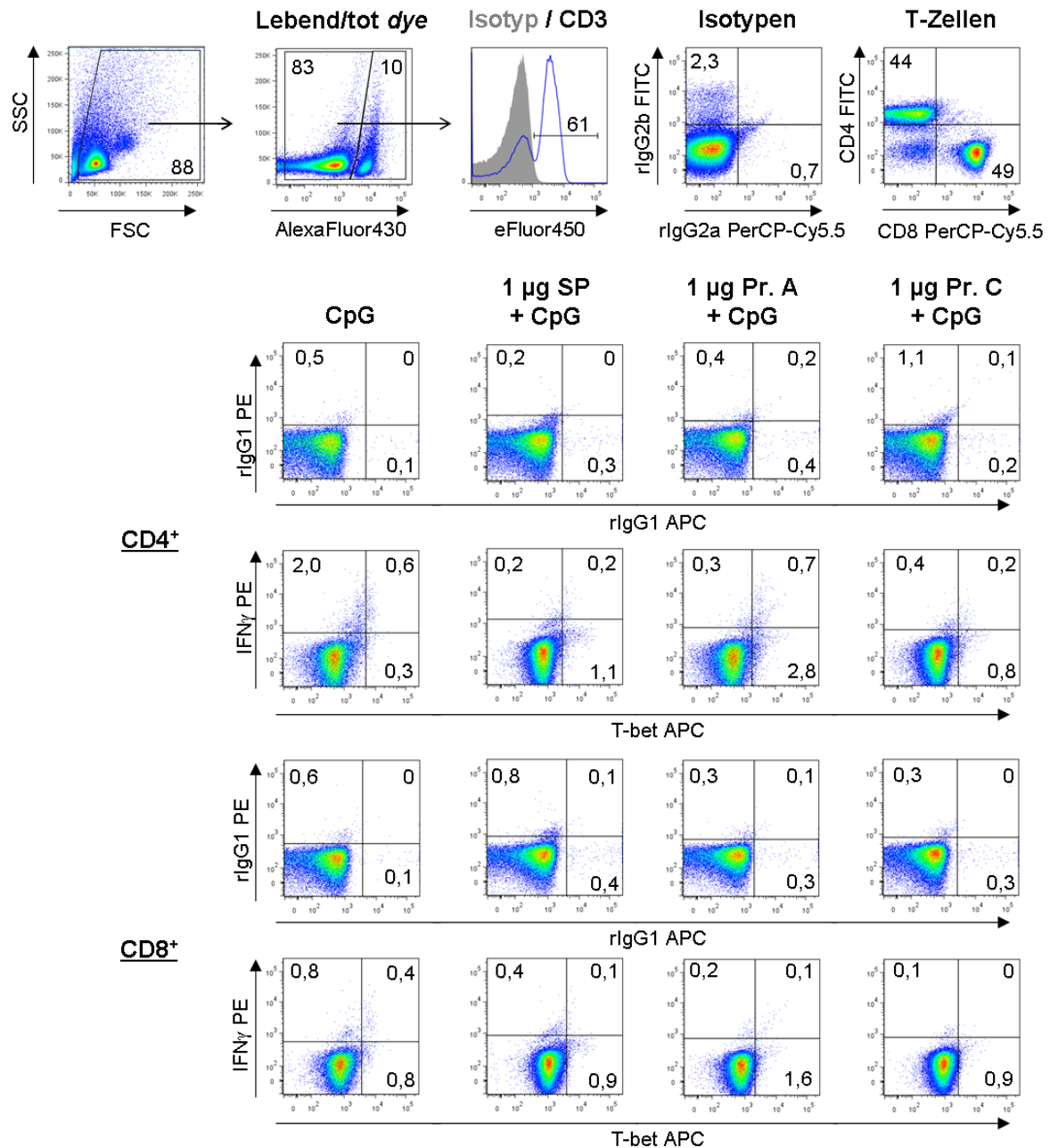
Im Rahmen der Parasitenlasten mit Protein A bzw. C + CpG immunisierter C57BL/6 Mäuse und Antigen-spezifischen dLK-Restimulation (siehe Abb. 20) wurden zusätzlich dLK- sowie Ohr-Zellen nach der Zellzahlbestimmung für die Analyse intrazellulär produzierter Faktoren eingesetzt. Dabei lag der Fokus auf dem Nachweis des intrazellulär von T-Zellen gebildeten Transkriptionsfaktors T-bet (*T-box expressed in T cells*) sowie dem Th1/Tc1-spezifischen Zytokin IFN $\gamma$ . Es ist bekannt, dass T-bet ein Th1-induzierender Transkriptionsfaktor ist, in dem seine ektopische Expression für die Transaktivierung sowohl des IFN $\gamma$ -Gens als auch der endogenen IFN $\gamma$ -Produktion verantwortlich ist [160].

Für die intrazelluläre bzw. intranukleäre FACS-Färbung wurden die dLK- und Ohr-Zellen der immunisierten Tiergruppen in Woche 6 nach der Niedrigdosis-Infektion mit metazyklischen *L. major* Promastigoten zunächst 4-6 h mit PMA (50  $\mu$ g/ml) und Ionomycin (Iono; 0,5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Unstimulierte, in Abwesenheit von PMA und Ionomycin inkubierte Zellen dienten als Kontrolle ( $\emptyset$ ). Danach folgte die Oberflächen-Markierung der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellsubtypen mit anschließender Antikörper-vermittelter Markierung des Transkriptionsfaktors T-bet sowie des intrazellulären IFN $\gamma$ .

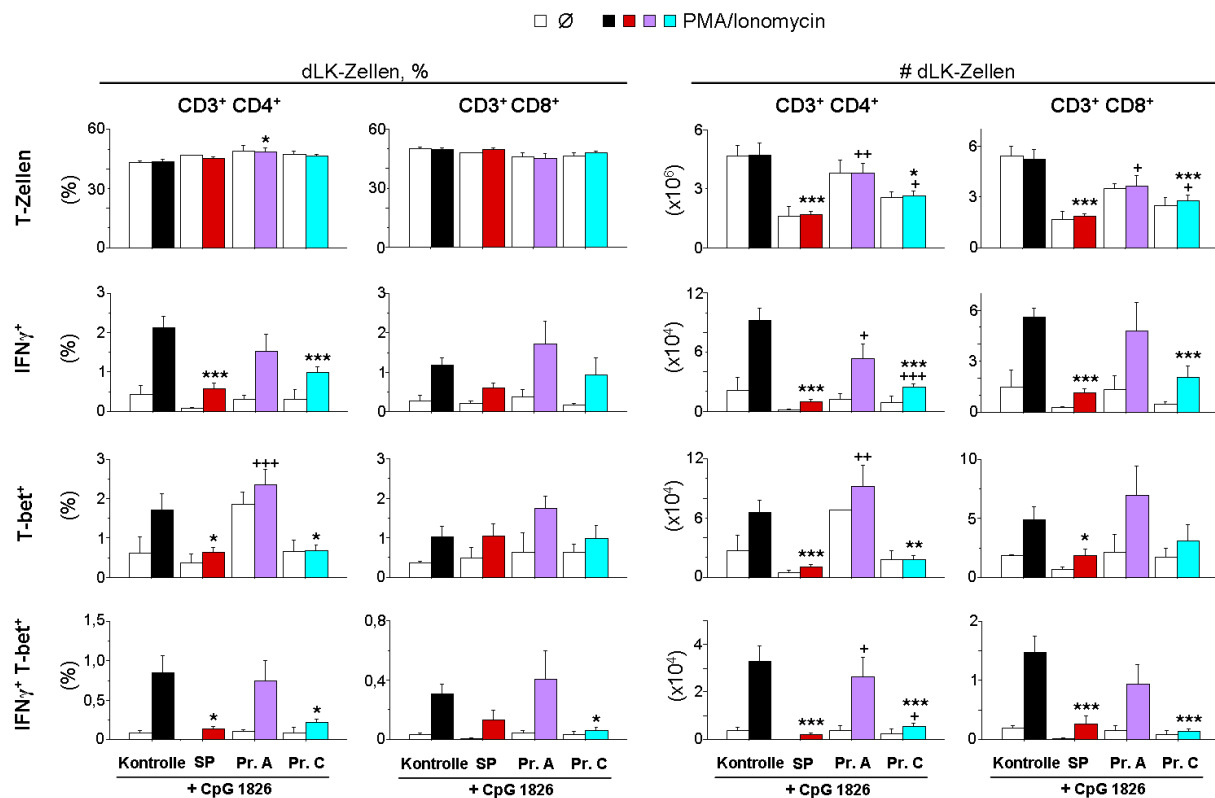
Die Abbildungen 21 und 23 zeigen exemplarisch die *Gating*-Strategie der durchflusszytometrischen Messung von dLK- bzw. Ohr-Zellen getrennt nach CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In die Analyse eingegangen sind dabei ausschließlich lebende sowie auf CD3<sup>+</sup> vorgegatete Zellen.

In den Diagrammen zusammengefasst sind die prozentualen Raten und berechneten absoluten Zahlen (#) der IFN $\gamma$ - bzw. T-bet einfach-positiven sowie der doppelt-positiven (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>) dLK- Zellen (siehe Abb. 22) bzw. der Ohr-Zellen, welche ausschließlich doppelt-positiv für diese beiden Zieltargets sind (siehe Abb. 224).

Auf prozentualer Ebene waren zu dem gewählten Zeitpunkt gleichermaßen viele CD4<sup>+</sup> Th-Zellen sowie CD8<sup>+</sup> Tc-Zellen in den dLK der vier Gruppen vorhanden (siehe Abb. 22). Ein teilweise anderes Bild zeigte sich in den absoluten Zellzahlen. Im Vergleich zu der Zellanzahl der Negativkontrollen sowie der aus mit Protein A + CpG behandelten Mäusen waren die Zellzahlen der Tiergruppen mit sehr kleinen Läsionen (siehe Abb. 20) für beide T-Zellsubtypen signifikant kleiner (siehe Abb. 22). Tiere der Behandlung mit Protein C + CpG und der Positivkontrolle wiesen bereits bei der Ernte deutlich kleinere dLK auf als die Mäuse der anderen Immunisierungsansätze.



**Abb. 21:** Intrazelluläre durchflusszytometrische Messung von IFN $\gamma$  und T-bet mit dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach *L. major* Infektion. Zellen aus dLK der mit Protein A bzw. C immunisierten C57BL/6 Mäuse wurden 6 Wochen nach Niedrigdosis-Infektion der Tiere mit *L. major* zusätzlich auf die intrazelluläre Produktion von IFN $\gamma$  sowie die Regulation des Transkriptionsfaktors T-bet hin untersucht. Dafür wurden die Zellen für 4-6 h mit Brefeldin A (1 µg/ml), Ionomycin (0,5 µg/ml) und PMA (50 ng/ml) stimuliert. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden markiert, die Zieltargets intrazellulär gefärbt und schließlich durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden auf lebende Zellen, CD3<sup>+</sup> Zellen sowie CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorgegattet. Exemplarisch dargestellt ist die *Gating*-Strategie der FACS-Messungen. Das *Gating* der intrazellulären Färbung bezieht sich auf die entsprechenden Isotyp-Kontrollen der einzelnen Gruppen.



**Abb. 22: Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$  und T-bet in dLK-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach *L. major* Infektion.** Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abb. 21) ermittelten prozentualen sowie absoluten IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und T-bet<sup>+</sup> Zellzahlen aus dLK-Zellen aus mit SP, Protein A oder Protein C (je 1  $\mu$ g Protein) + Adjuvanz immunisierten und Niedrigdosis-infizierten C57BL/6 Mäuse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=2 unabhängige Experimente mit  $\geq 3$  Ansätzen pro Behandlung und Experiment; \* p $\leq 0,05$ , \*\*\* p $\leq 0,002$  vs. CpG-Gruppe (schwarz), + p $\leq 0,05$ , +++ p $\leq 0,002$  vs. SP + CpG-Gruppe (rot)). Es werden jeweils Balkendiagramme gezeigt für CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die einfach-positiv sind für IFN $\gamma$  oder T-bet sowie die Anteile doppelt-positiver (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>) T-Zellen.

T-bet und das Zytokin IFN $\gamma$  waren in den dLK-Zellen aller Mausgruppen nachweisbar und wurden dort entsprechend des jeweiligen Immunisierungsansatzes nahezu gleichermaßen von CD4<sup>+</sup> Th- sowie CD8<sup>+</sup> Tc-Zellen gebildet (siehe Abb. 22). Die prozentualen Raten für diese Parameter einfach- sowie doppelt-positiver CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimmten hierbei verhältnismäßig mit den absoluten Zellzahlen überein. Beide T-Zellsubtypen der mit SP + CpG sowie der mit Protein C + CpG immunisierten C57BL/6 Mäuse wiesen signifikant kleinere Frequenzen an T-bet- und IFN $\gamma$ -positiven Zellen auf im Vergleich zu den Ansätzen der Negativkontrolle (siehe Abb. 22). Die Produktion von T-bet und IFN $\gamma$  durch die T-Zellen mit Protein A und CpG vorbehandelter Tiere lag hingegen im Bereich der Negativkontrolle.

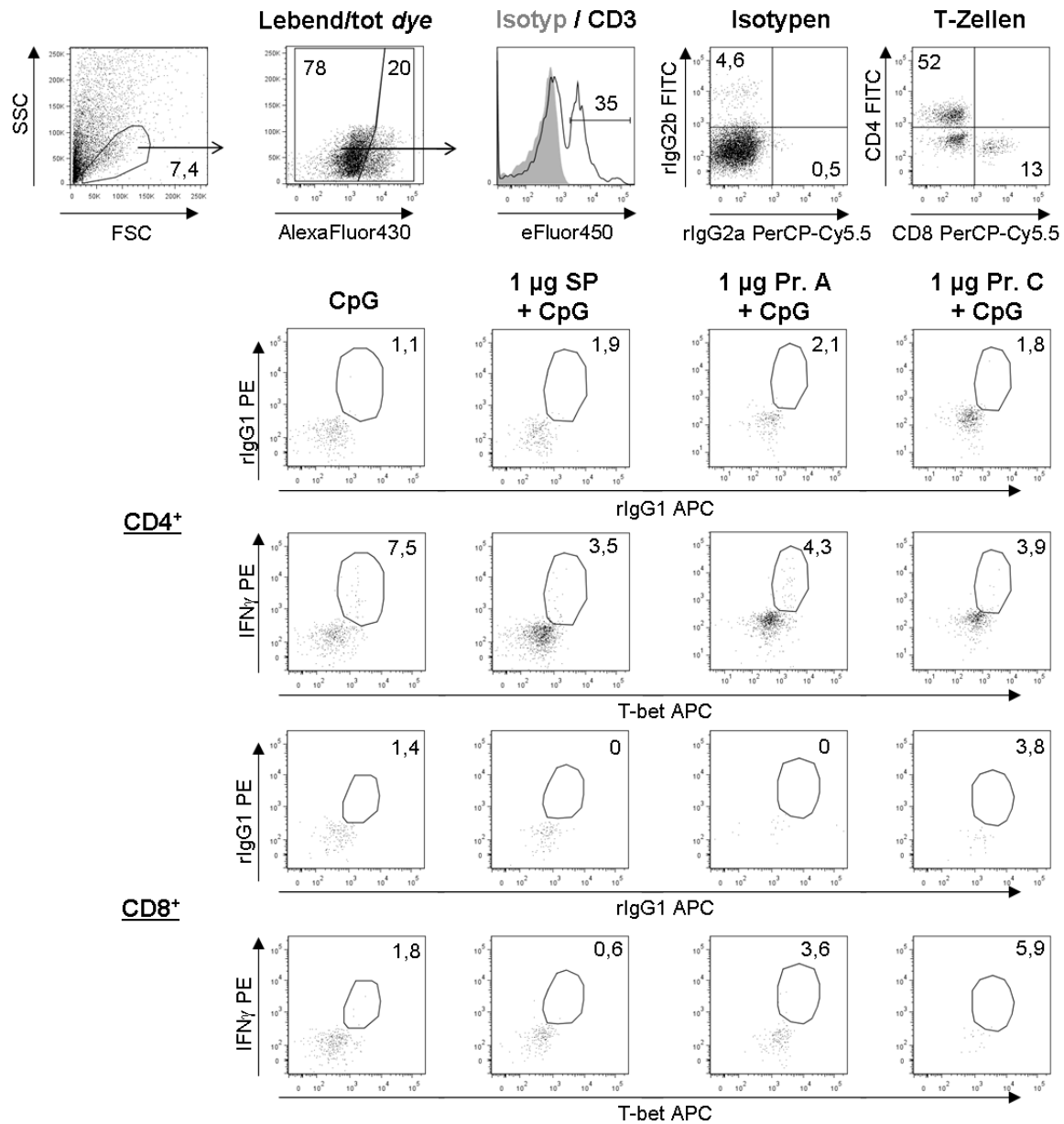
Bei Betrachtung der Infektionsstelle zeigten sich Unterschiede in der Präsenz der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 24). Auf prozentualer Ebene lagen insgesamt 4-5x mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen pro Immunisierungsgruppe im Ohr vor als CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auf Ebene der absoluten Zellzahlen lag der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen für alle Gruppen im Durchschnitt bei etwa einem Drittel der vorkommenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Für alle 4 Ansätze lag der Anteil stimulierter CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl prozentual als auch in absoluten Zahlen in dem Bereich der entsprechenden unstimulierten Kontrollansätze (siehe Abb. 224). Die prozentualen Anteile CD8<sup>+</sup> T-Zellen der mit den Proteinkandidaten A bzw. C und CpG behandelten Gruppen waren, verglichen mit der Negativkontrolle, signifikant erniedrigt.

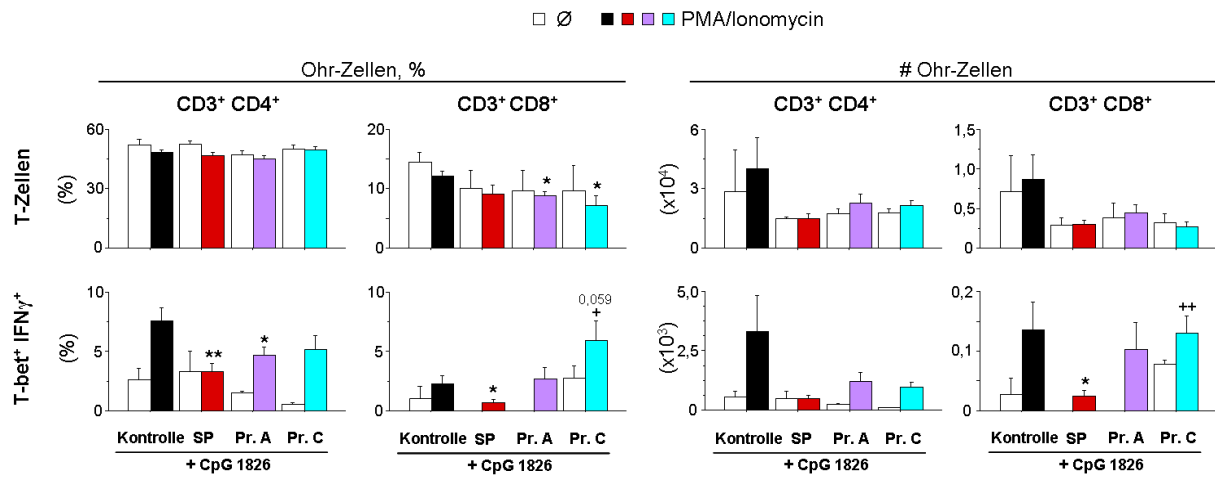
In Bezug auf die prozentualen Anteile der für T-bet und IFN $\gamma$  doppelt-positiven CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im Ohr waren die Anteile in der Positivkontrolle sowie der mit Protein A + CpG behandelten Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Abb. 24). Im Gegensatz dazu zeigten sich keine signifikanten Unterschiede auf Ebene der absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen.

Sowohl prozentual als auch absolut waren die Raten der T-bet<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Tc-Zellen aus den Ansätzen der Immunisierung mit SP + CpG (Positivkontrolle) stammend, signifikant kleiner als die der Negativkontrollgruppe (siehe Abb. 24). Das prozentuale Vorkommen sowie die absolute Zellzahl doppelt-positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren hingegen aus den Ansätzen der Immunisierung mit Protein C kombiniert mit CpG stammend signifikant im Vergleich zu der Positivkontrolle erhöht.

Insgesamt betrachtet, betrug die absolute Zellzahl T-bet und IFN $\gamma$  doppelt-positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen für alle Ansätze etwa ein Zehntel der absoluten Zahl doppelt-positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 24).



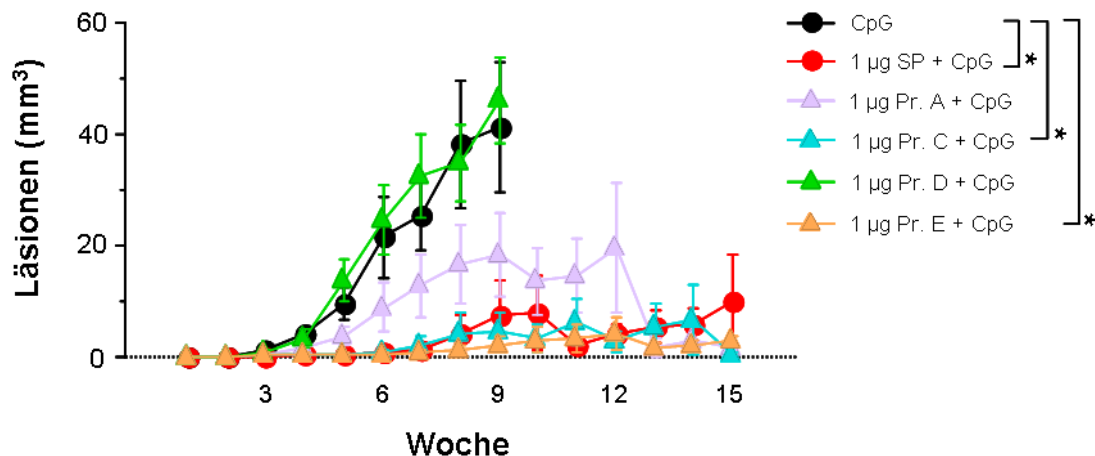
**Abb. 23: Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$  und T-bet in Ohr-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach *L. major* Infektion.** Ohr-Zellen der mit Protein A bzw. C immunisierten C57BL/6 Mäuse wurden 6 Wochen nach Niedrigdosis-*L. major*-Infektion der Tiere auf die intrazelluläre Produktion von IFN $\gamma$  sowie die Regulation des Transkriptionsfaktors T-bet hin analysiert. Dafür erfolgte die Stimulation der Zellen für 4-6 h mit Brefeldin A (1 µg/ml), Ionomycin (0,5 µg/ml) und PMA (50 ng/ml). CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden markiert, die Zieltargets intrazellulär gefärbt und schließlich mittels Durchflusszytometrie analysiert. Vorgegated wurden auf lebende Zellen, CD3<sup>+</sup> Zellen sowie CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das exemplarisch dargestellte Gating der intrazellulären Färbung bezieht sich auf die entsprechenden Isotyp-Kontrollen der einzelnen Gruppen.



**Abb. 24:** Intrazellulärer Nachweis von IFN $\gamma$  und T-bet in Ohr-Zellen immunisierter C57BL/6 Mäuse in Woche 6 nach *L. major* Infektion. Die durchflusszytometrisch (siehe Abb. 23) ermittelten prozentualen sowie absoluten IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und T-bet<sup>+</sup> Zellzahlen aus Ohr-Zellen aus mit SP, Protein A oder Protein C (je 1  $\mu$ g Protein) + Adjuvanz immunisierten und Niedrigdosis-infizierten C57BL/6 Mäuse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=2 unabhängige Experimente mit  $\geq$ 3 Ansätzen pro Behandlung und Experiment; \* p $\leq$ 0,05, \*\* p $\leq$ 0,005 vs. CpG-Gruppe (schwarz), + p $\leq$ 0,05, ++ p $\leq$ 0,005 vs. SP + CpG-Gruppe (rot)). Es werden jeweils Balkendiagramme für die Anteile doppelt-positiver (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt.

### 3.8. Protein-Immunsierung und *L. major* Infektion von BALB/c Mäusen

Zur Untersuchung des protektiven Potentials der 4 Proteinkandidaten in einem suszeptiblen Organismus *in vivo* wurden BALB/c Mäuse in 2 initialen Experimenten 3x i.d. mit Proteinmengen von je 1  $\mu$ g + CpG als Adjuvanz immunisiert und anschließend einer Niedrigdosis-Infektion mit *L. major* Parasiten ausgesetzt.



**Abb. 25:** Protein-basierte Immunsierung und *L. major* Infektion von BALB/c Mäusen. BALB/c Mäusen wurden in Woche -4, -3 und -1 CpG, SP, Protein A, C, D bzw. E (jeweils 1  $\mu$ g Protein) in Kombination mit CpG als Adjuvanz i.d. in ein Ohr injiziert. Die sich am Infektionsort entwickelnden Granulome wurden in den darauffolgenden Wochen als Ellipsoide gemessen (n=2 unabhängige Experimente mit  $\geq$ 3 Tieren pro Gruppe; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* p  $\leq$  0,05).

Es zeigten sich große Unterschiede in der Läsionsentwicklung der verschiedenen immunisierten Mausgruppen (siehe Abb. 25).

Die Mäuse, welche mit den Proteinkandidaten C bzw. E in Kombination mit CpG als Adjuvanz behandelt worden waren, entwickelten nach Infektion mit *L. major* nahezu keine Läsionen über einen Zeitraum von 15 Wochen (siehe Abb. 25). Dieser Unterschied in den Läsionsvolumina war signifikant im Vergleich zu der Negativkontrollgruppe. Tiere, denen Protein D + CpG oder Adjuvanz allein injiziert worden war, mussten hingegen aufgrund der Entwicklung voluminöser eitriger Granulome bereits in Woche 9 nach Infektion frühzeitig getötet werden. Die Läsionsentwicklung nach Behandlung von Protein A + CpG zeigte nach Infektion mit *L. major* keinen signifikanten Unterschied zu der CpG-Kontrolltiergruppe (siehe Abb. 25), der Verlauf war nach dieser Immunisierung jedoch nicht so progressiv.

### 3.9. BLAST-Analyse ausgewählter Proteinkandidaten aus *L. major*

Für die Suche nach Homologien der Proteinkandidaten A-E aus *L. major* Lysat mit den Aminosäuresequenzen von Proteinen anderer *Leishmania*-Spezies (Familie *Trypanosomatidae*, Unterfamilie *Leishmaniinae*) wurden deren Sequenzen mittels BLAST-Algorithmus verglichen.

Es fanden sich auf diese Weise Übereinstimmungen der ausgewählten Proteinkandidaten mit Aminosäuresequenzen von Leishmanien-Spezies, welche Auslöser entweder ebenfalls für die kutane oder aber die mukokutane bzw. viszerale Krankheitsform sind (siehe Tab. 3-7 im Anhang).

Die Aminosäuresequenz von Protein A ist in 79-88% identisch mit den Sequenzen von *L. mexicana*, *L. infantum* sowie *L. donovani* (siehe Tab. 3), für den Proteinkandidaten B sind es 72-89% (siehe Tab. 4), während das schützende Protein C in 84-91% Homolgien mit Proteinen dieser 3 Spezies aufweist (siehe Tab. 5). Der Algorithmus fand zu 88-95% identische Aminosäuresequenz-Abschnitte für den Proteinkandidaten E mit Proteinen aus *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* und den für die VL verantwortlichen Parasiten *L. donovani* und *L. infantum* (siehe Tab. 7).

Einzig Protein D weist keine Spezies-spezifischen Sequenzabschnitte auf. Neben *L. major* findet sich seine Aminosäuresequenz mit 100%iger Übereinstimmung in *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* sowie *L. donovani* und *L. infantum* wieder (siehe Tab. 6).

Als Fazit der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass im Rahmen der Suche nach immunogenen *L. major*-spezifischen Antigenen aus Promastigotenlysat (SLA) ein vielversprechender Proteinkandidat (Protein C) gefunden wurde. Dieser aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dLK infizierter C57BL/6 Mäuse in *in vitro*-Assays Antigen-spezifisch zur Proliferation sowie der Produktion Th1/Tc1-spezifischen IFN $\gamma$ . Neben der Ko-Injektion von CpG als Adjuvanz führte die Immunisierung mit diesem Proteinkandidaten zu einer signifikant verminderten Läsionsentwicklung am Infektionsort der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zur Negativkontrolltiergruppe. Die Parasitenzahl an der Infektionsstelle zeigte in Woche 6 keinen Unterschied zu den Zahlen der Kontrollgruppen. In den Milzen dieser Tiere waren im Gegensatz zu der Negativkontrolle keine Leishmanien zu finden, es kam demnach *in vivo* zu keiner Viszeralisierung der Parasiten. Die intrazelluläre Färbung Th1-spezifischer Faktoren in T-Zellen aus dLK solcher geschützter, immunisierter Mäuse zeigte signifikant geringere Raten eben dieser Faktoren verglichen mit der Negativkontrolle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Protein C als erstmals untersuchter Vakzinkandidat besonderes Potential aufgrund seiner Schutzwirkung in resistenten sowie empfindlichen Mäusen zeigt und eine hohe Sequenzübereinstimmung mit Proteinen anderer *Leishmania* Spezies Potential aufweist.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, immunogene *L. major*-spezifische Antigene aus SLA zu identifizieren und charakterisieren, die als potentielle Vakzinkandidaten gegen die CL in Betracht gezogen werden können.

### 4.1. SLA als Pool verschiedener immunogener Komponenten

Die vollständige Genom-Sequenzierung verschiedener *Leishmania*-Spezies ermöglichte neben vergleichenden Analysen hinsichtlich konservierter Sequenzen auf Gen-Ebene erstmals die Identifikation und gezielte Synthese einzelner *Leishmania*-spezifischer Proteine [127;161-163]. Damit war der Grundstein für die Erforschung definierter Parasiten-spezifischer Proteine oder Peptide als mögliche Vakzinkandidaten und derer potentieller Beteiligung an der Induktion schützender zellulärer Immunreaktionen gegen dieses Pathogen gelegt.

Neben *in silico*-Verfahren, mit deren Hilfe sich bspw. CD8 T-Zell-Epitope mit besonderen Bindungseigenschaften gegen die korrespondierenden Haplotypen der MHC Klasse I-Moleküle eines bekannten Wirtsorganismus vorhersagen lassen [164;165], stellt die Antigen-Isolation unmittelbar aus Erreger-Lysat als Ausgangsmaterial eine effektive Methode für die Suche immunogener Erreger-spezifischer Antigene dar. Erfolgreich angewandt wurde z.B. bereits die Fraktionierung von Lysat des Varicella-Zoster Virus, in deren Rahmen zwei Glykoproteine als Zieltargets von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurden, die als mögliche Vakzinkandidaten für immunsupprimierte Transplantationspatienten denkbar sind [166].

Im Falle von *L. major* Lysat (SLA), welches sich aus einer Vielzahl potentieller immunmodulatorischer Bestandteile wie Proteine zusammensetzt, zeigten sich bereits vor über 20 Jahren Unterschiede hinsichtlich des immunogenen Potentials verschiedener Bestandteile *in vivo*. So brachte die Fraktionierung mittels Anionenaustauscher-chromatographie eine von 9 Fraktionen hervor, die 1,3% der Gesamtproteinmenge des SLA ausmachte und susceptible Mäuse gegen *L. major* schützte [152]. Bogdan und Kollegen identifizierten hingegen mittels präparativer Gelelektrophorese eine Proteinfraction, die einen Th2-gerichteten Verlauf in immunisierten, infizierten BALB/c Mäusen initiierte [153].

Die Separation von *L. major* Promastigoten-Lysat in seine Komponenten erfolgte hier zunächst mittels differentieller Zentrifugation zur schrittweisen Reduktion seiner Komplexität. Dabei handelt es sich um eine effiziente Methode, welche die Auftrennung von Lysaten in ihre verschiedenen zellulären Bestandteile ermöglicht, ohne chemischen oder physikalischen

Stress auf diese auszuüben. Anwendung findet diese Vorgehensweise ebenfalls im Bereich der Untersuchungen von Tumor- sowie bakteriellen Erkrankungen. Zum Beispiel wurden auf diese Weise gezielt Zellmembranfragmente aus Hypophysentumorzellen gewonnen [167] oder humane Melanomzellen isoliert, welche für die immunchemische Charakterisierung von spezifischen, gegen sie gerichteten Antikörpern aus Seren von Krebspatienten zum Einsatz kamen [168]. Einen wesentlichen Beitrag lieferte diese Methode ebenfalls für das Verständnis und die Vorbeugung des durch das Bakterium *Clostridium tetani* ausgelösten Wundstarrkrampfes (Tetanus), da sie die Bestimmung der L-Ketten-Lokalisation des Tetanustoxins in Zellen ermöglichte [169].

Alle in dieser Arbeit isolierten SLA-Komponenten - Nuklei, Mitochondrien, Membranproteine sowie lösliche Bestandteile (SP) - zeigten reaktives Potential, indem sie im Restimulationsassay mit dLK-Zellen infizierter C57BL/6 Mäuse (der Titrationsreihe entsprechend) gleichermaßen hohe IFN $\gamma$ -Levels durch aktivierte T-Zellen induzierten. Schlussfolgernd ließen sich alle Bestandteile für nachfolgende Studien der immunogenen Eigenschaften im Rahmen von *L. major* Infektionen *in vivo* einsetzen.

Die Immunogenität unterschiedlicher zellulärer Bestandteile wurde bereits in einer Vielzahl von Tiermodellen im Rahmen verschiedener Vakzinierungsstudien gezeigt. Die Anwendung von DNA/Nukleinsäuren als Vakzine geht dabei in die 1990er Jahre zurück. Durch die Inokulation von nackter Plasmid-DNA, welche u.a. für das Enzym Luziferase kodierte, wiesen Wolff und Kollegen noch zwei Monate nach Applikation die Gen-basierte Proteinexpression in Mäusen nach und zeigten damit die Anwendbarkeit des Konzepts einer DNA-Immunsierung [154;170]. Die direkte Inokulation von DNA wurde erfolgreich für die Induktion langwährender humoraler und zellulärer Immunantworten *in vivo* eingesetzt [155], z.B. in Tumor- oder viralen Modellen. Einerseits wurde der Schutz von BALB/c Mäusen gezeigt, die noch ein Jahr nach der Behandlung Tumor-frei waren in Folge von induzierten Gedächtnisantworten, die zur Abstoßung von Tumorzellen beitrugen [171]. Andererseits schützte die intramuskuläre Immunsierung mit für Japanische Enzephalitis Virus (JEV) Protein NS1 kodierender DNA Mäuse gegen die lethale Challenge mit diesem Virus [172]. Aus Ziegenleber gewonnene mitochondriale DNA induzierte hingegen nach Inokulation in Kombination mit einem Adjuvanz die Antikörperproduktion in Kaninchen. Nach der Isolation der Antikörper aus dem Serum zeigten diese Polyspezifität für immunogene und Kreuzreaktionen mit anderen Nukleinsäuren [173]. Das mitochondriale Protein Mcu1 aus dem Fungus *Candida albicans*, einem Pathogen sowie Kommensalen des Menschen, erwies sich als potentiell Target in der Entwicklung antimykotischer Agenzien [174]. Die Verwendung von Membranproteinen erwies sich ebenfalls bereits in mehreren Krankheitsmodellen als erfolgreich. So zeigten aus *Trypanosoma (T.) rangeli* und *T. cruzi*, den Erregern der Chagas-Krankheit, isolierte GPI-Ankerproteine sehr immunogene

Eigenschaften [175], während solche aus *L. (Viannia) braziliensis* Promastigoten als biochemische Marker zur Identifikation und Differenzierung der Leishmaniasis eingesetzt werden [176]. In Tumormodellen wurden bereits Membran-reiche Fraktionen aus Melanomzellen zur Isolation von Immunglobulinen aus Seren von Melanompatienten eingesetzt [168]. Im Rahmen von bakteriellen Modellen schützten Membranproteine aus virulenten *Shigella*-Bakterien immunisierte Mäuse vor einer lethal verlaufenden Infektion [177], während Peptidoglykan-assoziierte Proteine als Vakzine gegen Infektionen mit Enterokokken Verwendung fanden [178]. Die Rolle von *Leishmania*-Glykoproteinen, welche im Rahmen der differentiellen Zentrifugation nicht explizit isoliert worden sind, wird hingegen kontrovers diskutiert. Einerseits zeigten Glykoproteine aus Promastigoten schützende Wirkung in suszeptiblen Mäusen [179], andererseits wurde nachgewiesen, dass deren immunsuppressive Kapazität in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen über die der protektiven dominierte [180].

Trotz des reaktiven Potentials aller isolierten Organellen *in vitro* wurden für die weitere Vorgehensweise in dieser Arbeit lediglich die gelöst vorliegenden Bestandteile (SP) verwendet. Von Vorteil war bei dieser Fraktion, dass sie sich in definierten Proteinnengen einsetzen und mittels Flüssigchromatographie weiter fraktionieren ließ.

Immunogene Eigenschaften wurden ebenfalls den löslichen Bestandteilen aus *Schistosoma*-Lysat bei der Untersuchung der Wurmerkrankung Bilharziose (Schistosomiasis) im Mausmodell zugesprochen. Dabei schützte die i.d. Injektion „wässriger Fraktionen“ kombiniert mit einer Adjuvanz C57BL/6 Mäuse vor Ausbruch der Infektionskrankheit und trug zur Resistenzentwicklung bei [181].

#### 4.2. Dosis- und Adjuvanz-abhängiger protektiver Effekt der SP *in vivo*

Die Untersuchung des immunogenen Potentials der aus SLA separierten SP *in vivo* erfolgte mittels 3x-Immunisierung der Mäuse, bevor diese einer Infektion mit lebenden *L. major* Parasiten ausgesetzt wurden. Diese Strategie hatte sich bereits in anderen Vakzinierungsstudien im Rahmen von *Leishmania*- bzw. HIV-Infektionen für die Entwicklung zellulärer Immunreaktionen bewährt [182-184]. In unserer Arbeitsgruppe zeigte sich die 3x-Injektion einzelner CD8<sup>+</sup> T-Zell-spezifischer Peptidkandidaten ebenfalls als effizienter in ihrer Schutz-induzierenden Wirkung gegen *L. major* in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu Tieren, die nur 2x immunisiert worden waren [185].

C57BL/6 Mäuse wurden mit SP-Mengen von 0,01 µg bis 100 µg im Abstand von Zehnerpotenzschritten jeweils in Kombination mit einer Adjuvanz i.d. immunisiert, bevor die Niedrigdosis-Infektion mit metazyklischen *L. major* Promastigoten gesetzt wurde. Alle Mäuse zeigten einen ihrem genetischen Hintergrund entsprechenden Krankheitsverlauf, der mit einer Ausheilung der lokalen Läsionen und einer Resistenzgeneration gegen diese Leishmanien-Spezies einherging [34]. Es ließ sich *in vivo* ein Dosis-abhängiger protektiver Effekt der SP beobachten. Nur Tiere, die mit 1 µg SP + Adjuvanz behandelt worden waren, entwickelten nahezu keine Läsionen nach der Infektion im Gegensatz zu Gruppen, denen niedrigere oder höhere Dosen injiziert worden waren.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist im Falle der höher eingesetzten Proteinmengen, dass es zu einer Proteinaggregation kommt, die die Aufnahme der Proteincluster durch DC als APC aus sterischen Gründen beeinträchtigt, wodurch die Antigen-Prozessierung und Präsentation negativ beeinflusst werden und somit das *priming* der T-Zellen in den dLK nur unzureichend abläuft. Der Einsatz zu geringer Proteindosen könnte hingegen von Nachteil sein, da die Antigene rasch von unspezifischen Proteasen und weiteren Enzymen, die in den meisten Geweben und Seren von Säugetieren vorliegen, in Peptide abgebaut werden, was mit dem Verlust ihres immunogenen Potentials einhergehen kann. Dadurch wird auf der einen Seite die Halbwertszeit der Antigen-Bruchstücke sowie die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einem Kontakt zwischen Antigen und T-Zelle kommt, vermindert. Auf der anderen Seite sind durch das ausbleibende oder stark abgeschwächte *priming* der T-Zellen die immunogenen Eigenschaften des ursprünglichen Antigens aufgehoben. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Proteine, welche sich aus rechtsdrehenden Aminosäuren (D-Isomer) zusammensetzten, nur verzögert dem proteolytischen Abbau im tierischen Organismus unterlagen [186]. Sie wurden im Gegensatz zu natürlich vorliegenden L-Isomeren von Immunzellen erkannt und trugen zu einer Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellantworten *in vivo* bei. Ein Antigen-Dosis-abhängiger Effekt zeigte sich ebenfalls in Vakzinierungsstudien mit SLA in liposomalen Vesikeln als

Carrier-System. Lediglich BALB/c Mäuse, die mit der höchsten Proteinmenge an SLA (Lip-SLA-50) immunisiert worden waren, zeigten nach *L. major* Infektion signifikant kleinere Fußschwellungen und geringere Parasitenzahlen in der Milz im Vergleich zu Tieren, die unter denselben Bedingungen mit geringeren SLA-Proteindosen behandelt worden waren [149].

Die Entwicklung von T-Zell-Toleranz könnte ebenso mögliche Ursache für das Ausbleiben eines schützenden Effekts in Form vergrößerter Ohrläsionen am Infektionsort sein. Nach der Injektion von löslichen Antigenen verringert sich nach einer ersten T-Zell-Aktivierung und -Expansion - in dieser Arbeit durch die SP-Immunisierung bedingt - die Anzahl betroffener T-Zellen, wobei die in den dLK verbleibenden Zellen nicht mehr befähigt sind, bei einer erneuten Konfrontation mit dem spezifischen Antigen – hier durch die *L. major* Infektion - zur Initiation einer Abwehrreaktion beizutragen [187-189]. In einem solchen Fall weisen die für das Antigen spezifischen T-Zellen ein tolerantes Verhalten gegenüber ihrem löslichen Antigen auf und sind funktionell inaktiv. Bei der peripheren Toleranz der T-Zellen kann es bei Restimulation kurz zuvor aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Induktion von Fas-Ligand (FasL) und Fas (einem TNF-Rezeptor) kommen, was wiederum verstärkt durch IL-2 zum programmierten Tod (Apoptose) der T-Zellen führt [190]. Durch eine verminderte Interaktion zwischen DC und T-Zellen in Folge der geringen Anzahl kostimulatorischer und MHC-Moleküle auf der Oberfläche der APC besteht hingegen nur eine geringe Affinität des TCR zum MHC-Peptid-Komplex, wodurch es zur sogenannten Anergie, der spezifischen Inaktivierung der T-Zellen, kommt. Eine weitere Erklärung für den Nicht-Schutz gegen die *L. major* Infektion der Mäuse nach Immunisierung mit niedrigeren oder höheren SP-Mengen als 1 µg könnte außerdem eine induzierte Niedrigdosis-Toleranz sein, welche durch Gabe geringer Antigen-Mengen hervorgerufen worden ist, bzw. eine durch hohe Mengen löslichen Antigens auftretende Hochdosis-Toleranz.

Aufgrund der ermittelten *in vivo*-Daten wurde bei weiteren Immunisierungsstudien die protektive Menge von 1 µg SP in Kombination mit einem Adjuvanz als Positivkontrolle eingesetzt, da sich die anderen Dosen nicht als wirksam erwiesen.

Ein Adjuvanz ist ein Hilfsstoff, der oftmals zur Wirkungsverstärkung einer Vakzine ko-injiziert wird, welche bei alleiniger Gabe eine schwache bis gar keine Antigen-Aufnahme durch APC und damit ausbleibende schützende Immunreaktion *in vivo* induziert [191]. Adjuvanzen aktivieren unspezifisch das angeborene Immunsystem und steigern dessen Antwort auf eine spezifische Vakzine. Sie können lösliche Antigene in partikuläres Material umwandeln, wodurch deren Aufnahme durch APC wie Makrophagen beschleunigt wird [190]. Setzt sich ein Adjuvanz aus mikrobiellen Bestandteilen zusammen, kann es die Immunantwort auf ein spezifisches Antigen außerdem durch Induktion der Produktion inflammatorischer Zytokine und einer lokale Entzündungsreaktion verstärken [190].

Für die CL ist die Induktion einer protektiven CD4<sup>+</sup> Th1- und CD8<sup>+</sup> Tc1-Zellantwort unerlässlich, um die Generation lang anhaltender Gedächtnisantworten als Schutz vor einer Sekundärinfektion einzuleiten. Die Adjuvanz-Abhängigkeit der Vakzin-Wirkung äußert sich im Phänotyp nach der Infektion. So zeigten bspw. immunisierte BALB/c Mäuse, denen ein ribosomales Leishmanien-Protein in Abwesenheit von CpG als Adjuvanz injiziert worden war, größere Läsionen und eine Viszeralisierung der *L. major* Parasiten nach der Infektion im Vergleich zu mit Protein + CpG behandelten Tieren [192].

Für die Immunsierung von C57BL/6 Mäusen kamen in dieser Arbeit ebenfalls CpG ODN als Adjuvanz zum Einsatz. Die Abwesenheit dieses Wirkverstärkers brachte auch hier einen verschlechterten Krankheitsverlauf der Tiere nach *L. major* Infektion mit sich, was sich in der Entwicklung größerer Ohrgranulome äußerte. Mäuse, denen zuvor die schützende Dosis der SP + CpG injiziert worden war, blieben hingegen phänotypisch unauffällig. Bei CpG ODN handelt es sich um nicht methylierte Cytosin-Guanin-Oligodesoxynukleotide, welche die Wirkung bakterieller DNA imitieren. Durch die Transfektion humaner und muriner Zellen mit TLR9 wurde nachgewiesen, dass die CpG-DNA direkt über den TLR9 der APC erkannt wird und daher auch als TLR9-Agonist bezeichnet wird [193]. Innerhalb der Zelle werden CpG-Motive als Bestandteil intrazellulärer Pathogene erkannt und induzieren eine Th1/Tc1-gerichtete Immunantwort, wodurch die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (wie CD40) und MHC-Moleküle auf der APC-Oberfläche sowie eine vermehrte Produktion Th1-spezifischer Zytokine eingeleitet wird [194;195]. Erfolgreich eingesetzt wurde das Adjuvanz CpG-ODN bereits zusammen mit hitzeinaktivierten Leishmanien als Vakzine bei der Immunsierung von C57BL/6 Mäusen [196]. Dabei wurde eine schützende T-Zell-vermittelte Immunantwort induziert, die die Mäuse auch noch ein halbes Jahr nach der Primärinfektion gegen *L. major* schützte. Zur Verhinderung des intrazellulären Abbaus der Oligonukleotide durch Nukleasen müssen diese allerdings chemisch modifiziert werden. Für die *in vivo*-Anwendung eignen sich daher definierte synthetische CpG-Motive, die eine Modifikation mit Phosphorothioat beinhalten, wodurch sie gegen die proteolytische Enzymaktivität *in vivo* resistenter sind. Da bisher keine explizit IL-12-induzierende CpG-Sequenz ermittelt werden konnte, ist jedoch unklar, inwieweit CpG als Adjuvanz für die Immunsierung im humanen System gegen Leishmanien effektiv einsetzbar ist [195]. Die durch aktivierte DC induzierte, IL-12-vermittelte T-Zellaktivierung ist für die Abwehrmechanismen gegen das Humanpathogen *L. major* von besonderer Wichtigkeit.

Rekombinantes IL-12 (rIL-12) fand bereits ebenfalls Anwendung als Adjuvanz im Rahmen von Immunsierungen der Maus. Es förderte, wie unter physiologischen Bedingungen, nach der Freisetzung durch infizierte aktivierte DC, in BALB/c Mäusen eine Th1-gerichtete Immunreaktion [140]. Die Immunsierung von suszeptiblen Mäusen mit SLA oder LACK-Protein jeweils in Kombination mit rIL-12 führte allerdings nur zu einem Kurzzeit-, nicht aber

zu dem gewünschten Langzeitschutz der Mäuse gegen *L. major*, die auf die geringe Halbwertszeit des IL-12-Proteins zurückzuführen war [139;197]. CFA/IFA (*complete/incomplete Freund's adjuvant*) als Adjuvanz induzierte in Kombination mit *L. infantum*-spezifischen Proteinen (wie Histon H1 und Cysteinpeptidase) ebenso eine Th1-dominierende Antwort in BALB/c [198] und führte zur Resistenzentwicklung von mit Endotoxin behandelten Mäusen gegen die intranasale Infektion mit vesikulärem Stomatitis-Virus im Gegensatz zu Mäusen, die Endotoxin allein injiziert bekamen [199]. Bei CFA handelt es sich um eine Wasser-Öl-Emulsion, welche getötete *Mycobacteria tuberculosis* beinhaltet und deren Anwendung aufgrund ihrer entzündungsfördernden Eigenschaften lediglich auf die i.d. oder s.c. Applikation beschränkt sein sollte.

Die Bestimmung der Parasitenzahlen (Parasitenlast) in dem infizierten Wirtsorganismus ermöglicht einen Rückschluss auf den Schweregrad der Infektion in Zusammenhang mit einer Viszeralisierung und gibt Aufschluss über die Wirksamkeit der zu testenden Substanz. Die Immunisierung mit 1 µg SP + CpG führte zu kleineren Parasitenzahlen in dem Infektionsort Ohr im Vergleich zu denen von Mäusen, welche mit Puffer, CpG allein oder dergleichen SP-Dosis ohne Adjuvanz behandelt worden waren. Dieses Ergebnis kann als Indiz betrachtet werden, dass in den geschützten Mäusen, welche nahezu keine Läsionen entwickelten, eine dominierende Th1/Tc1-Zellantwort induziert wurde. Diese protektive Antwort führte anscheinend zur Aktivierung infizierter MΦ und hatte die Hochregulation derer NO-Synthase zur Folge, wodurch der Großteil der intrazellulären Amastigoten abgetötet wurde. Auch führt diese Behandlung nicht zur Viszeralisierung der Parasiten in die Milz, wobei die Zahl der Leishmanien bei dem kutanen Krankheitsbild aufgrund des immunkompetenten genetischen Hintergrunds der C57BL/6 Mäuse insgesamt gesehen sehr gering ausfällt im Gegensatz zu der in suszeptiblen Mausstämmen, welche unbehandelt eine VL entwickeln.

Überraschenderweise ließ sich mit dLK-Zellen geschützter C57BL/6 Mäuse nach *L. major* Infektion lediglich eine verminderte Antigen-spezifische Zytokin-Produktion nachweisen, die sich im Vergleich zu den anderen Gruppen in signifikant geringeren IFN $\gamma$ -Levels äußerte. Ein schützender Vakzinen-Effekt gegen Leishmanien-Infektionen wird in der Regel jedoch mit einer dominierenden Th1/Tc1-Antwort und vermehrten Produktion spezifischer Zytokine wie IFN $\gamma$  assoziiert. Mögliche Ursachen für das in dieser Arbeit detektierte, unerwartete Zytokin-Profil der dLK-Zellen (dem Phänotyp nach urteilend) geschützter Mäuse, wie der Einfluss inflammatorischer Zellen am Infektionsort oder humoraler Antworten, soll an späterer Stelle diskutiert werden.

### 4.3. Immunisierung mit SP und CpG ODN als Adjuvanz induziert T-Zellaktivität *in vivo*

Die *in vitro*-Freisetzung T-Zell-spezifischer Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-17A, -4 und -10) in den mit SP + CpG als Adjuvanz immunisierten C57BL/6 Mäusen fiel mehrere Wochen nach der *L. major* Infektion signifikant geringer aus im Vergleich zu den anderen Versuchstiergruppen (siehe Abb. 7c). Daher wurde der Fokus auf den Zeitpunkt vor einer Infektion, d. h. unmittelbar nach der P/B/B-Immunisierung, gelegt und geprüft, inwieweit T-Zellen in Folge der verschiedenen Behandlungen *in vivo* geprimt worden waren. Zu diesem Zweck wurden dLK-Zellen aus entweder mit PBS, CpG allein oder der schützenden SP-Dosis kombiniert mit CpG als Adjuvanz vorbehandelten Mäusen *in vitro* Antigen-spezifisch restimuliert und die spezifische Induktion einer CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellexpansion durchflusszytometrisch analysiert.

Als Positivkontrolle wurde SEB zur Überprüfung der Intaktheit von T-Zellfunktion und –Aktivierbarkeit nach der spezifischen Restimulation eingesetzt. Als Superantigen ist es spezifisch für TCR-V $\beta$ -Domänen und befähigt, 2-20% aller T-Zellen zu stimulieren [190;200]. Es kann im Gegensatz zu anderen Antigenen von T-Zellen erkannt werden und deren Aktivierung induzieren ohne die übliche Antigen-Prozessierung und –Präsentation durch APC durchlaufen zu haben. Vielmehr bindet es als intaktes Protein an die  $\alpha_{II}$ -Kette bereits Peptid-beladener MHC Klasse II-Moleküle sowie die CDR2-Schleife der TCR- $\beta$ -Kette auf T-Zellen. Die Zellen aller Ansätze waren intakt.

Neben unstimulierten dLK-Zellen diente OVA als Negativkontrolle, das heißt für die Antigen-unspezifische T-Zellanregung *in vitro*. Es stellt den Hauptproteinanteil im Eiklar von Vögeln dar und wird unter anderem durch die Bindung an Mannose-Rezeptoren (MR) von APC endozytiert [201]. Lösliches OVA induziert durch MR-vermittelte Kreuzpräsentation über MHC Klasse I-Moleküle die CD8<sup>+</sup> bzw. über die klassische Präsentation über MHC Klasse II-Moleküle CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung [202].

Durch die Antigen-spezifische Restimulation mit SLA bzw. SP ließen sich nahezu gleiche Proliferationsraten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus mit SP + CpG immunisierten Tieren induzieren (siehe Abb. 8a). Dies bedeutet zum einen, dass beide T-Zellsubtypen bereits durch die Vorbehandlung mit den löslichen *L. major*-spezifischen Bestandteilen erfolgreich geprimt wurden und *in vivo* eine primäre Immunreaktion induziert worden war. Zum anderen wurden die aus SLA isolierten SP als Bestandteil von SLA erkannt, was die gleichermaßen hohen induzierten T-Zellproliferationsraten erklärt und deren reaktives Potential zeigt. T-Zellen aus dLK der Negativkontrolltiergruppen wurden nach Antigen-spezifischer Stimulation mit SLA bzw. SP nicht bzw. kaum zur Proliferation angeregt, ebenso wie die mit OVA unspezifisch stimulierten Zellen der SP-immunisierten Mäuse. Für diese Ansätze kam

es *in vitro* zum Erstkontakt mit den entsprechenden Antigenen, wodurch sie durch die spezifische Stimulation nicht befähigt waren, als Gedächtniszellen zu reagieren.

Aufgrund der immunogenen Eigenschaften der SP *in vivo*, sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivität zu induzieren sowie immunkompetente Mäuse gegen *L. major* zu schützen, und aufgrund ihres reaktiven Potentials *in vitro* erfüllten sie wichtige Grundvoraussetzungen für die Generation einer effektiven Vakzine gegen die CL und eigneten sich für die weitere Analyse ihrer Bestandteile.

#### 4.4. Reaktives Potential einzelner SP-Fraktionen

Von Interesse war es, zu überprüfen, wie weit sich die immunogenen SP in ihre Komponenten auftrennen ließen unter Beibehaltung von residualer reaktiver Kapazität. Ein früher vermehrt angewandtes Verfahren für die Fraktionierung komplexer Proteingemische ist die zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese, bei der die Proteine ihrer Ladung und Größe entsprechend separiert werden. So fraktionierten bspw. Melby und Kollegen auf diese Weise lösliche Antigene von *L. donovani* Promastigoten (SLDA) für die Untersuchung von Zellantworten peripherer Blutlymphozyten aus Leishmaniasis-Patienten [203]. Der Einsatz eines Markers für die Protein-Detektion im Gel sowie die diffizile Elution aus einem einzelnen Protein-Spot einschließlich der aufwendigen Prozedur für die Marker-Entfernung, welche mit einem hohen Risiko des Probenverlustes behaftet ist, weisen die Nachteile dieser Methodik auf. Für die Separation der SP als heterogenen Proteinpool wurde daher das *fast protein liquid chromatography* (FPLC)-Verfahren zusammen mit einer Anionenaustauscher-Säule angewandt, welches ohne den Einsatz von *Labeling*-Farbstoffen auskommt sowie eine gute Auflösung und hohe Empfindlichkeit bietet.

Die eluierten Proteinfractionen wurden daraufhin im dLK-Restimulationsassay mit dLK-Zellen infizierter C57BL/6 Mäuse auf ihr reaktives Potential hin getestet. Vortests mit Fraktionen anderer SLA-Chargen zeigten einen mit mehrmaligem Auftauen assoziierten Reaktivitätsverlust *in vitro*, welcher vermutlich auf den proteolytischen Proteinabbau durch vorliegende, aktivierte Proteasen zurückzuführen war - eine Beobachtung, die Scott und Kollegen bereits mit Fraktionen von Promastigotenlysat gemacht hatten [152]. Zur Vermeidung des Proteinabbaus wurde das Parasitenlysat daher für einige Arbeiten mit einem Proteaseinhibitoren-Cocktail z.B. bestehend aus Leupeptin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und PMSF, ergänzt [153]. Für die Protein-basierte Vakzinierung von BALB/c Mäusen mit einer *L. major* Amastigoten-spezifischen Cysteinproteinase kombiniert mit CFA als Adjuvanz wurde dem Protein hingegen zuvor E-64, ein selektiver Cysteinprotease-Inhibitor, zugesetzt [204]. Um einen Reaktivitätsverlust einzelner SP-Fraktionen durch enzymatischen Proteinabbau in dieser Arbeit zu vermeiden, wurden die Fraktionen direkt nach der Elution

aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. So konnten für die anschließenden Experimente wiederholte Auftauschritte der Proben umgangen sowie einer Proteindenaturierung vorgebeugt werden und durch das stetige Arbeiten auf Eis wurden die Proteasen in einem inaktiven Zustand gehalten.

In dem *in vitro*-Assay induzierten einige titrierte Fraktionen vergleichbar hohe  $\text{IFN}\gamma$ -Levels durch restimulierte T-Zellen wie die gesamte SP-Fraktion aus SLA (siehe Abb. 9b). Durch die durchflusszytometrische Analyse CFSE-gelabelter, mit ausgewählten Fraktionen restimulierter dLK-Zellen wurden sowohl  $\text{CD4}^+$  als auch  $\text{CD8}^+$  T-Zellen als Quelle dieses  $\text{Th1/Tc1}$ -spezifischen Zytokins ermittelt, wobei die Expansion der  $\text{CD4}^+$  gegenüber der  $\text{CD8}^+$  T-Zellexpansion dominierte, was auf den exogenen Ursprung der Leishmanien-Antigene und deren Präsentation über den MHC Klasse II-Weg durch DC zurück zu führen ist. Aufgrund ihrer T-Zellaktivität-induzierenden Kapazität und ihrer Zusammensetzung aus einem Pool vielversprechender  $\text{CD4}$  und  $\text{CD8}$  T-Zellepitope eigneten sich diese Fraktionen für die weitere Analyse zur Identifikation immunogener *L. major*-spezifischer Antigene.

Da es sich bei den reaktiven Proben der Auftrennung mittels DEAE-Säule im Wesentlichen um spät eluierte Proteinfractionen handelte, wurde davon ausgegangen, dass sich darin überwiegend Proteine mit negativen Ladungen befanden. Edward Pearce und Kollegen hatten bereits in den 1980er Jahren das gleiche Phänomen bei der Fraktionierung von SLA beobachtet, mussten ihre Versuche jedoch aufgrund von störenden Interaktionen durch negativ geladene DNA-Reste einstellen (mündliche Mitteilung von Edward Pearce). Es ist zudem bekannt, dass DNA als Vakzinkandidat der dritten Generation gegen die Leishmaniasis ebenfalls zu guter Schutzwirkung mit einhergehenden zellulären und humoralen Immunantworten führen kann [154;155]. Aus diesen Gründen war es wichtig, nachzuweisen, dass der Proteinanteil in den Fraktionen für deren reaktive Eigenschaften *in vitro* verantwortlich war und ein möglicher Einfluss durch verbliebene Nukleinsäuren ausgeschlossen werden konnte. Es stellte sich hierbei heraus, dass die An- bzw. Abwesenheit von DNA/RNA keinen Einfluss auf das reaktive Potential der SP-Fractionen ausübte. Die detektierten T-Zell-induzierenden Eigenschaften *in vitro* waren demnach auf Ebene der Proteine zurückzuführen.

Für die nachfolgende Auftrennung mittels Anionenaustauscherchromatographie mit Hilfe einer kleineren Säule wurden jeweils 4 reaktive DEAE-Fractionen zu insgesamt 4 verschiedenen Pools vereint. Der dLK-Restimulationsassay *in vitro* zeigte ein deutlich vermindertes reaktives Potential der gesammelten Fraktionen im Gegensatz zu den mitgetesteten Fraktionspools I-IV (siehe Abb. 12c). Lediglich einige Fraktionen aus der Auftrennung zweier der 4 Pools waren noch dazu befähigt, T-Zellen aus dLK infizierter C57BL/6 Mäuse zur  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung anzuregen. Da deren Probenmenge bezüglich ihres Proteingehalts für Immunisierungsversuche *in vivo* nicht ausreichte, wurden ausgewählte

reaktive Fraktionen mittels quantitativer, *Label*-freier Massenspektrometrie auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht.

#### **4.5. Identifikation *L. major*-spezifischer Proteine mittels Massenspektrometrie**

In den reaktiven Fraktionen ließen sich massenspektrometrisch insgesamt 36 verschiedene *L. major*-spezifische Proteine identifizieren. Davon waren 8 bisher uncharakterisierte Proteine in der Datenbank aufgeführt, während sich den anderen Proteinen konkrete oder mutmaßliche Namen und Funktionen zuordnen ließen (siehe Anhang). Etwa ein Drittel der identifizierten Proteinkandidaten weisen Protease-Aktivität auf und sind, z.B. als Nuklease, Peptidase oder Oxidoreduktase, unter anderem in katabolische DNA-Prozesse, Aminosäure-Stoffwechselprozesse oder die zelluläre Redoxhomöostase involviert. 3 weitere Proteine sind struktureller Bestandteil des Zytoskeletts (z.B. Tubuline) und aufgrund ihrer Involvierung in Mikrotubuli-basierende Prozesse an der Motilität des Parasiten beteiligt. Weiteren einzelnen Proteinkandidaten fällt hingegen eine Rolle bei der RNA-Prozessierung, DNA-Bindung, als Regulatoren zellulärer Prozesse oder der Bindung intrazellulärer Ionen zu.

Diese 36 detektierten Proteine schlossen interessanterweise 6 Proteine (A-F) mit ein, die jeweils in Fraktionen beider separierten Pools detektiert worden waren, was deren reaktives Potential bestätigte und bekräftigte. Dadurch und aufgrund der Tatsache, dass diese Proteine bisher noch nicht in der Literatur Erwähnung fanden oder zur Anwendung kamen, wurde die Fokussierung auf diese 6 Proteine gelegt und machte sie zu interessanten Kandidaten für weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Tests.

Bei den Proteinen A und B handelt es sich um bisher nicht charakterisierte Proteine. Protein C (~80 kDa) ist als Zytoskelett-assoziiertes Protein CAP5.5 daran beteiligt, der Zelle als Bestandteil des dynamischen, zytoplasmatischen Zytoskelettsystems Stabilität und Struktur zu verleihen sowie zur Mikrotubuli-Dynamik und damit der Zellmotilität beizutragen. Während das sehr immunogene LACK-Protein (36 kDa) wichtig für die Viabilität und Infektiosität der Leishmanien ist [205;206], ist dessen molekulare Funktion weitestgehend unbekannt. In der Nähe des Kinetoplasten (*Leishmania* DNA) lokalisiert, wird ihm die Beteiligung an Wechselwirkungen mit Proteinen zugesprochen, welche in die Prozesse der RNA-Synthese und DNA-Replikation involviert sind [207].

Einige prominente Proteine, die Schutz gegen eine Leishmanien-Infektion vermitteln, sind hingegen auf der Oberfläche der Parasiten zu finden. Das ~64 kDa große Glykoprotein 63 (gp63, Leishmanolysin), ist eine Zink-abhängige Metalloprotease, welche zur Klasse der Metzincine gehört und auf der Oberfläche von Promastigoten sitzt, mit der Membran über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verbunden [208]. Die enzymatische Spaltung

des GPI-Ankers durch Phospholipase C sorgt für das *Shedding* von gp63 in den extrazellulären Raum, wobei ebenfalls von einer direkten Sekretion über die Flagellumtasche des Parasiten berichtet wurde [208]. Nach der *Leishmania* Infektion von MΦ moduliert gp63 verschiedene Signalproteine (wie JAK-2 und MAP-Kinasen), Transkriptionsfaktoren (wie STAT-1 und NF-κB) sowie das translationale Protein *mammalian/mechanistic target of rapamycin* (mTOR) [209-211]. Des Weiteren ist es in der Lage, vermutlich über Exosomen Zugang zu dem MΦ –Zytosol zu erlangen, wo es prominente Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) schneidet [211;212]. Die Expression von gp63 ist auf Amastigoten zwar im Gegensatz zu der Promastigoten Lebensform herunterreguliert, aber trotzdem nachweisbar. Das Protein PSA-2 ist – wie gp63 – über einen GPI-Anker mit der Parasitenmembran verankert [213]. In Promastigoten wurden 3 Polypeptide dieses Proteins (96 kDa, 80 kDa und 50 kDa) mittels SDS-Gelelektrophorese detektiert, wobei ein einzelnes Polypeptid (50 kDa) in Amastigoten, das große Homologie zu den Promastigoten-spezifischen Proteinen aufweist, nachgewiesen worden ist [130; 214]. Mit Ausnahme von *L. braziliensis* werden PSA-2 Homologe in allen *Leishmania* Spezies exprimiert [215].

Der Proteinkandidat D, Calmodulin (~17 kDa), ist als intrazelluläres Rezeptorprotein für Calciumionen in allen eukaryotischen Zellen weit verbreitet. Durch die Bindung von Calciumionen an die 4 Bindungsstellen (Helix-Schleife-Helix-Motiv, „EF-Hand“), beruht die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Regulation vieler Enzyme, Rezeptoren und Ionenkanäle sowie Zellprozesse auf ihm. Das bekannte Immunogen LmSTI1 (~62 kDa) ist bspw. ebenfalls weit verbreitet und in Organismen von der Hefe bis zum Menschen konserviert [216].

Die Proteine E und F weisen - laut ihres Namens - proteolytische Eigenschaften auf. Kandidat E, eine Aspartyl-Aminopeptidase (~50 kDa), gehört zu den Exopeptidasen, da sie die hydrolytische Spaltung eines sauren Aminosäurerests vom N-terminalen Ende der Polypeptide katalysieren. Es ist ein zytosolisches Protein, das in den Metabolismus intrazellulärer Proteine involviert ist und Zinkionen als Cofaktor für seine Aktivität benötigt. Die GTP-Cyclohydrolase (~30 kDa), Protein F, ist ein Enzym, das den intrazellulären Energiespeicher anaboler Stoffwechselforgänge, Guanosintriphosphat (GTP), hydrolytisch zu einer Vorstufe des Bioterin abbaut.

Das bereits im Rahmen von Studien in Maus und Mensch eingesetzte immunogene Protein TSA (~22 kDa) zeigt hingegen Peroxiredoxin-Aktivität [141]. Das heißt, es katalysiert im reduzierten Zustand die Reduktion von Hydroperoxiden zum entsprechenden Alkohol, wobei es selbst an einem Cysteinrest oxidiert wird. Der Ursprungszustand wird dann in einem weiteren Schritt über die gleichzeitige Oxidation eines Thiols wiederhergestellt.

Für die rekombinante Expression wurden die Proteine A, B, C und E ausgewählt, da ihr Vorkommen in den jeweiligen Fraktionen mit dem fraktions-spezifischen reaktiven Potential, das heißt der Eigenschaft *in vitro* hohe IFN $\gamma$ -Levels zu induzieren, gut korrelierte. Diese Korrelation war für Protein D hingegen schlechter, es wurde als Negativbeispiel mitgeführt.

Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine stammen aus SLA der promastigoten Lebensform von *L. major*. Betrachtet man jedoch die in einem infizierten Säugetier als Wirt vorliegende Situation, so handelt es sich bei den obligat intrazellulären Amastigoten um die relevante Leishmanien-Lebensform, welche maßgeblich zur Entwicklung einer protektiven Immunantwort gegen diese Parasiten beiträgt. Amastigoten werden im Gegensatz zu Promastigoten effizient von DC internalisiert [7;60], weswegen die von den DC prozessierten und präsentierten Antigene überwiegend aus der amastigoten Lebensform stammen dürften, die für das T-Zell-*Priming* im dLK zuständig und entscheidend sind. Seit wenigen Jahren ist die *in vitro*-Generation von Amastigoten einiger *L. major*-Stämme möglich, ein aufwendiges Verfahren, welches die bisher genutzte „Passage durch die Maus“ für die Transformation von der promastigoten in die amastigote Lebensform *in vivo* umgeht [217]. Die vergleichende massenspektrometrische Analyse von SLA aus Promastigoten sowie *in vitro*-generierten Amastigoten des hier genutzten Stammes Friedlin zeigte, dass die Proteinkandidaten A, B und C gleichermaßen in beiden Lebensformen exprimiert werden (nicht publizierte Daten von Sven Brosch, Stefan Tenzer und Ger van Zandbergen, 2009). Protein D wurde hingegen in höheren Levels in der promastigoten Form detektiert, während die Protein E-Stoffmenge vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze lag.

Die in der Literatur beschriebenen immunogenen Proteine, LACK, der *Leishmania eukaryotic initiation factor* (LeIF) und TSA, werden ebenfalls gleichermaßen in der promastigoten als auch amastigoten Lebensform der Leishmanien exprimiert [138;141;205;218], was die Wichtigkeit dieser Präsenz für das immunogene Potential verdeutlicht. Das Molekulargewicht, die Lokalisation und Funktion der Proteine scheint hingegen keine tragende Rolle zu spielen und variiert stark zwischen den bereits bekannten Vakzinkandidaten. Auf diesem Hintergrund basierend erfüllten die für die Expression ausgewählten Proteintargets A-C sehr gute Voraussetzungen, um als potentielle, effektive Vakzinkandidaten zu wirken.

#### 4.5.1. Herstellung rekombinanter Proteinkandidaten

Die Herstellung der Proteinkandidaten erfolgte mit Hilfe von *E. coli* Bakterien als Expressionswirt. Auf diese Weise ließen sich 4 der 5 Proteine (A, C, D und E) erfolgreich exprimieren und mittels terminal angefügter *His-tags* reinigen (siehe Abb. 15).

Prokaryotische Expressionssysteme, wie *E. coli* Bakterien, zeichnen sich durch geringe Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen, hohe Wachstums- und Expressionsraten in Verbindung mit einem zu anderen Systemen vergleichsweise geringen Kostenfaktor aus. Im Gegensatz zu eukaryotischen Expressionssystemen ist bei ihnen jedoch das Fehlen entsprechender Mechanismen zur posttranslationalen Modifikation, wie der Glykosylierung, für die Herstellung von Proteinen aus Eukaryoten, wie Leishmanien, von Nachteil. Daher sind die für thermische Stabilität, Aktivität und Freisetzung des Proteins nötigen Bedingungen in *E. coli* als Expressionswirt nicht gewährleistet. Da die zu untersuchenden Proteinkandidaten jedoch bisher nicht näher beschrieben und keine Glykosylierungsstellen bekannt sind, waren diese Kriterien zunächst vernachlässigbar. Für zukünftige Tests wäre der funktionelle Vergleich von mit Hilfe eines pro- bzw. eukaryotischen Expressionssystems gewonnenen *Leishmania*-Proteine jedoch wünschenswert.

#### 4.5.2. Charakterisierung der Proteintargets *in vitro*

Die 4 rekombinanten Proteine wurden *in vitro* auf ihre T-Zellaktivität-induzierenden Eigenschaften hin untersucht. Im Rahmen des dLK-Restimulationsassays expandierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation mit den Proteintargets A, C und E. Im Gegensatz dazu lagen die Frequenzen proliferierender T-Zellen beider Subtypen nach Antigen-Behandlung mit Protein D im Bereich der Negativkontrollen. Dies bestätigte die zuvor für die Wahl der Proteinherstellung berücksichtigten Kriterien. Das nach Antigen-spezifischer Restimulation erhaltene Zytokin-Profil war allerdings für alle 4 Proteinkandidaten gleichermaßen dominierend, wenn auch nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollansätzen, für Th1/Tc1-spezifisches IFN $\gamma$ . Verstärkt wurde das reaktive Potential der Proteine A und C zusätzlich durch ihre Eigenschaft, im Gegensatz zu Protein D und E, durch SP + CpG-Immunsierung von C57BL/6 Mäusen *in vivo* geprimte T-Zellen Antigen-spezifisch *in vitro* zur Proliferation anzuregen. Dabei dominierte die Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber der der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, was auf den exogenen Antigen-Ursprung zurückzuführen ist. Die jeweiligen erhöhten Frequenzen der proliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren jedoch nicht so hoch wie nach der Restimulation mit SP und zeigen, dass die Proteine A und C von den *in vivo* geprimten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Bestandteil der SP erkannt wurden.

Für die Heilung der CL sollten jedoch beide relevanten T-Zellsubtypen angesprochen werden, weswegen nur 2 der 4 rekombinanten Proteinkandidaten die wichtigen Voraussetzungen für die Generierung einer potentiellen Vakzine gegen *L. major* zum Teil erfüllen und interessante Kandidaten für Immunisierungsstudien *in vivo* darstellen.

#### 4.6. Proteintargets als potentielle Vakzinkandidaten

Der Einsatz *Leishmania*-spezifischer Proteine hat sich bereits in der murinen experimentellen Leishmaniasis als vielversprechende Vakzinierungsstrategie erwiesen. Bei diesen Proteinen handelt sich um definierte Moleküle mit unterschiedlichem immunogenem Potential, die relativ einfach und kostengünstig mit konstanter Qualität herstellbar und in definierter Dosis in Kombination mit einer Adjuvanz applizierbar sind. Neben Einzelproteinen wie gp63 und PSA-2 [129;130;219], wurden ebenfalls Fusionsproteine wie TAT-LACK (220;221) oder Polyproteine, z.B. Leish-111F [222] oder verschiedene Speichelproteine aus Vektorsandmücken [223;224], getestet. Die untersuchten Proteine vermittelten Th1-gerichtete Immunantworten und induzierten Kurzzeitschutz (*reviewed* in [16]). Es ist daher wichtig, neue und effizientere Proteine zu finden, die als potentielle Vakzinkandidaten in Betracht gezogen werden können.

Die erstmalige Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit den 4 neu identifizierten *L. major*-spezifischen Proteinen A, C, D und E in Kombination mit CpG als Adjuvanz zeigte, dass ausschließlich Protein C + CpG die behandelten Tiere vor einer *L. major* Infektion schützte (siehe Abb. 19). Die anderen 3 Proteine zeigten hingegen keinen Schutzeffekt gegen *L. major in vivo* und entwickelten Granulome im Bereich der Negativkontrolltiergruppe. Gegen die i.d. Infektion von suszeptiblen BALB/c Mäusen erwies sich neben Protein C zusätzlich Protein E als effektives, immunogenes Antigen (siehe Abb. 25).

Die terminal an die Proteinsequenzen gekoppelten His-*tags* wurden vor dem Einsatz der Proteine nicht abgespalten. Die großen Unterschiede in der protektiven Kapazität der Proteine A und E bzw. des Proteins C *in vivo*, welche die gleiche 9His-TEV-*tag*-Sequenz besitzen, zeigten jedoch, dass der *tag* keinen Einfluss auf die Proteineigenschaften ausübte und daher irrelevant für deren weitere Analyse ist.

Mit Proteintarget C wurde ein neuer möglicher Vakzinkandidat gegen die murine CL gefunden, der als vielversprechender Pool spezifischer T-Zellepitope einsetzbar ist. Zur Überprüfung inwieweit Protein C in der Lage ist, Gedächtniszellantworten zu induzieren, die für den erforderlichen Langzeitschutz gegen den Erreger unerlässlich sind, könnte ein adoptiver T-Zelltransfer in suszeptible Mäuse (z.B. Rag1<sup>-/-</sup> mit T- und B-Zelldefizienz) vor einer Infektion mit *L. major* Aufschluss bringen.

Die Parasitenlast in immunisierten und infizierten Mäusen ermöglicht den Rückschluss auf den Schweregrad der Infektion, eine mögliche systemische Erregerverbreitung sowie die Wirksamkeit der eingesetzten Vakzine. Die Anzahl der *L. major* Parasiten im Ohr der mit Protein A oder C + CpG immunisierten C57BL/6 Mäuse zeigte 6 Wochen nach der Challenge mit lebenden Promastigoten keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 20b). Dies bedeutet, dass die unterschiedlichen Läsionsgrößen unabhängig von der Zahl am Infektionsort präsenter Leishmanien zu betrachten sind. So zeigten Peters und Kollegen, dass C57BL/6 Mäuse nach Immunisierung mit einem rekombinanten *Leishmania*-Polyprotein und *L. major* Infektion gleiche Läsionsgrößen wie die Kontrolltiere aufwiesen, während die Anzahl der Leishmanien am Infektionsort signifikante Unterschiede aufwies [225].

Auffällig war jedoch, dass die gegen *L. major* geschützten Tiergruppen – nach SP bzw. Protein C + CpG-Behandlung – im Gegensatz zu den mit Protein A + CpG oder CpG allein behandelten Mäusen keine Anzeichen einer Viszeralisierung in die Milz zeigten (siehe Abb. 20b). Dies wurde bereits in anderen Publikationen als Maß für die Wirksamkeit einer erfolgreichen Protein-basierten Immunisierung behandelt. Die geringe Läsionsentwicklung *L. major* infizierter BALB/c Mäuse stand dabei in Zusammenhang mit dem protektiven Effekt ohne systemische Erregerverbreitung nach der Immunisierung mit den *L. major*-spezifischen rekombinanten, ribosomalen Proteinen Lm3 und Lm5 [192].

Die in allen Gruppen gleichermaßen hohe Parasitenanzahl am Infektionsort lässt auf erhöhte IL-10-Werte in der Ohrdermis spekulieren, welche für die Aufrechterhaltung der Erregerpersistenz beschrieben sind [82]. Die Frequenzen vorliegender Th2-assoziiertes Zytokine wie IL-10 und IL-4 müssten in nachfolgenden Versuchen ergänzend untersucht werden.

Es stellt sich die Frage, warum die verschiedenen immunisierten Mausgruppen bei nahezu gleicher Anzahl vorliegender viabler Parasiten am Infektionsort unterschiedlich voluminöse Granulome entwickelten. Klassischerweise würde man in den Gruppen, die kleine bis keine Läsionen entwickelten, hohe IFN $\gamma$ -Werte erwarten, welche mit der iNOS-Hochregulation durch infizierte Gewebe-M $\Phi$  und damit einhergehenden geringeren Leishmanien-Lasten assoziiert wären. Dies wurde bereits in mehreren Fällen von anderen Arbeitsgruppen und uns gezeigt. So wiesen einerseits die mit hochimmunogenem SLA 3x immunisierten C57BL/6 Mäuse nach *L. major* Infektion nahezu keine Granulome auf im Vergleich zu der Negativkontrolltiergruppe bei gleichzeitig signifikant erniedrigten Parasitenlasten [185]. Andererseits ist bekannt, dass SLA in Kombination mit einem Adjuvant nicht befähigt ist, den Wirtsorganismus langfristig gegen eine Leishmanien-Reinfektion mit zu vermitteln [139;151]. In Hinblick auf eine vorliegende oder nach einer Leishmanien-Infektion erworbene Immunsuppression betroffener Individuen wäre es unter dem Sicherheitsaspekt von Vorteil,

wenn die Behandlung mit einem Antigen zur vollständigen Parasitenelimination führen würde, um einem progressiven Krankheitsverlauf, z.B. im Falle einer erlangten Ko-Infektion, vorzubeugen. Aufschluss über das Zytokin-Milieu im Ohr direkt nach der Immunisierung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der *L. major* Infektion würde eine Kinetik mit Hilfe intrazellulärer FACS-Färbung von T-Zellen in der Haut liefern.

Überraschenderweise war in dieser Arbeit die Produktion des schützenden Zykons  $\text{IFN}\gamma$  nach Antigen-spezifischer Restimulation der dLK-Zellen mit SLA sowie die intrazelluläre Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  und des Th1-induzierenden Transkriptionsfaktors T-bet vor allem in den dLK-Zellen bei den nahezu läsionsfreien Tiergruppen - nach SP + CpG- und Protein C + CpG-Behandlung - in Woche 6 nach der Infektion signifikant vermindert im Vergleich zu den mit CpG allein oder Protein A + Adjuvanz behandelten Mäusen (siehe Abb. 20c, 22). Die gegen *L. major* geschützten Tiere besaßen zum Zeitpunkt der Ernte kleinere dLK und hatten signifikant kleinere absolute T-Zellzahlen als die der anderen Gruppen. Da  $\text{CD4}^+$  T-Zellen als Hauptproduzenten des  $\text{IFN}\gamma$  im Gegensatz zu  $\text{CD8}^+$  T-Zellen nicht in die Zytolyse infizierter Phagozyten involviert sind [75], ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Zahl  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und der Läsionsgröße nicht zwingend gegeben [226]. Allerdings können diese neben  $\text{CD8}^+$  T-Zellen generell durchaus mit zur Granulombildung beitragen [227;228].

Die geringeren T-Zellzahlen in den beiden erwähnten „geschützten“ Mausgruppen könnten ebenfalls eine Erklärung für die erniedrigten Frequenzen und absoluten Zahlen T-bet- und  $\text{IFN}\gamma$ -positiver Zellen im Vergleich zu den anderen Tiergruppen sein, was anhand einer Korrelation zwischen dem Vorkommen von T-Zellen und der Zytokin-Freisetzung erklärt werden könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Immunreaktionen der  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen durch Toleranzinduktion ausgeschaltet sind. Dies ließe sich z.B. mit Hilfe von Reinfektionsversuchen sowie dem bereits genannten adoptiven T-Zelltransferversuch in empfindliche Mäuse vor einer Challenge mit *L. major* untersuchen.

In den Ohren ergab sich ein anderes Bild (siehe Abb. 24): Im Vergleich zu den CpG-Kontrolltieren war dort das Vorkommen  $\text{CD4}^+$  sowie  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in den Gruppen der Protein-basierten Immunisierungsansätze insgesamt geringer. Im Falle der Protein C-Behandlung ließen sich jedoch, verglichen mit den anderen Gruppen einschließlich der ebenfalls „geschützten“ SP + CpG-Gruppe, beide T-Zellsubtypen vermehrt detektieren, deren Zellen doppelt-positiv für die untersuchten Th1-assoziierten Faktoren waren. Für die Tiere der Positivkontrolle (SP + CpG-Behandlung) hätte man jedoch ein ähnliches Muster erwartet. Stattdessen ist das Vorkommen von T-bet<sup>+</sup>  $\text{IFN}\gamma^+$  T-Zellen im Falle der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen sogar gegenüber dem Vorkommen aus Protein C + CpG-immunisierten Mäusen in signifikant erniedrigt. Besonders durch diese Diskrepanz im Zytokin-Profil der Ohr-Zellen dieser beiden vermeintlich geschützten Gruppen überrascht die Beobachtung, dass sich die jeweiligen Parasitenlasten am Infektionsort nicht voneinander unterscheiden lassen.

In der bisher beschriebenen Literatur lassen sich hierzu Untersuchungen finden, die ansatzweise eine Erklärung für dieses Phänomen liefern könnten. So zeigten Dudda und Kollegen, dass das *Trafficking* von T-Zellen in die Entzündungsherde der Haut und die Induktion sogenannter *skin-homing* T-Zellen wesentlich durch die Mikroumgebung des Gewebes sowie von der Immunisierungsrouten mit DC beeinflusst werden [229;230]. Dabei führte die intrakutane, nicht aber die intravenöse Injektion von BMDC in die Maus zur Induktion von *skin-homing* CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche sich sowohl durch die Hochregulation der Expression des Gewebe-selektiven *homing* Rezeptors E-Selektin-Ligand sowie durch ihre Effektorfunktion im Zusammenhang mit einer Kontakthypersensitivität auszeichneten. Dieser Status blieb auch in der Gedächtnisphase ohne weiteren Antigen-Kontakt konstant. Im Gegensatz dazu hatte die intraperitoneale Injektion der DC die Expression des Integrins  $\alpha_4\beta_7$  von T-Zellen zur Folge, welche den Darm als Zielort für die Migration vorgeben [229]. Neben der Immunisierungsrouten induzierten zusätzlich DC verschiedenen Gewebeerstammes die Expression korrespondierender *homing* Marker auf T-Zellen, was ebenfalls andere Forschungsgruppen zeigten und bestätigten [231].

Auch in dieser Arbeit ist der Einfluss spezifischer Kombinationen von Adhäsionsmolekülen und Chemokin-Rezeptoren durch Langerhans Zellen der Haut oder DC in den dLK für die spezifische Migration der T-Zellen in die Haut denkbar und könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Vorkommen der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Ohren und dLK i.d. immunisierter Mäuse und damit einhergehenden Zytokin-Profile darstellen.

Um die für Ohr-Zellen ermittelten Ergebnisse der beiden intrazellulären FACS-Experimente zu unterstützen, wäre außerdem eine Versuchswiederholung mit Aufnahme von mehr Ohr-Zellen wünschenswert.

Für das murine Modell der CL mit C57BL/6 Mäusen ist bekannt, dass die infizierten Tiere in Woche 6 nach Infektion in Korrelation zur Läsionskurve einen IFN $\gamma$ -Peak zeigen [34]. Die Immunogenität bereits beschriebener, spezifischer Antigene ist neben einer im Vergleich zu den Kontrollen kleineren Parasitenanzahl und Läsionsgröße ebenfalls mit erhöhten IFN $\gamma$ -Werten assoziiert, wobei zusätzlich eine erhöhte IgG2a/IgG1-Ratio als Indikator für eine Resistenzentwicklung gegen Leishmanien beschrieben wird [149;150;192]. Die verschiedenen IgG-Isotypen ließen sich auch hier im Serum der Tiere mittels WB auf ihre Antigen-Spezifität hin untersuchen. Bisher ist eine gesteigerte humorale Immunreaktion v.a. in Zusammenhang mit der VL in Form einer vermehrten Produktion mehrerer spezifischer sowie unspezifischer Antikörper bekannt [227;232]. Allerdings haben die generierten IgG-Titer keinen protektiven Effekt auf den Krankheitsverlauf [30;233]. Scott und Kollegen zeigten ebenfalls, dass eine humorale Antwort kein hilfreiches Parameter zur Identifikation schützender *Leishmania*-Antigene darstellt [152], so dass auch hier eine Beteiligung von B-

Zellen an der Antigen-spezifischen Schutzwirkung von Protein C + CpG ausgeschlossen werden kann.

Inflammatorische Zellen des angeborenen Immunsystems, wie die polymorphonukleären Neutrophilen Granulozyten (PMN), M $\Phi$  und DC, denen wichtige Funktionen in der Erregerelimination und Induktion zellulärer Immunantworten für die Heilung und Resistenzentwicklung gegen *L. major* zufallen, bleiben von einer vorhergehenden Immunisierung unbeeinflusst. Sie sollten sich daher bei Untersuchung des Granuloms verschieden immunisierter C57BL/6 Mäuse nicht in ihrem Vorkommen und ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass mit Protein C als neuer Vakzinkandidat gegen die CL kombiniert mit einem Adjuvant sowohl C57BL/6 als auch BALB/c Mäuse präventiv vor der Entwicklung Infektions-bedingter Läsionen schützte. Seine Schutz-vermittelnde Wirkungsweise wird Bestandteil zukünftiger Experimente sein.

## 4.7. Ausblick

Neben der Vakzinentwicklung als Prävention immunkompetenter Individuen gegen die Leishmaniasis ist der vorbeugende Schutz immunsupprimierter Patienten vor einem Kontrollverlust der systemischen Erregerverbreitung und dem damit einhergehenden Todesurteil bei Nicht-Therapie von besonderer Wichtigkeit. Protein C hat als erstmals eingesetzter Vakzinkandidat besonderes Potential zum Schutz gegen *L. major* und würde sich aus diesem Grund für die Identifikation protektiver T-Zellepitope eignen.

Um nachzuweisen, ob sich ein immunologisches Anti-*Leishmania*-Langzeitgedächtnis entwickelt hat, ließen sich die mit diesem Proteinkandidaten immunisierten, infizierten BALB/c Mäuse zukünftig nach Ausheilung der Primärinfektion einer weiteren Challenge mit demselben Pathogen aussetzen und beobachten, ob sich erneut Läsionen entwickeln oder ein Schutz der Tiere besteht.

Zur Überprüfung der Relevanz der einzelnen T-Zellsubtypen für den Schutz der Mäuse durch Immunisierung gegen *L. major* Parasiten *in vivo*, könnte die Depletion von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels spezifischer Antikörper während der Immunisierungsphase entscheidenden Aufschluss bringen. Ein solches initiales Experiment wird derzeit mit C57BL/6 Mäusen durchgeführt.

Der Einsatz eines bicistronischen IFN $\gamma$ /Green Fluorescent Protein (GFP) Reportermausmodells würde zukünftig die Identifikation und eingehende Charakterisierung der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen im Rahmen Antigen-spezifischer Immunisierungen und i.d. Infektion mit *L. major in vivo* sowie *in vitro* durch Koexpression des fluoreszierenden Proteins ermöglichen und die Detektion dieses Schlüsselzytokins erleichtern.

Für die Identifikation protektiver T-Zell-aktivierender Epitope des Proteintargets C sind verschiedene Vorgehensweisen denkbar. Zum einen ließen sich überlappende Peptidsequenzen (z.B. 15mere) dieses Proteins synthetisieren, welche dann einzeln oder in unterschiedlicher Kombination sowohl in *in vitro*-Assays als auch in Immunisierungsstudien *in vivo* getestet werden könnten. Zum anderen ermöglichen spezielle Algorithmen (wie die Software SYFPEITHI) die theoretische Vorhersage für bevorzugte MHC-Peptidbindungen, was die Anzahl zu synthetisierender und testender Epitope des Proteinkandidaten verringern würde.

Natürlich präsentierte, MHC-assoziierte Peptide ließen sich durch Pulsen einer murinen DC-Linie mit Protein C und anschließender *Stripping*-Verfahren, bei denen die Peptide mittels geeigneter Puffer von der Zelloberfläche abgestreift werden, gewinnen und massenspektrometrisch sowohl identifizieren als auch quantifizieren.

Für die Untersuchung der Proteinreaktivität in humanen Zellen ließen sich isolierte PBMC aus CL-Patienten *ex vivo* Antigen-spezifisch mit Peptiden des Proteinkandidaten C

restimulieren und die Frequenzen proliferierender Zytokin-produzierender CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmen.

Der Einsatz von Polyproteinen wie Leish-111F zeigte bereits Anhaltspunkte für eine potentiell erfolgreiche Vakzinierungsstrategie [131-134]. Sollte z.B. mit Proteinkandidat B ein weiteres immunogenes *L. major*-spezifisches Antigen gefunden werden, so wären ebenfalls *in vivo*-Immunisierungen in Kombination mit Protein C + Adjuvanz zur möglichen Steigerung des immunogenen Potentials und Langzeitschutz-vermittelnder Eigenschaften denkbar.

Eine „optimale“ Anti-*Leishmania*-Vakzine sollte Spezies-übergreifenden Schutz für in Regionen lebende Individuen, in denen Erreger der CL und VL ko-existieren, verleihen [10;175]. Erste Hinweise auf einen möglichen „Kreuzschutz“ lieferte bspw. das *L. donovani* Promastigoten-spezifische Antigen dp72, dass in der experimentellen murinen Leishmaniasis sowohl gegen *L. donovani* als auch *L. major* Schutz vermittelte [234]. Die vergleichende BLAST-Analyse des identifizierten Proteins C zeigte hohe Aminosäuresequenz-Übereinstimmung mit Proteinen VL-verantwortlicher Spezies und bietet dem zu Folge gute Voraussetzungen und Erkenntnisse für die Vakziningenerierung dieser vielgesichtigen Infektionskrankheit. Er ist zukünftig für weitere Immunisierungsstudien und Infektionen mit unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies einsetzbar.

## 5. Materialien und Geräte

### 5.1. Parasiten

*Leishmania major*, Klon V1 (MHOM/IL/80/Friedlin)

Institut Pasteur, Paris, Frankreich

### 5.2. Tiere

C57BL/6 Mäuse

BALB/c Mäuse

Janvier Labs, Saint-Berthevin

Cedex, Frankreich

### 5.3. Antikörper

#### Fluorochrom-konjugierte Antikörper:

Anti-Maus CD3e eFluor450, Klon eBio500A2

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD3e eFluor660, Klon 17A2

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD3e FITC, Klon 145-2C11

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus CD3e PE, Klon eBio500A2

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD4 APC, Klon GK1.5

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD4 APC-Cy7, Klon GK1.5

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus CD4 FITC, Klon L3T4 GK1.5

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus CD8a APC, Klon 53-6.7

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD8a PE-Cy7, Klon 53-6.7

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD8a PerCp-Cy5.5, Klon 53-6.7

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus CD16/CD32 (Fc-Rezeptor III/II), Klon 2.4G2

BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-Maus IFN $\gamma$  APC, Klon XMG1.2

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus IFN $\gamma$  PE, Klon XMG1.2

eBioscience, Frankfurt

Anti-Maus T-bet eFluor660, Klon eBio410

eBioscience, Frankfurt

**Isotypen:**

Arm. Hamster IgG1 FITC, Klon HTK888	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG1 APC, Klon eBRG1	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG1 PE, Klon eBRG1	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a APC, Klon eBR2a	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a PE-Cy7, Klon eBR2a	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a PerCp-Cy5.5, Klon eBR2a	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2b APC, Klon eB149/10H5	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2b APC-Cy7, Klon RTK4530	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b FITC, Klon RTK4530	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b PE, Klon RTK4530	BD Pharmingen, Heidelberg
Syr. Hamster IgG APC, Klon eBio299Arm	eBioscience, Frankfurt
Syr. Hamster IgG eFluor450	eBioscience, Frankfurt

**5.4. Verwendete Kits**

Maus IFN $\gamma$ ELISA Ready-SET-Go! <sup>®</sup>	eBioscience, Frankfurt
Maus IL-4 ELISA Ready-SET-Go! <sup>®</sup>	eBioscience, Frankfurt
Maus IL-10 ELISA Ready-SET-Go! <sup>®</sup>	eBioscience, Frankfurt
DuoSet ELISA Maus IL-17A	R&D Systems, Wiesbaden
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Perbio Science, Bonn
LIVE/DEAD <sup>®</sup> Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Fixation/Permeabilization Set	eBioscience, Frankfurt
Anti Maus/Ratte FoxP3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt

**5.5. Puffer und Verbrauchslösungen**

Alle angesetzten Puffer und Medien wurden mit Hilfe von Filtern der Porengröße 0,2  $\mu$ m sterilfiltriert und, sofern nicht explizit erwähnt, bei 4°C gelagert.

<b>PBS (10x):</b>	1,38 M NaCl 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O, pH 6,6 in dH <sub>2</sub> O
<b>PBS (1x; Gebrauchslösung):</b>	10x PBS und dH <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:10, pH 7,3 autoklavieren

---

<b>TAE-Puffer (50x):</b>	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA, pH 8,5
<b>TAE-Puffer (1x):</b>	50x TAE-Puffer und dH <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:50
<b>Tris-Puffer, Puffer A: (Äquilibrierungspuffer)</b>	10 mM Tris, pH 8, in dH <sub>2</sub> O
<b>Tris/NaCl-Puffer, Puffer B: (Elutionspuffer)</b>	10 mM Tris, pH 8 1 M NaCl in dH <sub>2</sub> O
<b>Benzonase-Arbeitslösung:</b>	50 mM Tris, pH 8 20 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> in dH <sub>2</sub> O
<b>2 µM CFSE-Arbeitslösung:</b>	1:5000-Verdünnung der 10 mM Stocklösung mit PBS, 37°C
<b>FACS-Puffer:</b>	2% (v/v) FCS 0,01% (v/v) NaN <sub>3</sub> , 10%ig in sterilem PBS
<b>Paraformaldehyd (PFA), 4%ig:</b>	4% (w/v) Paraformaldehyd, pH 7,2 in sterilem PBS, Lagerung bei -20°C
<b>Propidiumiodid (PI)-Lösung:</b>	50 µg PI/ml dH <sub>2</sub> O
<b>Ficoll-Lösung, 20%ig:</b>	20% (w/v) Ficoll in dH <sub>2</sub> O
<b>Ficoll-Lösung, 10%ig:</b>	20%iges Ficoll und DMEM im Verhältnis 1:1
<b>ELISA-Waschpuffer:</b>	0,05% (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan- monolaurat) in PBS
<b>Assay-Puffer für IL-17A ELISA:</b>	1% (w/v) BSA in sterilem PBS
<b>ELISA-Stopplösung:</b>	1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

---

<b>Adenin:</b>	10 mM Adenin 5% (v/v) 1 M HEPES in dH <sub>2</sub> O
<b>Hemin:</b>	50% (v/v) Triethanolamin (TEA) 0,25% (w/v) Hemin in dH <sub>2</sub> O
<b>HEPES:</b>	1 M HEPES, pH 7,4, in sterilem PBS
<b>PBS/Glukose/EDTA-Puffer:</b>	0,2% (w/v) Glukose 2 mM EDTA, pH 6,5, in sterilem PBS
<b>Kollagenase-Medium:</b>	100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,1% (w/v) Kollagenase A in DMEM
<b>Liberase-Medium:</b>	500 U/ml / 500 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,4 mg Liberase / ml in RPMI-1640
<b>Schneiders Medium:</b>	10% (v/v) FCS 2% (v/v) Urin (human) 2% (v/v) 200 mM L-Glutamin 100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 0,5% (v/v) 1 M HEPES in Schneiders <i>Drosophila</i> Medium
<b>Leishmania-Medium:</b>	70% (v/v) Medium-199 (1x) 20% (v/v) FCS 4% (v/v) 1 M HEPES 2,8% (v/v) Medium-199 (10x) 1% (v/v) 10 mM Adenin 100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin 0,2% (v/v) Hemin, 0,25%ig

<b>RPMI <i>complete</i>-Medium:</b>	5% (v/v) FCS
	100 U/ml / 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin
	1% (v/v) 200 mM L-Glutamin
	1% (v/v) 1 M HEPES
	1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
	0,1% (v/v) 50 mM β-Mercaptoethanol
	in RPMI-1640

## 5.6. Rekombinante *L. major*-spezifische Proteine

9His-TEV-Q4Q8Z6-LEIMA (Protein A)	Trenzyme, Konstanz
9His-TEV-Q4Q6L9-LEIMA (Protein C)	Trenzyme, Konstanz
Q4QHT2-LEIMA-6His (Protein D)	Freundliche Gabe der AG Schild, Institut für Immunologie, Mainz
9His-TEV-E9AE98-LEIMA (Protein E)	Trenzyme, Konstanz

## 5.7. Reagenzien und Chemikalien

Adenin	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, StarPure	Starlab International, Ahrensburg
Aqua dest. (dH <sub>2</sub> O), steril	B. Braun, Melsungen
BCA Reagent A + B	Pierce Thermo Scientific, Dreieich
Benzonase <sup>®</sup> Nuclease, > 90%	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
CFDA SE <i>Cell Tracer Kit</i> (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Collagenase</i> , Clostridiopeptidase A (Kollagenase A)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CpG, Oligodesoxynukleotide ODN1826	InvivoGen, San Diego, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Leiter, <i>Orange 50 bp DNA Ladder</i>	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

---

EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol 70%ig (v/v), vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Clean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Flow Sheath Fluid	BD Pharmingen, Heidelberg
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fixierungspuffer (für intrazelluläres FACS)	eBioscience, Frankfurt
FixPerm-Kit	eBioscience, Frankfurt
Flüssigstickstoff	
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Glukose (D-(+)-Glukose), p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Helipur H plus N	B. Braun, Melsungen
Hemin(chlorid), 98%	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES, Pufferan, ≥99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
Ionomycin, Kalzium-Salz	Life Technologies Corp., Grand Island, USA
Kompensationsbeads OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt
Ladepuffer Orange, 6x	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
LAL-Wasser, steril/aprogen	InvivoGen, San Diego, USA
Liberase TL	Roche Diagnostics, Mannheim
Live/Dead Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit	Life Technologies Corp., Grand Island, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )-Lösung, 50 mM	Invitrogen, Karlsruhe
M199 Medium (10x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M199 Medium (1x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol, 99% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ ),	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Ovalbumin, Reinheitsgrad V, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin, 10000 U/ml bzw. 10000 $\mu\text{g/ml}$	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Permeabilisierungspuffer	eBioscience, Frankfurt
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	LC Laboratories, Woburn, USA
Phosphorsäure, 85%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes Maus IL-17A	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes Maus IL-4	eBioscience, Frankfurt
Rekombinantes Maus IL-10	eBioscience, Frankfurt
Rekombinantes Maus IFN $\gamma$	eBioscience, Frankfurt
RPMI-1640, ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schneiders <i>Drosophila</i> Medium, modifiziert	BioWhittaker/Cambrex BioScience Verviers, Belgien
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	eBioscience, Frankfurt
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	R&D Systems, Wiesbaden
Substrat-Lösung A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), BD Opteia™	BD Biosciences, San Diego, USA
Substrat-Lösung B (Tetramethylbenzidin, TMB) BD Opteia™	BD Biosciences, San Diego, USA
Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat-Lösung	eBioscience, Frankfurt
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	AppliChem, Darmstadt

Trypanblau-Lösung

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tween-20

AppliChem, Darmstadt

## 5.8. Verbrauchsmaterialien

Bottle-Top Filter, 0,2 µm

Biochrom, Berlin

Deckgläschen

VWR, Darmstadt

Dialysierschlauch, regenerierte Zellulose,  
6-8,000 MWCO

ZelluTrans/Carl Roth, Karlsruhe

Dispenser Tips, 1,25 ml

Merck, Darmstadt

Dispenser Tips, 2,5 ml

Merck, Darmstadt

Dispenser Tips, 5 ml

Merck, Darmstadt

FACS-Röhrchen, Rundboden, 5ml, PS

BD Pharmingen, Heidelberg

Falkons, konischer Boden, PP, 15 ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Falkons, konischer Boden, PP, 50 ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Finntips 300, 5-300 µl

Thermo Lab, VWR, Darmstadt

GentleMACS™ C Tubes

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

GentleMACS™ M Tubes

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Handschuhe, Sempermed S

Apotheke, Universitätsmedizin

Kanüle, Microlance 3, 23G x 1¼, 0,6 x 30

B. Braun, Melsungen

Konzentratoren Vivaspin® 500, 5,000 MWCO PES

Sartorius Stedim Biotech,  
Göttingen

Kryoröhrchen, 1,8 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Leukosilk Gewebepflaster

Apotheke, Universitätsmedizin

MaxiSorp Nunc-Immuno Platten, 96 Well

Nunc, Brandt, Wertheim

Mikrotiterplatten, 96 Well, Rundboden

BD Pharmingen, Heidelberg

Mikrotiterplatten, 96 Well, Rundboden

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Parafilm M Laboratory Film

Pechiney Plastic, Chicago, USA

Petrischalen, PS

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Pipettenspitzen, 0,1-10 µl

Carl Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen, 10-200 µl

Greiner Bio-One, Frickenhausen

---

Pipettenspitzen, 200-1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Diamond®, D200, 2-200 µl	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Reagiergefäße, PP, 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße, PP, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße, PP, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße für Ultrazentrifugation, PP, 1,5 ml	Beckman Coulter, Krefeld
Reagiergefäße ( <i>Protein low binding tubes</i> ), PP, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenplatte, 96 Well, PS, unsteril	BD, Heidelberg
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritze BD Plastipak™ Luer-Lok™	BD, Heidelberg
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 Omnican F, 30G, 0,01-1 ml	B. Braun, Melsungen
Spritze Injekt-F Tuberkulin, 0,01-1 ml	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm Porengröße	Sartorius, Göttingen
Tiefwellplatte, 96 Well, Rundboden, PP	LabShark, Baar
Zellkulturflaschen ohne Filter, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 6 Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96 Well, Flachboden, PS, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb, 70 µm Porengröße	BD Pharmingen, Heidelberg

## 5.9. Geräte

Absorptionsmikroplattenleser ELx808™	BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall
ÄKTA™ Purifier 10	GE Healthcare, Freiburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell®	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
DEAE-650S Toyopearls selbstgepackt in HR 16/50	Tosoh Bioscience, Stuttgart GE Healthcare, Freiburg
Digitalkamera Camedia C5050	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer LSR II	BD Pharmingen, Heidelberg
Gelelektrophoresekammer, Model A1	Owl Separation Systems Inc., Portsmouth, USA
GentleMACS™ Octo Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Handdispenser Handy Step	VWR/Merck, Darmstadt
Kolbenhubpipetten	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Kühlbrutschrank	Memmert, Schwabach
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipette, Biohit, 5-100 µl	Sartorius, Göttingen
Mehrkanalpipette, Biohit, 30-300 µl	Sartorius, Göttingen
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Leica DM IL	Leitz, Wetzlar
Mikrowellengerät	Severin Elektrogeräte, Sundern
Milli-Q Wassersystem	Millipore, Schwalbach
MonoQ 5/50 GL-Säule	GE Healthcare Europe, Freiburg
Neubauer Zählkammer, 0,100 mm Tiefe	LO – Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Neubauer Zählkammer, 0,02 mm Tiefe (Petroff)	VWR, Darmstadt
Pellet-Pestelmotor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pellet-Pestelmotor-Spitzen, PP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pH211 Mikroprozessor-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten Pipetman	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich

---

Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schieblehre, digital, 150 mm	Rheinwerkzeuge, Mainz
Schlauchklemmen, Spectra/Por® closures	Spectrum® Laboratories Inc., Carl Roth, Karlsruhe
Splitterpinzette Uhrmacher	Burchardt & Zimmermann Medizin-Technik, Mainz
Ständer für Reagiergefäße	VWR/Merck, Darmstadt
Sterilbank Gelaire® BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim
Stromgeber Power PAC 1000	Bio-Rad Laboratories, München
Transilluminator	Stratagene, GE Healthcare
Ultrazentrifugenröhrchen, 27 ml	Beckman Coulter, Krefeld
Ultraschallstab Sonoplus HD 2070	Bandelin Electronic, Berlin
Ultrazentrifuge Optima™ L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge T-1065	Kontron Instruments, Thermo Fisher, Schwerte
Varioklav, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortex-Schüttler REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius, Göttingen
Waage MC1 LC2200P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ GFL-1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold

## 6. Experimentelle Methoden

### 6.1. Tierversuche und -haltung

Die verwendeten Mäuse wurden von Mitarbeitern des *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gepflegt. Die Durchführung aller Tierexperimente erfolgte in den Räumlichkeiten des TARC. Das Töten der Mäuse, das Infizieren, Immunisieren sowie die Organentnahme erfolgten gemäß dem geltenden Tierschutzgesetz.

### 6.2. Zellbiologische Methoden

#### 6.2.1. Kultivierung von *L. major* Promastigoten

Zur Nachahmung des im Vorderdarm der Sandmücke vorliegenden Milieus wurden die Promastigoten unter anaeroben Bedingungen bei 27°C in einem speziellen *Leishmania*-Medium kultiviert [34]. Für die Generation einer neuen Kultur wurden 5 ml des *Leishmania*-Mediums in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 10-20x10<sup>6</sup> Amastigoten beimpft, die zuvor frisch aus infizierten BALB/c Mäusen isoliert worden waren. Für die gängige Kultivierung erfolgte über 2-3 Passagen eine 1:3- oder 1:5-Verdünnung der neu angesetzten Kultur. Danach wurden die sich replizierenden Parasiten jeden zweiten Tag durch eine 1:10-Verdünnung in 10 ml Medium in der Log-Phase gehalten.

#### 6.2.2. Isolation von metazyklischen *L. major* Promastigoten

Für die Infektion von Mäusen wurden ausschließlich hochinfektiöse metazyklische Promastigoten verwendet. Die Isolation dieses *Leishmania* Stadiums aus der in Flüssigmedium vorliegenden Mischkultur erfolgte mit Hilfe eines zweiphasigen Ficoll-Dichtegradienten [235]. Dafür sollten diese Kulturen bereits 6-9 Tage alt sein („stationäre Phase“). Die Leishmanienkultur wurde im Verhältnis 1:1 mit sterilem DMEM gemischt und zweimal für 8 min bei 200 g gewaschen. Die Promastigoten befanden sich danach im Überstand. Um die Leishmanien in einem nächsten Schritt zu pelletieren, wurden diese für 8 min bei 3000 g zentrifugiert und das Pellet schließlich in 2 ml DMEM resuspendiert. Die Parasitensuspension wurde dann in einem 15 ml-Falkon auf bereits vorgelegte 2 ml 20%ige sowie 2 ml 10%ige Ficoll-Lösung geschichtet und der Ficoll-Gradient 15 min bei 2000 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die angereicherten metazyklischen Promastigoten konnten durch Abnahme der gesamten oberen, sowie 2/3 der zweiten Phase isoliert werden. Nach einem weiteren Waschschrift mit DMEM (3000 g für 8 min) wurden die

langen, schlanken Promastigoten 1:100-verdünnt in 4%igem PFA fixiert und anschließend gezählt.

### 6.2.3. Herstellung von löslichem Leishmanien Antigen (SLA)

Lösliches *Leishmania* Antigen (*soluble Leishmania antigen*, SLA) wurde in Antigen-spezifischen *in vitro*-Restimulationsassays mit dLK-Zellen aus *L. major* infizierten Mäusen als Positivkontrolle eingesetzt.

Hergestellt wurde das SLA aus 7 d alten Promastigotenkulturen. Dafür wurden die Leishmanien zunächst in zwei Waschschritten mit RPMI-*complete* für 8 min bei 200 g zentrifugiert und in einem nächsten Schritt bei 3000 g pelletiert. Die Zahl der Parasiten wurde auf  $300 \times 10^6/\text{ml}$  in RPMI-*complete* eingestellt und die Promastigoten mittels „freeze and thaw“-Prozedur in mindestens 10 Zyklen folgendermaßen lysiert:

- (1) Einfrieren der Leishmanien in Flüssigstickstoff
- (2) Auftauen der Leishmanien bei 56°C im Wasserbad
- (3) Resuspension durch Vortexen (1 min, maximale Leistung)

Für den Erhalt intakter, nicht degraderter Proteine aus SLA für die differentielle Zentrifugation (siehe 6.3.1.) und zur späteren näheren Charakterisierung einzelner Antigene wurde mit folgender Abweichung verfahren: Die metazyklischen *L. major* Promastigoten wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation aus der Flüssigkultur isoliert (siehe 6.2.3.). Im Anschluss daran folgten drei Waschschrritte mit sterilem Tris-Puffer durch Zentrifugation bei 3000 g für 8 min, um den Großteil von dem in Flüssigmedium vorliegenden fötalen Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) von der Parasitenoberfläche zu entfernen. Die Herstellung des Parasitenlysats aus dem Promastigotenpellet unterlag hierbei folgendem Verfahren:

- (1) Einfrieren der Leishmanien in Flüssigstickstoff
  - (2) Auftauen der Leishmanien bei 37°C im Wasserbad
  - (3) Resuspension durch Vortexen (1 min, maximale Leistung)
  - (4) Abschließende Behandlung mit Ultraschallstab unter gleichzeitiger Kühlung in fünf 30 s-Etappen bei 50% Intensität, 24x 0,5 Zyklen mit jeweils 1 min Pausenintervall
  - (5) Filtration durch einen 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter, Lagerung bei -80°C
- } ≥ 10 Zyklen

Die Immunogenität von SLA wurde im Rahmen von Restimulationsassays mit T-Zellen untersucht, welche *Leishmania*- Antigene erkennen [34]. Einerseits ließ sich auf diese Weise die Zytokinproduktion durch T-Zellen und andererseits die Zellproliferationsrate bestimmen. Die Proteinkonzentration des FCS-freien SLA wurde mittels BCA Protein Assay ermittelt (siehe 6.3.5.).

#### 6.2.4. Intradermale Infektion von Mäusen

Sowohl für die Immunisierungsexperimente, als auch für die *in vitro*-Versuche wurden die Mäuse intradermal (i.d.) mit metazyklischen Promastigoten infiziert. Dabei orientierte sich die Parasitenzahl entweder an der Zahl physiologisch durch die Sandmücke übertragener Leishmanien ( $10^3$ , Niedrigdosis) [34] oder erfolgte nach dem Hochdosis-Modell mit  $2 \times 10^5$  Leishmanien. Dafür wurden die exponierten Ohren anästhesierter Mäuse mit Leukosilk auf einem Zwangsröhrchen fixiert und die entsprechende Promastigotenzahl mit Hilfe einer Spritze in 10  $\mu$ l DMEM i.d. in die Ohren injiziert.

#### 6.2.5. Isolation von *L. major* Amastigoten aus BALB/c Mäusen

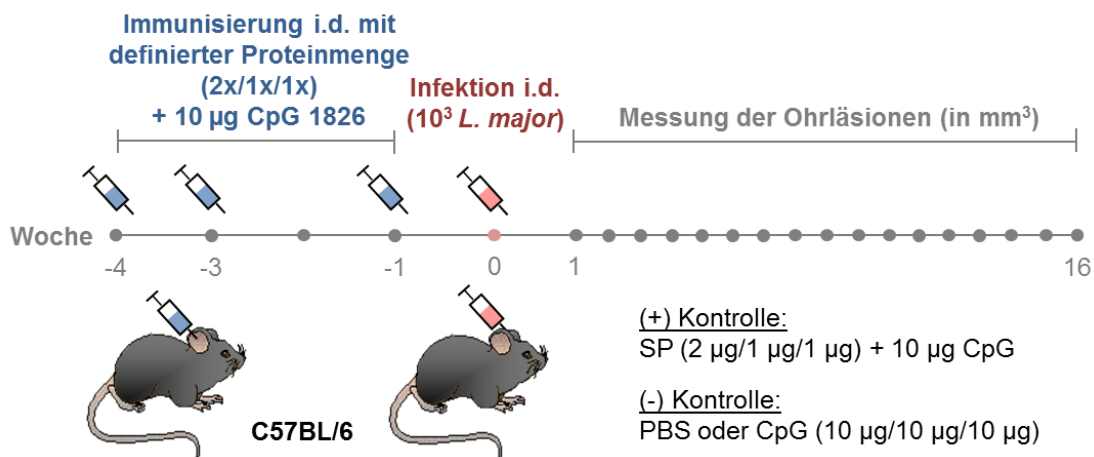
Für die *in vitro*-Kultivierung der *L. major* Promastigoten ist es wichtig, diese regelmäßig im Abstand von mehreren Wochen zu erneuern. Daher ist die „Passage“ durch die Maus, bei der sich die metazyklischen Promastigoten intrazellulär in ihre amastigote Lebensform umwandeln können, unerlässlich. Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse i.d. mit  $2 \times 10^5$  metazyklischen Promastigoten (siehe 6.2.2.) in die Ohren infiziert. Nach 4-6 Wochen wurden die Ohren der getöteten Mäuse mit Ethanol besprüht, die Läsionen mit Hilfe einer Schere ausgeschnitten und in PBS/Glukose/EDTA-Puffer überführt. Zur Isolation der intrazellulär vorliegenden Amastigoten wurde das Gewebe zunächst unter Zuhilfenahme zweier Pinzetten gesplittet. Beide Gewebehälften eines Tieres wurden dann zusammen mit 1 ml RPMI-*complete* in ein M-Tube überführt und mit Hilfe des GentleMACS<sup>®</sup> Dissociators für knapp 80 s zerstückelt („-“: Drehung gegen den Uhrzeigersinn):

- (1) Start: 700 rpm für 5 s, -200 rpm für 1 s
- (2) 3x Zyklus: 900 rpm für 5 s, -900 rpm für 1 s, 1200 rpm für 5 s, -600 rpm für 1 s
- (3) 2x Zyklus: 1800 rpm für 5 s, -600 rpm für 1 s, 2200 rpm für 5 s, -800 rpm für 1 s
- (4) Ende: 2400 rpm für 5 s, -1000 rpm für 1 s, 2000 rpm für 5 s

Pro Ohr wurde ein 50 ml-Falkon mit einem 70  $\mu$ m Zellsieb bestückt. Das mechanisch aufgeschlossene Gewebe und die daraus freigesetzten Leishmanien wurden über das Zellsieb in das Falcon überführt. Das M-Tube wurde mit 10 ml sterilen PBS gespült und diese ebenfalls gesiebt zu der Suspension pipettiert. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit DMEM (3000 g für 8 min) lagen die isolierten Amastigoten als Pellet vor. Dieses wurde in 1 ml DMEM resuspendiert und die Parasiten in einer 1:100-Verdünnung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,02 mm Tiefe, Kammerkonstante 0,05) gezählt.

### 6.2.6. Intradermale Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung der C57BL/6 bzw. BALB/c Mäuse wurde der *prime/boost/boost* (P/B/B)-Ansatz gewählt [185]. Dafür wurden die löslichen Proteine (*soluble proteins*, SP) aus Promastigotenlysat (SLA) bzw. Proteinlösungen jeweils direkt vor der Injektion in einem entsprechenden Volumen an sterilem PBS in Kombination mit je 10 µg CpG ODN 1826 als Adjuvanz verdünnt, so dass ein einheitliches Endvolumen von 40 µl pro Tier und Ohr intradermal gespritzt wurde. Die erste Immunisierung erfolgte mit der jeweils doppelten Proteinmenge (bspw. 2 µg) + CpG als Adjuvanz. Eine Woche später folgte die zweite Immunisierung mit der jeweils einfachen Proteinmenge (im Beispiel 1 µg) zusammen mit CpG. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Mäuse zum dritten Mal in dasselbe Ohr mit der entsprechenden einfachen Proteinmenge kombiniert mit CpG immunisiert. Zur Überprüfung der Schutzwirkung gegen die kutane Leishmaniasis wurden die Tiere eine Woche nach der letzten Injektion mit  $10^3$  metazyklischen *L. major* Promastigoten in das kontralaterale Ohr infiziert (siehe 6.2.4.). Als Negativkontrolle dienten Versuchstiergruppen, denen zuvor dreimal 10 µg/40 µl des Adjuvanz allein oder 40 µl steriles PBS injiziert worden war. Bei den nachfolgenden *in vivo*-Versuchen wurden mit SP (2 µg/1 µg/1 µg) + CpG behandelte Tiere als Positivkontrollgruppe mitgeführt.



**Abb. 26:** Schema der P/B/B-Immunisierung. Den Mäusen (hier exemplarisch C57BL/6) wurde intradermal (i.d.) in Woche -4 die zweifache Menge *L. major*-spezifischer Proteine in Kombination mit 10 µg CpG 1826 als Adjuvanz in ein Ohr injiziert. In Woche -3 und -1 erfolgte die Immunisierung mit jeweils der einfachen Proteinmenge + 10 µg CpG. Als Negativkontrolle (-) wurde den Tieren entweder nur das Adjuvanz oder PBS allein gespritzt, als Positivkontrolle (+) diente 1 µg SP + CpG. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte die Infektion i.d. mit  $10^3$  lebenden metazyklischen *L. major* Promastigoten in das andere Ohr. Die Ohrläsionen wurden wöchentlich in 3 Dimensionen gemessen.

### 6.2.7. Messung und Berechnung der Läsionsentwicklung

Die Schwere des Krankheitsverlaufs nach der *L. major* Infektion wurde unter anderem quantitativ über das Ausmaß der Läsionsentwicklung am Inokulationsort bestimmt. Dafür wurde das sich entwickelnde Granulom wöchentlich mit Hilfe einer Schieblehre in den drei Dimensionen Dicke (d), Breite (b) und Länge (l) gemessen [236]. Die Berechnung der Ellipsoide erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\text{Läsionsvolumen (in mm}^3\text{)} = d/2 * b/2 * l/2 * 3/4 * \pi$$

Graphisch dargestellt wurden die Volumina jeder Versuchstiergruppe als Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 6.2.8. Isolation von Lymphknotenzellen und Herstellung von Zellsuspensionen

Nach Infektion der Mäuse mit *L. major* metazyklischen Promastigoten wurden die Tiere zu entsprechenden Zeitpunkten mit Hilfe von CO<sub>2</sub> getötet. Für die Ernte der submandibulären drainierenden Lymphknoten (dLK) wurden Fell und Haut am Kiefer mit einer Schere aufgetrennt und das umliegende Gewebe mittels Uhrmacherpinzette wegpräpariert. Die freiliegenden dLK wurden mit Hilfe der Pinzette vorsichtig entfernt, mit Ethanol gewaschen und in steriles PBS überführt. In einer Petrischale wurde der Zellverband der dLK in PBS mit einem 5 ml-Spritzenstempel aufgebrochen und die entstandene Zellsuspension durch ein 70  $\mu$ m Sieb in ein 50 ml-Falkon pipettiert. Nach dem Spülen der Petrischale mit PBS und Überführen der restlichen Zellen über das Sieb zu der bereits vorliegenden Suspension erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 200 g und 4°C für 8 min. Das resultierende Pellet wurde mit 1-2 ml RPMI-*complete* resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### 6.2.9. Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Zahl lebender Zellen wurden Zellsuspensionen mit einem definierten Volumen des entsprechenden Mediums hergestellt. Vor dem Zählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (100  $\mu$ m Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup> Fläche pro Kleinstquadrat) wurde die Zellsuspension 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt. Der saure Farbstoff färbt abgestorbene Zellen und solche mit perforierter Zellmembran tiefblau. Unter dem Lichtmikroskop farblos erscheinende Zellen sind vital. Die Gesamtzahl lebender Zellen pro Volumeneinheit errechnet sich mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Lebendzellzahl pro Großquadrat} * V * 10^4$$

(V: Verdünnungsfaktor der Zellsuspension; 10<sup>4</sup>: Kammerkonstante)

### 6.2.10. Bestimmung von Parasitenlasten in Ohr und Milz

Um das Ausmaß der Infektion mit *L. major* Parasiten nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Mäuse vergleichen und bestimmen zu können, wurde zu ausgewählten Zeitpunkten die Parasitenzahl am Ort der Inokulation, dem Ohr, sowie der Milz ermittelt. Das infizierte Ohr und die Milz getöteter Mäuse wurden zu diesem Zweck jeweils zeitgleich geerntet.

Das Ohr wurde mit Ethanol besprüht und dicht am Kopf mit einer sterilen Schere abgetrennt. Es wurde im Bereich des Knorpels geteilt und jeweils beide Ohrhälften mit der Dermis nach unten in 1,5 ml Kollagenase-Medium in ein Well einer 6 Well-Platte enzymatisch angedaut. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden beide Ohrhälften eines Tieres zusammen mit 1 ml RPMI-*complete* in ein M-Tube überführt und mit Hilfe des GentleMACS® Dissociators zerstückelt (siehe 6.2.5).

Pro Ohr wurde ein 50 ml-Falkon mit einem 70 µm Zellsieb bestückt. Das mechanisch aufgeschlossene Gewebe und die daraus freigesetzten Leishmanien sowie das Kollagenase-Medium aus dem dazugehörigen Well des Vorverdauschrittes wurden über das Zellsieb in das Falkon überführt. Das M-Tube wurde mit 10 ml sterilen PBS gespült und diese ebenfalls gesiebt zu der Zellsuspension pipettiert. Nach 8 minütiger Zentrifugation bei 3000 g wurden die pelletierten Leishmanien in 1 ml Schneiders Medium resuspendiert. 100 µl der Parasitensuspension wurden dann mittels Verdünnungsreihe in Schneiders Medium austitriert [237].

Der Milzen wurden durch Zerdrücken mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels in PBS manuell aufgeschlossen. Die entstandene Suspension wurde über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml-Falkon überführt und dadurch von überschüssigen Gewebestandteilen separiert. Nach Zentrifugation bei 200 g für 8 min lagen die Milzzellen als Pellet vor und wurden in 2,5 ml PBS aufgenommen. 500 µl der Zellsuspension wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 1 min mit Hilfe eines Pellet-Pestlers aufgeschlossen. Die freigesetzten Parasiten wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 5600 U/min sedimentiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 100 µl Schneiders Medium.

Für die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Parasitenzahl wurden je 100 µl Schneiders Medium pro Well einer 96 Well-Flachbodenplatte vorgelegt. In das erste Well wurden 100 µl der Parasitensuspension, gewonnen aus Ohr- bzw. Milzzellen, pipettiert und diese in einer 1:2-Verdünnung in jedem nachfolgenden Well titriert. Die Leishmanien wurden schließlich unter anaeroben Bedingungen für 6-9 d bei 27°C inkubiert, wobei die Transformation der amastigoten in die promastigote Lebensform erfolgte. Unter Einberechnung der entsprechenden Verdünnungsfaktoren ließ sich die absolute Parasitenzahl dann anhand des am höchsten verdünnten Wells mit mindestens einer lebenden Promastigote ermitteln [34].

### 6.2.11. Zellgewinnung aus der Ohrdermis

Für die durchflusszytometrische Analyse intradermaler Leukozyten aus Ohren infizierter C57BL/6 Mäuse wurde die Haut enzymatisch verdaut und schließlich mechanisch aufgeschlossen [102]. Nach der Ernte infizierter Ohren wurde je ein Ohr in zwei Hälften gesplittet und diese mit der Dermis nach unten in Liberase-Medium in eine 6 Well-Platte überführt. Der Verdau erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> und wurde nach 1 h Inkubation durch Zugabe von RPMI-*complete*-Medium (5% (v/v) FCS-haltig) im Verhältnis 1:1 gestoppt. Für den mechanischen Gewebeaufschluss wurde jeweils ein C-Tube mit beiden Hälften eines Ohres bestückt und in 1 ml RPMI-*complete* mittels GentleMACS® Dissociator (siehe 6.2.5.) zerkleinert. Die Zellsuspension wurde dann über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml-Falkon pipettiert und das C-Tube zur Vermeidung von Zellverlust mit 10 ml RPMI-*complete*-Medium gespült. Dieses Medium wurde zusammen mit dem Medium aus dem Verdauschritt ebenfalls über das Sieb zu der bereits vorliegenden Zellsuspension pipettiert. Durch Zentrifugation bei 200 g für 8 min wurden die Zellen pelletiert, in einem adäquaten Volumen FACS-Puffer resuspendiert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt.

### 6.2.12. Restimulation von drainierenden Lymphknotenzellen

Die aus vorbehandelten C57BL/6 Mäusen isolierten dLK-Zellen (siehe 6.2.8.) wurden zum Erhalt verschiedener Zytokinprofile Antigen-spezifisch restimuliert. Jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden dafür in 100 µl RPMI-*complete* pro Well einer 96 Well-Zellkulturplatte mit Flachboden überführt. Als Stimulans kamen jeweils 10 µl verschiedener SLA-Proben ohne FCS oder 10-20 µl der Proteinlösungen zum Einsatz. Als Positivkontrollen wurden 20 µl des Superantigens *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB; 1 mg/ml Stocklösung) bzw. 10 µl FCS-haltiges SLA aus metazyklischen Promastigoten (25 µg/ml) eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte dLK-Zellen sowie unspezifisch mit Ovalbumin (OVA; 50 bzw. 100 µg/ml) stimulierte Zellen. Dabei wurden alle Ansätze auf ein Endvolumen von 200 µl pro Well mit RPMI-*complete* aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Pelletiert wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 200 g und 4°C. 180 µl der Medienüberstände ließen sich pro Well abnehmen und bis zur Untersuchung der Zytokinproduktion mittels spezifischer ELISA (siehe 6.4.1.) bei -20°C lagern. Entsprechend der jeweiligen Fragestellung wurde zusätzlich die prozentuale Rate toter T-Zellen mittels PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt (siehe 6.4.2.1.).

### 6.2.13. Proliferationsnachweis von T-Zellen mittels CFSE

Der Farbstoff Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester (CFSE) bindet, nachdem er in eine Zelle diffundiert ist, kovalent an intrazelluläre Amine, wodurch er in seine fluoreszente Form überführt wird. Die Aktivierung der gefärbten Zellen geht mit deren Proliferation einher, sodass sich die intrazellulären CFSE-Konjugate auf die jeweiligen Tochterzellen aufsplitten. Dadurch wird die durchflusszytometrische Darstellung der Proliferation von markierten T-Zellen aufgrund der abnehmenden Fluoreszenzintensität ermöglicht.

Es wurden  $10 \times 10^6$  dLK-Zellen/ml sterilem PBS mit  $1 \mu\text{M}$  CFSE für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Wasserbad inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift der Zellen mit RPMI-*complete* mittels Zentrifugation bei 200 g für 8 min. Die pelletierten Zellen wurden in einem adäquaten Volumen an RPMI-*complete* aufgenommen und verdünnt in Trypanblau-Lösung gezählt. Die Lebendzellzahl wurde erneut auf  $10 \times 10^6$  pro ml RPMI-*complete* eingestellt und die Suspension in Dunkelheit für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die auf diese Weise markierten Zellen waren dann für Antigen-spezifische Restimulationsassays *in vitro* einsetzbar. Pro Well einer 96 Well-Flachbodenplatte wurden jeweils  $1 \times 10^6$  dLK-Zellen eingesetzt. Die Inkubation in An- oder Abwesenheit eines Stimulans und RPMI-*complete* erfolgte in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  pro Well über 4-5 d bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  (siehe 6.2.12.). Im Anschluss daran ließ sich die prozentuale Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie messen (siehe 6.4.2.).

### 6.2.14. Herstellung rekombinanter *L. major*-spezifischer Proteine

Ausgewählte massenspektrometrisch identifizierte Proteine (siehe 6.3.4.) wurden für weitere Analysen - sowohl *in vitro* als auch *in vivo* - hergestellt. Die rekombinante Expression erfolgte in *E. coli* Bakterien.

Die Proteinkandidaten A, B, C und E wurden von der Firma *Trenzyme* (Konstanz) hergestellt. Diese Proteine wurden N-terminal mit einem 9xHis-*tag* sowie einer Schnittstelle für die *Tobacco etch virus* (TEV) N1a Proteinase (TEV Protease) fusioniert. Rekombinant exprimiertes Protein D wurde freundlicherweise von Frau Dr. Danielle Arnold-Schild (AG Schild, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Dieses Protein wurde C-terminal mit einem 6xHis-*tag* fusioniert.

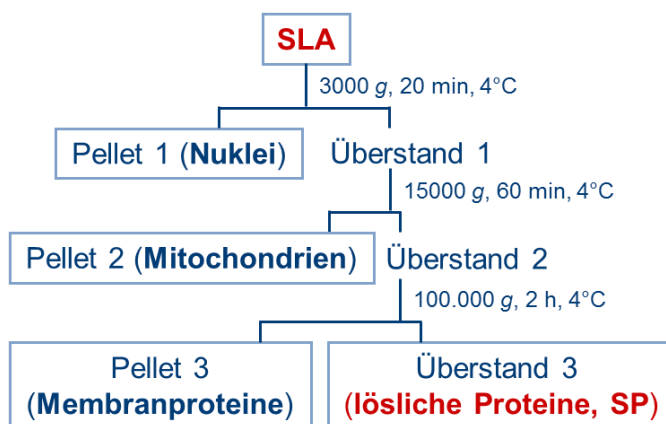
Die Reinigung der rekombinanten Proteintargets wurde dabei jeweils mit Hilfe von Affinitätschromatographie-Säulen und Verdrängung bindender Histidin-Reste aus der Trägermatrix durch steigende Konzentrationen des Strukturanalogons Imidazol durchgeführt.

## 6.3. Biochemische Methoden

### 6.3.1. Differentielle Zentrifugation von löslichem *Leishmania* Antigen (SLA)

Eine effektive Methode zur analytischen und präparativen Separation und Gewinnung einzelner Zellbestandteile ist die differentielle Zentrifugation. Sie beruht auf der Anwendung stufenweise ansteigender Zentrifugationskräfte und wurde zur Isolation der löslichen Proteine (SP) aus SLA metazyklischer *L. major* Promastigoten (siehe 6.2.3.) angewandt.

Nach der Ultraschallbehandlung wurde das SLA zunächst mit Tris-Puffer auf ein Endvolumen von 25-30 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation bei 3000 g für 20 min wurden zuerst die Nuklei und Parasitentrümmer aus dem Lysat isoliert. Der Überstand wurde zur Separation der Mitochondrien in einem zweiten Schritt bei 15.000 g für 60 min zentrifugiert. Der finale Zentrifugationsschritt des erhaltenen Überstandes erfolgte für 2 h in einer Ultrazentrifuge (Rotor 70Ti) bei 100.000 g. Im Pellet lagen Membranbestandteile vor. Der Überstand enthielt lediglich die löslichen Bestandteile des SLA, welche hier als SP deklariert werden. Diese wurden auf ihre Reaktivität hin sowohl *in vitro* (siehe 6.2.12.) als auch *in vivo* (siehe 6.2.6.) untersucht und zur Identifikation einzelner immunogener Antigene durch einen 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter filtriert und dann chromatographisch fraktioniert (siehe 6.3.2.).



**Abb. 27: Schema der differentiellen Zentrifugation von SLA.**

*L. major* Lysat metazyklischer Promastigoten wurde mittels dreier Zentrifugationsschritte in seine unterschiedlichen Komponenten aufgesplittet. Neben verschiedenen Organellen (Nuklei, Mitochondrien und Membranproteinen) wurden die löslichen Proteine (SP) der Parasiten zur weiteren Analyse gewonnen.

Die pelletierten separierten Zellorganellen aus SLA wurden jeweils in einem adäquaten Volumen Tris-Puffer (0,1-5 ml) resuspendiert. Die verschiedenen Suspensionen wurden dann in einer logarithmischen Verdünnungsreihe in Tris-Puffer neben den gleichermaßen verdünnten SP auf ihre T-Zellreaktivität-induzierenden Eigenschaften hin mittels dLK-Restimulationsassay *in vitro* (siehe 6.2.12.) getestet.

Die Durchführung der differentiellen Zentrifugation erfolgte in den Räumlichkeiten des Instituts für Immunologie (Universitätsmedizin Mainz).

### 6.3.2. Chromatographische Fraktionierung von SP

Die Chromatographie ermöglicht die Auftrennung von Stoffgemischen bedingt durch unterschiedliche Wechselwirkungen und Verteilung in zwei miteinander nicht mischbaren Phasen. Es gibt dabei eine stationäre Phase (unlösliche polymere Matrix mit kovalent gebundenen Gruppen entsprechender Ladung; Trägermaterial) und eine mobile Phase (gelöste Substanzen). Im Rahmen dieser Arbeit kam die Probenauftrennung über Anionenaustauscher zum Einsatz. Diese analytische Methode macht sich zunutze, dass Proteine aufgrund ihrer Nettoladung unterschiedlich stark an die positiv geladenen Gruppen der Säulenmatrix binden. Dabei lassen sich die Proteine in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Elutionspuffers sowie ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt mit ansteigendem Salzgradienten aus dem Säulenmaterial verdrängen.

In der initialen Äquilibrierungsphase wird der Anionenaustauscher mittels Einstellung des pH-Werts und der Ionenkonzentration, in einen Ausgangszustand gebracht, der die Bindung der gewünschten löslichen Moleküle an die Trägermatrix erlaubt. Zu diesem Zeitpunkt sind die positiv geladenen Gruppen der Matrix mit austauschbaren Gegenionen (z.B. Cl<sup>-</sup>) assoziiert. In der zweiten Phase folgt die Probenauftragung und Adsorption der Proteine. Dabei ersetzen die gelösten, entsprechend geladenen Probenmoleküle die mit der Säule assoziierten Gegenionen und binden reversibel an die Trägermatrix. Nicht-bindende Moleküle befinden sich im Durchfluss.

Die gewünschten Moleküle werden in der dritten Phase, der Elution, wieder aus der Säule entfernt. Dieser Schritt erfolgt durch Änderung des Milieus hin zu Elutionsbedingungen, welche für die Ionenbindung der löslichen Moleküle ungünstig sind. Dabei wird sich die Erhöhung der Chloridionenkonzentration mittels Elutionspuffer (hier: Puffer B) oder eine Änderung des pH-Wertes zunutze gemacht. Mit Hilfe eines ansteigenden Salzgradienten werden die löslichen Probenmoleküle in der Reihenfolge ihrer Nettoladung und Bindungsstärke eluiert. Die am schwächsten gebundenen Proteine mit wenigen negativen Ladungen werden bereits durch eine niedrige Chloridionenkonzentration verdrängt und lösen sich frühzeitig aus dem positiv geladenen Säulenmaterial. Das heißt, Proteine mit überwiegend negativen Ladungen werden spät und erst durch eine hohe Konzentration um Bindungsstellen konkurrierender Chloridionen eluiert.

Nach der Entfernung unter den vorherigen Bedingungen nicht-eluierter Moleküle erfolgt in einer letzten Phase die Re-Äquilibrierung der Trägermatrix analog zu den Ausgangsbedingungen, um diese für eine nachfolgende Probenreinigung vorzubereiten.

Die Fraktionierung der aus Parasitenlysat isolierten SP (siehe 6.3.1.) erfolgte zunächst über eine selbstgepackte DEAE HR-16/50-Säule (100 ml Säulenvolumen; von Herrn Dr. Stefan Tenzer, Institut für Immunologie, Mainz) mit positiv geladenen Diethylammoniummethyl-Gruppen. Dafür wurde die Säule zunächst mit 35 ml Puffer A und einer Flussrate von 3 ml/min äquilibriert. Etwa 22 ml der sterilfiltrierten SP wurden unter denselben Bedingungen mit Hilfe einer ÄKTA-Chromatographieanlage (ÄKTA *Purifier*) auf die Säule aufgebracht. Die nicht-bindenden Proteine wurden als Durchlauf fraktioniert. Die Elution der Proteine wurde durch Anlegen eines linearen Salzgradienten (Puffer A gegen Puffer B) und einer Flussrate von 3 ml/min gestartet. Dabei wurde innerhalb von 150 ml ein Salzgehalt von 25% (Puffer B) erreicht, der mit weiteren 50 ml auf 50% erhöht und für weitere 100 ml auf diesem Level gehalten wurde. Die Absorption der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm, die Eluate wurden in 2 ml-Fractionen (DEAE-Fractionen) gesammelt und diese in dLK-Restimulationsassays *in vitro* auf ihre Reaktivität hin getestet (siehe 6.2.12.). Die Re-Äquilibrierung des Säulenmaterials fand mit 100 ml Puffer A statt.

Ausgewählte DEAE-Fraktionspools (je etwa 4 ml Probe) wurden nach der Dialyse (siehe 6.3.3.) mittels MonoQ 5/50 GL-Säule (1 ml Säulenvolumen) und ÄKTA *Purifier* weiter in ihre Bestandteile aufgetrennt. Diese Säule besteht aus einer hydrophilen Polyetherharz-Matrix mit quartären Ammoniumliganden ( $-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), an welche negativ geladene Ionen und Protein-Seitengruppen binden können. Es wurde folgenderweise vorgegangen:

- (1) Äquilibrierung: Puffer A (0% Puffer B), 100 ml, 0,02 ml/min (über Nacht);  
Puffer A (0% Puffer B), 1 ml, 0,5 ml/min;
- (2) Beladen: Flussrate 0,5 ml/min; Sammeln von 1 ml-Durchflussfraktionen;
- (3) Elution: Puffer A gegen Puffer B, 0-75% innerhalb von 75 ml,  
0,5 ml/min;  
dann direkt auf 100% Puffer B, halten für 5 ml, 0,5 ml/min;  
Sammeln von 0,8 ml-Fractionen des Eluats;
- (4) Re-Äquilibrierung: Puffer A (0% Puffer B), 5 ml, 0,5 ml/min;

Die eluierten Proteinfractionen (MonoQ-Fractionen) wurden mittels *in vitro*-Restimulationsassay mit dLK *L. major*-infizierter C57BL/6 Mäuse untersucht (siehe 6.2.12.) und entsprechend ihrer reaktiven Eigenschaften massenspektrometrisch auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert (siehe 6.3.4.).

Die Durchführung der chromatographischen Fraktionierungen erfolgte im Institut für Immunologie (Universitätsmedizin Mainz).

### 6.3.3. Dialyse der Proteinfractions-pools

Dem Dialysevorgang liegt das Prinzip der Osmose zugrunde.

Für die weitere Fraktionierung ausgewählter DEAE-Fractions-pools mittels Anionenaustauscherchromatographie mussten zunächst vorliegende, mit eluierte Salzionen (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) entfernt werden. Als semipermeable Membran fungierte hierbei ein Dialysierschlauch aus regenerierter Zellulose mit einer Porengröße von 6-8 kDa.

Die Schlauchmembran wurde nach Angaben des Herstellers zunächst für 30 min in Tris-Puffer eingelegt. Knapp 4 ml der jeweiligen Fraktions-pools wurden in dem beidseitig mit einer Schlauchklemme verschlossenem Schlauch dialysiert. Die Dialyse erfolgte unter ständigem Rühren bei 4°C für 3-4 h in 1,5 L Tris-Puffer und nach einem Pufferwechsel unter denselben Bedingungen über Nacht.

### 6.3.4. Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Proteinfractions

Die Massenspektrometrie (MS) ermöglicht die sensitive Analyse und Identifikation von Proteinen anhand ihres Ionenmasse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ), wobei die Einzelkomponenten in Form eines Massenspektrums detektiert werden.

Ausgewählte MonoQ-Fractions des SLA (siehe 6.3.2.) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Stefan Tenzer (Core Facility für Massenspektrometrie, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) massenspektrometrisch analysiert. Zum Einsatz kam dabei das an ein Synapt G2-S HDMS Massenspektrometer (Waters) gekoppelte *Nanoscale reversed-phase Ultra-Performance Liquid Chromatography* (UPLC)-System (nanoAcquityUPLC, Waters).

Fractions (je 20 µg Protein), die ursprünglich aus dem DEAE-Pool II bzw. III stammten, wurden jeweils in sechs bzw. drei Wiederholungen gemessen. Die Datenverarbeitung zur Identifikation der Proteine erfolgte mit Hilfe des ProteinLynxGlobalSERVER, Version 3.0.2. (PLGS, Waters Corporation) und der „RefSeq *Leishmania*“-Datenbank.

Die erhaltenen absoluten Werte für die Quantifizierung der Proteine (TOP3 Quantifizierung) [238] und einem Referenzprotein (*Saccharomyces cerevisiae* Enolase 1) definierter Stoffmenge (hier: 5 fmol) ließen einen Rückschluss auf die Stoffmenge der jeweiligen detektierten *L. major*-spezifischen Proteine zu. Diese errechnete sich folgendermaßen:

$$n(L. major \text{ Protein}) = \frac{MW \text{ der TOP3 Quantifizierung (Hefe Enolase 1)}}{MW \text{ der TOP3 Quantifizierung (L. major Protein)}} * 5 \text{ fmol}$$

(n: Stoffmenge (in fmol); MW: Mittelwert)

### 6.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Zur Bestimmung der Konzentration von Einzelproteinen oder Proteingemischen kam der Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, *BCA*)-Assay zum Einsatz.

Dieser Nachweis basiert auf der Biuret-Methode in Kombination mit der selektiven Bildung eines Komplexes aus BCA und Kupferionen. Positiv divalente Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) werden in alkalischer Lösung durch die Peptidbindung der Proteine sowie deren Cystein-, Tyrosin- und Tryptophan-haltigen Seitenketten zu monovalenten Ionen ( $\text{Cu}^+$ ) reduziert [239].  $\text{Cu}^+$  bildet daraufhin zusammen mit je zwei BCA-Molekülen einen lilafarbenen Chelatkomplex, wodurch die Intensität des Farbumschlags photometrisch messbar ist. Die Detektion erfolgt durch Absorptionsmessung bei 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes, gegen einen Kalibrationsstandard mit BSA (*bovine serum albumine*, Rinderserumalbumin). Es wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

### 6.3.6. DNA/RNA-Verdau durch Benzonase Nuklease

Benzonase Nuklease ist eine Endonuklease, die in der Lage ist, alle Formen von DNA und RNA zu degradieren. Die Nukleinsäuren werden dabei zu 5'-Monophosphat-terminalen, 2-5 Basen langen Oligonukleotiden abgebaut. Ihre enzymatische Aktivität entfaltet die Benzonase in Anwesenheit von positiv divalenten Magnesiumionen ( $\text{Mg}^{2+}$ ) [240], welche daher der Arbeitslösung für die Vorverdünnung des Enzyms zugesetzt werden.

Um die An- bzw. Abwesenheit von Nukleinsäuren in SLA und dessen Subfraktionen zu überprüfen sowie deren möglichen Einfluss auf die Probenreaktivität *in vitro* zu untersuchen, wurden die Proben zusammen mit der Benzonase (90 U/ml) für 6 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Proben für den dLK-Restimulationsassay (siehe 6.2.12.) und je 20  $\mu\text{l}$  für die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 6.3.7.) verwendet. Als Kontrollen dienten Proben, die unter den gleichen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit des Enzyms, inkubiert worden waren.

### 6.3.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgt mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld, wobei das Agarose-Gel als Trennmatrix dient, an welche eine Spannung angelegt wird [241]. In diesem Feld wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat Rückgrat in Abhängigkeit ihrer Größe in Richtung der Anode. Detektierbar sind die DNA-Banden nach Behandlung mit dem Phenantridin-Farbstoff und DNA-Interkalator Ethidiumbromid [242]. Nach Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge 300 nm) erscheint der Ethidiumbromid/Nukleinsäurekomplex im sichtbaren Bereich (500-590 nm) als rot-orangefarben leuchtende Bande.

Zur Herstellung eines 2% Agarose-Gels für sehr kleine zu erwartende, aufzutrennende DNA-Moleküle wurde die Agarose durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät vollständig gelöst (600 W, ~3 min). Die Lösung wurde dann luftblasenfrei in eine abgedichtete horizontale Gelkammer gegossen und ein Probenkamm hinzugefügt. Nach vollständiger Polymerisation des Gels bei Raumtemperatur wurde es in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte, horizontale Elektrophoresekammer überführt und der Probenkamm entfernt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer (*Loading Buffer Orange*) versetzt und in die gespülten Geltaschen pipettiert. Als Referenz für die Größe der detektieren Basenpaarfragmente wurde eine Tasche mit einem adäquaten Volumen einer DNA-Leiter (Marker) versetzt. Die Elektroden der Elektrophoresekammer wurden entsprechend ihrer Polarität mit einem Stromgeber verbunden. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 1,5-2 h bei 120 V. Anschließend wurde das Agarose-Gel für 20 min in ein Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) überführt und dann mittels Fotografie-Software (Argus X1) dokumentiert.

## 6.4. Immunologische Methoden

### 6.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit Hilfe des sensitiven, enzymgekoppelten Immunadsorptionstests, kurz ELISA, lassen sich Antigene spezifisch in einer Probe nachweisen. Dem angewandten Prinzip des Sandwich-ELISA liegt die Erkennung von Antigenen durch zwei spezifische Antikörper zugrunde, welche an unterschiedliche Bereiche des Antigens binden. Dies ermöglicht einerseits die Immobilisierung des Zielantigens an die Trägersubstanz, andererseits seine Detektion durch Bindung an einen Enzym (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten zweiten Antikörper. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats erfolgt eine Enzym-katalysierte Reaktion, die in einem Farbumschlag resultiert. Die Antigenkonzentration entspricht dabei der optischen Dichte der Färbung und ist mittels *Microplate Reader* photometrisch bei 450 nm messbar.

Der spezifische Zytokin-Nachweis erfolgte mit Hilfe des entsprechenden ELISA Kits in Medienüberstände von Antigen-spezifisch restimulierten dLK-Zellen infizierter C57BL/6 Mäuse nach 48 h Inkubation. Dabei wurden die Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-17A nach Herstellerangaben quantifiziert.

### 6.4.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Durchflusszytometrie stellt eine Technik zur Charakterisierung und Analyse einzelner Zellen dar. Sie gibt Aufschluss über die physikalischen Eigenschaften von Zellen wie Granularität und Größe. Das Prinzip der Messung beruht auf der Emission optischer Signale von Seiten der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Durch die Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern lassen sich die Zellen mittels Durchflusszytometer charakterisieren.

Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare in das Messgerät gesaugt. Dort passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl im Sensor modul. Das schwächere Signal des dabei seitwärts abgelenkten Streulichts wird mit Hilfe von Photomultipliern verstärkt und das stärkere Signal des Vorwärtsstreulichts mittels Photodiode detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) ist ein Maß für die Lichtbrechung im flachen Winkel in Abhängigkeit von der relativen Zellgröße. Das im rechten Winkel abgelenkte Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ist hingegen ein Maß für die Zellgranularität, welche von der Zellstruktur, -kerngröße und der Anzahl intrazellulärer Vesikel beeinflusst wird. Die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe, die über spezifische Antikörper an die Zellen gebunden sind, lassen sich jeweils bei einer bestimmten Wellenlänge anregen. Ein Teil der Lichtenergie wird von den Fluorochromen absorbiert und ihrem Emissionsmaximum entsprechend Fluoreszenzlicht höherer Wellenlängen emittiert. Mit Hilfe eines Systems aus

verschiedenen optischen Spiegeln und Filtern wird das emittierte Licht zu entsprechenden Photodetektoren geleitet und in elektronische Signale umgewandelt.

Für die FACS-Färbung wurden die Zellen auf mindestens  $10^5$  pro Ansatz eingestellt. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 200  $\mu$ l FACS-Puffer durch Zentrifugation bei 200 g und 5 min. Danach wurden jeweils 10  $\mu$ l Fc $\gamma$ R-Blockierungsantikörper (Fc Block; 10  $\mu$ g/ml FACS-Puffer) auf die Zellen pipettiert und diese für 5 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Gefärbt wurde mit jeweils 10  $\mu$ l eines Mixes spezifischer, Fluorochrom-gekoppelter Antikörper in FACS-Puffer für 20-30 min unter denselben Bedingungen. Nach einem Waschschritt mit FACS-Puffer wurden die Zellen, sofern sie aus *L. major*-infizierten Tieren stammten, für 10-20 min mit 2%iger PFA-Lösung bei 4°C unter Lichtausschluss fixiert. Nach zwei Waschschriffen mit je 200  $\mu$ l FACS-Puffer wurden die Zellen schließlich in 100-200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

#### **6.4.2.1. Durchflusszytometrischer Zytotoxizitätsnachweis**

Der prozentuale Anteil toter Zellen einer Zellpopulation lässt sich mit Hilfe des Farbstoffs Propidiumiodid (PI) ermitteln, der die perforierte Membran nekrotischer Zellen durchdringt und in die DNA interkaliert.

Nach der regulären FACS-Färbung der Zellen wurden diese unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung mit PI (1  $\mu$ g/ml) versetzt.

#### **6.4.2.2. Intrazelluläre FACS-Färbung**

Diese Färbemethode dient dem intrazellulären Nachweis von Transkriptionsfaktoren und spezifischen Zytokinen nach der Stimulation von Zellen. Durch den Einsatz eines lebend/tot-Farbstoffes (LIVE/DEAD Fixable Yellow) lassen sich lebende von nekrotischen Zellen unterscheiden. Letztere weisen ein deutlich stärkeres Signal bei der durchflusszytometrischen Analyse auf, da der Farbstoff sowohl an freie Amine im Zellinneren als auch an die Zelloberfläche selbst bindet.

Für die Stimulation der Zellen, welche als Positivkontrolle für die Färbung diente, wurden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin verwendet. PMA ist ein Phorbolster, der als starker Aktivator der Proteinkinase C agiert [243]. Das Ionophor Ionomycin führt zusätzlich zu einem erhöhten Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Spiegel im Zellinneren, wodurch die Effizienz der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinase C gesteigert wird [244]. Um die Freisetzung daraufhin produzierter Zytokine zu verhindern und diese durchflusszytometrisch detektierbar zu machen, wurde allen Ansätzen Brefeldin A (BFA) zugesetzt. Dieses induziert den

retrograden Transport der Proteine vom Golgi-Apparat zurück zum endoplasmatischen Retikulum (ER), wo es zu einer Akkumulation der Proteine kommt [245;246].

Eingesetzt für den intrazellulären Zytokin-Nachweis wurden Zellsuspensionen, hergestellt aus dLK- bzw. Ohr-Zellen immunisierter und *L. major* infizierter Mäuse (siehe 6.2.8., 6.2.11.), oder bereits über 4 d Antigen-spezifisch restimulierte, CFSE-gelabelte dLK-Zellen aus infizierten Mäusen (siehe 6.2.13.). Die Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^6$ /ml RPMI-*complete* eingestellt und je 1 ml der Zellsuspension pro Well in eine 24 Well-Platte überführt und mit BFA (1  $\mu$ g/ml) versetzt. Zu Zellen, die als Positivkontrolle dienten, wurde additiv PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) zugesetzt und alle Ansätze für 4-6 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Stimulation folgten die Zellernte und jeweils zwei Waschschriffe mit PBS (bei 200 g, 4°C für 8 min). In einem 15 ml-Falkon wurde die Zahl vereinter Zellen gleicher Ansätze auf  $10 \times 10^6$ /ml PBS eingestellt und zusammen mit 1  $\mu$ l/ml des lebend/tot-Farbstoffes für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit FACS-Puffer. Die Färbung von mindestens  $10^6$  pelletierten Zellen pro Well erfolgte dunkel bei 4°C in einer 96 Well-Rundbodenplatte. Dafür wurden die Zellen für 5 min mit 10  $\mu$ l Fc-Block behandelt und dann für 20 min mit 10  $\mu$ l eines Pools der spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Oberflächen-Antikörper (in FACS-Puffer) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit FACS-Puffer (bei 450 g, 4°C für 5 min), gefolgt von 20 min Zellfixierung in 50  $\mu$ l Fixierungspuffer. Um den Zytokin-spezifischen Antikörpern das Eindringen in die Zellen zu ermöglichen folgten zwei Waschschriffe mit je 100  $\mu$ l eines speziellen Membran-Permeabilisierungspuffers. Die Inkubation mit 10  $\mu$ l der intrazellulär spezifisch-bindenden Antikörper in Permeabilisierungspuffer pro Well erfolgte bei 4°C im Dunkeln über Nacht. Am Folgetag wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen (bei 450 g, 4°C für 5 min), in 100  $\mu$ l desselben Puffers resuspendiert und mittels BD LSR II durchflusszytometrisch gemessen.

Für den gleichzeitigen intranukleären Nachweis von Transkriptionsfaktoren kamen die Reagenzien des FoxP3 *Staining Buffer* Sets nach Angaben des Herstellers zum Einsatz.

## 6.5. Auswertung - Statistische Analyse und Software

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software StatView® 5.0 (SAS Institute Inc., USA) für Windows oder GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., USA). Zur Anwendung kamen dabei der ungepaarte studentische t-Test bzw. für die Auswertung der Läsionskurven der One-way ANOVA Test in Kombination mit dem Bonferroni Test. Die statistischen Unterschiede sind folgendermaßen markiert: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$  und \*\*\*  $p \leq 0,002$ .

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der an das Messgerät gekoppelten BD FACSDiva™ Software (BD Biosciences, USA) aufgenommen und mit Hilfe des Programms FlowJo 7.2.2 oder 7.6.3 (FlowJo, LLC, USA) ausgewertet. Für die Auswertung der photometrisch ermittelten *Microplate Reader*-Daten kam die Software KC Junior™ (BIO-TEK) zum Einsatz. Gelfotographien wurden mittels Programm Argus X1® (biostep) erfasst.

Für die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen ausgewählter *L. major* Proteine mit den Aminosäuresequenzen anderer *Leishmania*-Subspezies kam der BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Algorithmus [247] zum Einsatz. Der angegebene *Score*-Wert berechnet sich dabei aus dem Verhältnis der identischen zu den nicht identischen Bausteinen, d.h. je höher dieser Wert ist, desto besser die Alignierung. Der E-Wert gibt Auskunft darüber, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, einen solchen Treffer per Zufall in der Datenbank zu landen. Je niedriger der E-Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist ein Zufall (Null stellt den bestmöglichen Wert dar).

## 7. Anhang

### 7.1. Aminosäuresequenzen aller detektierten Proteine in reaktiven MonoQ-Fractionen aus SLA

#### Q4Q8Z6

MSEISFSEMSLHEVPLASEATPSSAVVLGGRTDLRVGDFVGFQRI SPSKEWKLSLGKVIA  
 LPTALTVKVAHFDAVNETTQDPI SEQMVRQKAAETQKMDIWHNREALRENLAQESAKE  
 KAATQRLLAARDQTVTRQMATGDKVTASLENLDNARRRLREVVPKKEWALRSSYLP SAEI  
 LGVMRSVMLILYEDSVTKWEHIQEV MHRQDFMERILGWDC TATPMSLSRRKRIVALCAGK  
 DVEGAPSKKHLPSGTRSRSPSRPLVVA AKSTNPSNVVILDKNVRTWINAQLSCSEAAREQ  
 EMMINSCFAEQEQQRALLREINDMRVGI STIEVQMLEMKNAILGIDDAPRPIMPLDAYPT  
 DTTFYKRTPDADGRFVQEIILREAVILNFGPIAEEDAEGYVRLNSAQVERLRDAVVSTN  
 VRHDAEEMEELLARKEREEEEIAELKSRI SELRNKVS LTAEEEEELAQLEKLLADAERRH  
 HATLSRIADLYACGRGAREITLAIKRPEFRYTRLHCKMSGDWETILSDAERYSEMIAAFC  
 DDVSTLLNIPASYVLDIDTCCGSLLDFTVKHSGDLDDQLQDLV NKGCFSALCMFYEKV  
 TFKKTSPLNTSQQLAYDLEQRLNGPAPISGMGIKQILTDYYNADGTLDEEF SDEVKAHK  
 DYRKALITIPPLREDYDDVTVRGPFQHAEDEGEALSAAVPVSIMASSVAGNRNKGEDEL  
 AGATQTSIDLTDGAA THDMTESAPAMEVHSHDMNLSYNPQPAVDAAA PAAPAAPSVSAP  
 AENVGQPGVPNTDAGSLSRSSSEMSRVN

#### Q4QF19

MYAQMP EIIYLCPCCEFSKREERERLLREARDAKEAERRRLMQLDVFEEARARPLPSGDVR  
 RKAYRRIMEDDELVE TAPSVPPP KTIDDLRRAKKDQKVPKLI VTVHCGRHVS AEHDDR I  
 SVIVRCGAFEGQTEKVLRGKEVMVAWEELFEFPYINHNEPLEVLV VNDALPEKNDR LIGG  
 VVI PCSALQDRSHGDQEPLPIMPEGSMQTGYGSCQEGPLGTIVASWYLRGADDKMDEEAI  
 EQQTL SVPLGCTFVVVHHLFQFTDYGAEPY TGGVLCVLRD TDNCSSESVLYKPGTQPEPSL  
 SPYYGKDGYYLPGNPSQVMQLNTERKLGHILVCVPKKEESSSEEEELLVIGAVPLEFER  
 LYNKGNVLLIESKSKEDALWGEIEVEWVNKPLDDLDPHPSLLAVQKESLFFTVVRGFNL  
 VRRDGE PVAEGYVSVASGELEGVTVEAPAVQGS DGNVINWNQEVRFVEVDPAQKVVEVQ  
 VYEKDR LISVGQCELD DDDDEGVVIVQMFHAANINEEAGEV VGSYKRLHAPLPVGED IYRK  
 RTAEAAAAYRGADEE DEEQEEAHRAAEMDES NVHEDEEE ENEEEEPQATRATP MADRDM  
 SINEDLYEKEVDEAAPHETPQWQRSQREEQR PDEEEEAPEQQEYLEEAQSEKELQEDAE  
 QEPQLEPEVEEELQPEEAEDA EHQVEEALEEVSEPEEGEEGLQR PAAAASEEVWQPEEEEH  
 HGELHRHEYEPEEAHQSEVGEFEAEHYCAASRSAGTPTSEAEAAA EAEAEAEAEVEAE  
 AEVEAEAEAEAGVEAEAVAAVAE TEAVAVAEAAA VAAVAEAEAEAKAEAEAEAEAEAA  
 YDATAGGRQRRRPSWVSPATKRS GYKQPWPYPSGAPETDQH I PFSKTKLSKKNIESIRQLE  
 TCKSRIEEESVRRSSTPRRSSTRGLSPSSQ

#### Q4Q6L9

MGCCNSKETKKPKKEEVLQREAAQYAKVSSETDSVEEQPNIEARVASVVKDLRAERIDAICA  
 HSHACPYRYNACTVVGGEVKFYFEGGIIFCIVKEGSWYIYND SLDYEAHVTVRFGPGSNI  
 AAGQRAELGEVEDGWTCIRAI VYPLETVHLVSGTANGYKTHITIKPLNEQYRHEACAAAN  
 GTAEAE TEAVRSLVTEGMDEEAILHRCVETTTPYVDLTFPPNGEAVARAGRDRTRTIPEVA  
 MMRPTQYLLDNNCLSVNDICGPVLALSIEPGNLGDSWFMCAVA IMAENEA AVRSIFAQGS  
 PAEKAVGAYRVLVNKNGWHTLIMDDYLPTFNRM PVFARSYDNPAE VWTSL LQKAYAKLH  
 GSYAAITGGDTLQALADLSGAPMCRFDKEWEEATTDAEKADTLANALVQFSRSGACVVLS  
 TPGHNSESYLGRSQASDAAA FRARYKKVGLHVGYTYS LERVVMVEECGTL LFKVRNPWRS  
 SSKWTKGPWSYGSREW DENQDACL LCGAQKDPQDGSFWMCWDDASRYFDGGGVLFANPDAV  
 DYRVTKGVFCKTIPSAVLEITASESTQVFFTL SQPDKRGVDRKEGAALFAPIMLTVSKEED  
 GVQRVQKNTSWNPTMPSEEFNFVVRDVS MWFTLGAE EKYL VVPRIHSGVKSDYDRPYV  
 ISIMSTDKLEGNRVEAKHIHSDSKVFTNYIAYDSEELPSVKVENQVRLPGKAPVTYVSA  
 TVI

**Q4QHT2**

MADQLSNEQISEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRS LGQNPTEAELQDMINEVDQDG  
SGTIDFPEFLTLMARKMQDSSEEEIKEAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDE  
EVDEMIREADVDDGQINYE EFVKMMMSK

**E9AE98**

MATIMSEHVVKMAKEFVNFMNQAITPFHAVQTVAKMLKDAGYTLHEEKVWPELTPGGKY  
YLMRNGTSIIAFSVGGKFDPMNGVKIVGAHTDSPNFLLKPRTKSTAADYERVAVQCYGGG  
LWHSWFDRDLTVAGRVMISRERLEQKIIKIDKPIMRIPNLAIHLTSAKDRESFSPNKESH  
LPIIISTQIAARIAECDDKASNPNCVSLIKAIASVAECNPDEIVDFDLSDVIDTQPAVI  
GGIHDEFIFSPRLDNLISCYCAVKAIIEADALENDTMMRMVCLFDHEECGSSSSQGAAGS  
LVPDVIEHIVSNKTLRATLVANSFLLSVDGAHGCHPNYADKHENHRPALHGGPVIKYNA  
NARYATNGLTAAVVKDVAKKAAPIQEFVVRNDSPCGSTIGPILSSLSGIKTADIGNPMI  
SMHSIREMCGTVDVYYMTKLIESFFINYQNPHE

**Q4QH67**

MALLQRVAQVMQEVAPLSLADHSDWNVGVLLSESPAPNKSNAIMLTIDLTPVMEECLEKN  
VEVILAYHPPLFRPVKRLTLQDPKQRIILQAASAGMSIYAPHTSLDAAEGGINDWLASLV  
AGDGAYTASPIQPTSSYAPNAAEATKATGMGRVLKKEEVEFCSMVGS LKQQLGLATVRV  
ALPDSWEPSHKVSSVALCAGSGTSVFRLRLRPVHVLLSGEMSHHDVLAATAAGQAVILCE  
HTNTERGFLKAVLQRTLQAKLEGTTVLVSDKDS DPLTAW

**E9AC78**

MIMKASGAAVLHAVREKMQEATVAALIVTSSDAHNSEYVATHLQSRAFISHFQGSAGTAL  
ITMEKALLWTDGRYWLAAEEEEKYPEFDLMKQGQPEVPSLEEWIAANLGSKAVVGMSPYVA  
TVAEWERLSKINLRPVANIVQDMMPPEKSVRKMYVRPAEFCGATCQERRAAILAELEKK  
DCDMIILSALDEIAWFTNLRGGDVDYNPVFYAYAVIDKHYENVRLYVNLKVDVAVRQAC  
EDHIDFYYPYEQFEADLKQLPRGRKALVDERQTSEAVFRILKDVGTVTVRVVCGPAQKLKA  
IKNEVELKGRDCHVRDGAALTRYLAWLHDQVANKGVTDLNEYDAATKLEEFRAQGEHFV  
QLSFGSIS SIGPNGAMCHYSPAETGSAAIRRDQLYLIDSGAHYWDGTTDVTRTICFTAPS  
DEQREAYTLVLKGHIALNSIIFPKGTSVRLD LARMALWGVGLDYAHGTGHGVGSFLNV  
HEGPHGISTRPVATGANMELHSIVSNEPGYKDGHYGIRIENLEEVVECRTKYSATGFYT  
MSHLTMAPLCRDLIDVSLLTETERAWVD RYHAKVVASIMPHLQQAGDQNAVEYLKYHTRP  
LFAVNEAYTLLSPDGKGA

**Q4Q707**

MPNLCVSCTFNPPTITLLGSTIREDTVRAMEAQLPLATSTAVNPSKDKPAKFI FLSNPDHW  
RMDLNQHFCDELHKS LVLVILHSLEEEGWCLRASNNVSNKENDRET VKLFFTRS

**Q4QGE5**

MQAYTQLEKLCHKVHRLTHLLSLGAWDAKTMMP SKGAAARGAALGELHGLITEMITSPST  
KALLDEAETAKAELTTVQQANLRELRR IYASQAALPTELRLV LKTKLSATTPLIWAKCRSN  
NDFATFLPALKEMIALARREAQYRSAATGKPLYEALFNQYESGMTLETLEKILLDVKSWL  
PELLQKILAAQRDAGLEVVAPEAPFPKDKQEALSRHLM EVWGFDFESGRLDVSEHPFTGM  
VKEDSRIT TAYDLQDFAKGLFATI HETGH SKYETNCGP MEMRGPVCEARSMTIHESQSR  
FAEVVIGHSSAFLEFLTPLLKEYFGDQPAFSL ENVR LMNQTVKPGFIRIRADEVCYPLHI  
LLRYEIERALIEGTMEAEDI PRVWNEKMKAYLGLETEGRDEIGCLQDIHWSMGAFGYFPT  
YSLGSMFAAQLMVTIKNELGEDTVDKCIRTGQMEPIFEKQREKIWSQGCLYDTEDLILKA  
TGEALNPKHFREYLERRYLRQEG

**E9AF59**

MSAHDKSLAYPFPI SMKMYREQRERLGASLQQAFPEGGHA AVLRAASEVPVNSTDCNYLF  
 VQESYFHLYFGAEIPDAYGAVLAGGKSVFFI PRLPADFATWMGPLPTPQSVKAQLEVEEV  
 HYVDEMEQVLMSCGVHTAEVLKGTNTDSGLEVLQAKLPEGTALATSTDYLYRVLSSQRCY  
 KTALEADVLYVCKVSSAAHVKVMQIAKPGMSQHHLESTFLHDVYYNGGCRRVSYTCICA  
 TGPHGATLHYPDNNCVIEDGTMALLDMGGNYRGYAADITCSFPVNGKFTQAQKTIYNAVL  
 DAHDRVMRAMKPGVEWVDMHLLAIRTTMHLIAAGILKGDIEITLMAKEIMQYFQPHGLGH  
 LIGIDVHDVGGYMEGCPERPPTKKDCCRLRTARTIEEGLYMTVEPGCYFNALLEMAKANP  
 DVQVHLCMEKLEEYVNFVGGVRIESDVLVTKDGVVNYTLVPRTVEEIERMAGAPFTKEVE  
 VYHN

**Q4QFX2**

MPCRKIIIDTDCGGDDAIGIMTALADPNTDVIAMTAVWGNVNVNQGMEINIGKLLDVFERD  
 IPFYKGAEAPLVSDPETVQWGGFGKDGFGDADFPPSARVLVQSKTHAALAITELLRAAKP  
 DEDAVYQLVCLGPLTNIALAMRLDPEVFHVLGSETEPAITIMGGASEAKGNSNLTSEFNM  
 HCDPEAAYIVFNQRSMRPVRVVSWEVTVDCSMTWTFDFKWIQRQENGKKQQRNFQVIEK  
 VFQRLETFTRPLPDGTKANTGDAEATQDNTCVIPDAVAVVAALYPESILDRFITYCTVEL  
 HGRETRGQTCLDWYGTKQSMAKRGRWCNCELITRVDNARFLEAMNGILEYNV

**Q4QDM4**

MSEMNLIVNITCNPPVISIFGPIKESTIDRLNETIPNSCSTTNTGKTPFALVRKEDPPHW  
 FGELRTQFATEDIGTSMLFISVLDALAEERVWKLKRGSTSLNHDGNKTTYKFFVVRGAH

**E9ACC9**

MPNVIVTCTFNPPCVSIOGANIRQDTIDALQRALPKQTTTSLPTQRPGEPKFLLTNGSG  
 VVESGTVNRIEDGSAAAGGAEEGSQENTSPHSSHGVAPGEGAKEYKSWRIDLGQHYCDQ  
 TGRAMIFLVIIEALEEEGFALRGTHTLMMDDREKDATQLIFVRS

**E9AC39**

MSTPRTTATAAKPKPYSFVNDYSVGMHPKILDLMARDNMTQHAGYGQDSHCAKAARLIGE  
 LLERPDADVHFISGGTQTNLIACSLALRPWEAVIATQLGHIISTHETGAIEATGHKVVVTAP  
 CPDGKLRVADIESALHENRSEHMVIPKLVYISNTTEVGTQYTKQELEDISASCKEHGLYL  
 FLDGARLASALSSPVNDLTLADIARLTDMFYIGATKAGGMFGEALII LNDALKPNARHLI  
 KQRGALMAKGWLLGIQFEVLMKDNLFELGAHSNKMAAILKAGLEACGIRLAWPSASNQL  
 FPILENTMIAELNNDFDMYTVEPLKDGTICIMRLCTSWATEEKECHRFEVVLKRLVASTA

**Q4QB61**

MGSFCAKPDAAKDDVHEGEKNYQEGEKSFNDANVEAKSKEQPCDKADAAKDVEATDGEA  
 KCAEAEGVEATDGEAKCTEAEGVEATDGEAKCAEAEDMEEKQEKFEVDPKNESDDMERQA  
 DEKREEWEQKVEEEGQHITDDTENHISCSG

**Q4Q7F3**

MPAFVGLRRLPLTVLCLLVLSALCVTEVLGWGCVGHMLLAEIAHRQLNDENKEKLDAMAH  
 AFAQSGPFESSPDMVQAACWADDVVRWQYAMATWHFFDKPYNPEDINITDPVATVNAV  
 VSRNMVTSLRRTNAPLYLLNFVAVNLVHILGDLHQPLHTTSRYSSEYPHGDKGGNEVEVQ  
 VGKRKVNLAHVWDNICSGTPPRYKRPLSYTDLFALAATADRLLLETYTFPEALRTLVDVVA  
 IHEESHMFAVNTSYPGVTPGATLSDAYLARCKRVAEARLTLGGYRLGYLLNELLPSIPVD  
 EATLEAYRAARWKRSA

Q4Q4E4

MAFVSVHEMALSHFSPAYVSRLFTDVIVSRPRSCLIAITLLPQAKQSPKIATPSKDYIKV  
 HEPITCTMSRNMIVNMSFNSPEIQILGPVQESTIERLNEVLPDSTTSTRSIRSNQPKFEY  
 VSNPDHWRIKLGNFQCDSEGVSRILVLLLDALIEEGGWTLISSQASSSSHGGALQQDFVW  
 NYKLFFSKYQDDE

Q4QFJ8

MPAVHVKSDEVKYTPEVIESLYDYATTRVRRNTDGTVSVEPTKCQLLFRATARQVPRVGV  
 LVGWCNNGTTVTAGILANKLGLKWRTRHGMQSANYFGSITQSSTINLGMTRDMDEVFVP  
 LKDLVPMVSPDNLVIGGWDCNNMNLGDAMRRAAVLDVQVQDALYDHMKKLCPLPAIFDID  
 FVAANQKDRANNVLDTCDRWEAVEQVRKDIRDFKSANELEKVIWLWTANTERFSEHRDGV  
 HDTAENLLAAVKRNESELAPSTLYAMAALVEKCSFINGAPQNTLCPGLVEMAREAKVFGV  
 GDDFKSGQTKMKSALVEFFVGAGIKPECIASYNHLGNNDGYNLSSHKQFCSKEITKSNVV  
 DDMIKSNQVLFPEGARKPDHCIVIKYIPYVGD SKRALDEYTF SIFMGGQQT VV LHNTCED  
 SLLAAPLIIDLIVLTELMEVRTISASDDTQTPPPASFEHMETVLSILSYLLKAPAVPEGT  
 PVVNALNRQRAAIENVLRAMIGLPPDSNMLLECRVPFIREEHNGK

Q4QI64

MATSRAALCAVAVVCVVLAAACAPARAIYVGTAAALFEEFKRTYQRAYGTLTEEQQRLA  
 NFERNLELMREHQARNPHARFGITKFFDLSEAEFAARYLNGAAYFAAAKQHAGQHYRKAR  
 ADLSAVPDAVDWREKGAFTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQWAVAGHKLVLRLSEQQLV  
 CDHVDNCGCGGLMLQAFEWVLRNMNGTVFTEKSYPYVSGNDVPECSNSSELAPGARIDG  
 YVSMESSERVMAAWLAKNGPISIAVDASSFMSYHSGVLTSCIGEQLNHGVLVGVNMTGE  
 VPYWVIKNSWGEDWGEKGYVRVTMGVNACLLTGYPVSVHVSQSPTPYL

Q9U1E1

MSSERTFIAVKPDGVQRGLVGEI IARFERKGYKLVALKILQPTTEQAQGHYKDLCSKPPF  
 PALVKYFSSGPIVCMVWEGKNVVKSGRVLLGATNPADSQPGTIRGDFAVDVGRNVCHGSD  
 SVESAEREIAFWFKADEIASWTSHSVSIYE

Q4Q7X1

MASGCLKYASVDDFIAKCILSRDPYQPEFTQAVREVMTSLWPFLQKNPKYTQDGLLERIV  
 EPERVIQFRVPWVDDKGVTHVNRAFRVQFN SAI GPYKGGMRFHPSVNL SILKFLGFQTF  
 KNSLTTLPMGGGKGGADDFPKGKSDCEVMRFCQSLVAELYRHIGADTDVPAGDIGVGSRE  
 VGYMNGMYWKLNRNTNECTFTGKGLAFQGS AIRPEATGYGLVYFVQSMLTHVND SLEKTV  
 LVSGSGNVAQYAI EKCMELGAKVITASDSKGYIQDPSGFDKVKLAKLMKLNCRGTLEE  
 YARETGVTYVPGKRPWCVKADIALPCATQNEIEGADAKTMLTNGVKLVAEGANMPTTEEA  
 TEIFQKAGVLFAPGKASNAGGVAISGLEMSQNAARLVWDAEEVDSRLRSIMSSIHDSCVQ  
 YGEKDGKVS YVDGANIAGFVKVADAMLALGIV

Q4QJG7

MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAATYKKKVAVVDVQATHGPPFFAALGGTCVNVGCVPK  
 KLMVTGAQYMDLIRESGGFGWEMNRESLCPNWKT LIAAKNKVVNGINESYKSMFADTEGL  
 SFHMGFGALQDAHTVLRKSEDPNSDVLETLDTEYIL IATGSWPTRLGVPGDEF CITSNE  
 AFYLEDAPKRMLCVGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGYV D L CYRGDLILRGFDTEVRKSLTK  
 QLGANGIRVNTLNPTKITKNEDGSHVHFNDGTEEDYDQVMLAIGRVPRSQTLQLDKAG  
 VQTAKNAVQVDAYSKTSVDNIYAI G DVTNRVMLTPVAINEGAFAETVFGGKPRATDHT  
 KVACAVSIPPIGTCGMTEEEAAKNHETVAVYESCFTPLMHNISGSKHKEFMIRIITDQP  
 SGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMKMGAKISDFHNTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYEN  
 GKRVEKLSSNL

**P69201**

MQIFVKTLTGKTIALEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRILIFAGKQLEEGRTLSDYN  
IQKESTLHLVLRRLRGGVMEPTLVALAKKYNWEKKVCRRCYARLPVRATNCRKKACGHCSN  
LRMKKKLR

**E9AEE2**

MPPKPVIIDHDGGHDDLVALALLLGNPEAVKVICIVTDADCFVDQAFSVSGKLMAMMHA  
REATELFPVAKTSFKGVNPFSEWRWSAKNMDDLPCVNIPEHVAIWEAVRDENDALVGEE  
VMAQLVMSSPEKVTICVTGPLSCVAWCIDKYGEEFCKNVEECIIMGGAVDVKGNVFI DGR  
TDGSAEWNIFWDPVAAKTVLTYPHLKKIVFSLDSTNSVPVTSEVVQKFGAQNKYLLSQFV  
GSAWASCTHFELIRPGDMYYAWDVLTAAYAIEQRLAELEAVPLDVVVEANAPNEGQTRRA  
AEGA AVKNTYVAKNTNADMFYRMVMDTARCCPV

**E9AFW0**

MNRAGFDKIYITVFSPEGSLYQVEYAFKAVTYPGLLTVAIRCKDAVLVATQHVIPDRMLRP  
DSVTMLYEVT PGIGCCMTGRAPDGRALVQRAREEASDYHYRYGVQIPIAVLAKRMGDKAQ  
VRTQQAGLRPMGVVSTFIMGDQSDQDALKPQIYTVDPAGWTCGHIACAVGKKQVEAMAF  
LEKRQKSTEFALTEQEAAMIALAALQSAIGTAVKAKEVEVGRCTAANPAFQRPVNSEVE  
EWLTAVAEAD

**Q4QC13**

MSEAFYGLTTFFSPSGKLVQIEYATTAAGKGTALGVKATDGVVIAAKKKAPSTLVDASSI  
QKVFILDEHV GCTYSGMGPD CRVLI DSARKNCQQYRLMYNEPIPI SQLVRKISALYQEF  
QSGGVRPF GCSLLVAGVDANGYHLYQVDP SGTFWAWKATAIGTGSPDAKAFLEKRYTVDM  
ELED AVHTALLTLKEGFDGQMTSENTQVGRVVG NRFEVLSVDQLRDYLDQI

**Q4Q4C4**

MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWEVIAD EHGVDPTGSYQGDSDLQLERIN VYFDESAGGRYV  
PRAVLM DLEPGTMDSVRAGPYGQLFRPDNFI FGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVLDVC  
RKEAESCDCLQG FQLSHSLGGGTGSGMG TLLISKLREEYPDRIMM TFSVIPSPRVSDTVV  
EPYNTT LSVHQLVENSDESMCIDNEALYD ICFRTLKLTPTFGDLNHLVAAVMSGVTCCL  
RFPGQLNSDLRKLAVNLV PPRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFD AKNMM  
QAADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSYFIEWIPNNIKSSICDI PPKG  
LKMSVT FIGNNTCIQEMFRRVGEQFTGMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS  
EYQQYQDATVEEEGEYDEEEY

**Q4QGC5**

MREAICIHIGQAGCQVGNACWELFCLEHGIQPDGSMPSDKCIGVEDDAFN TFFSETGAGK  
HVPRCIFLDLEPTVVDEVRTGTYRQLFNPEQLVSGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLALD  
RIRKLADNCTGLQGFMVFHAVGGGTGSGLGALLLERLSVDYGKSKLGYTVYPSQVSTA  
VVEPYN CVLSTHSLLEHTDVATMLDNEAIYDLTRRSLDIERPSYTNVNLIGQVSSSLTA  
SLRFDGALNVDLTFEQTNLV PYPRIHFVLT SYAPVVS AEKAYHEQLSVADI TNSVFEPAG  
MLTKCDPRHGKYMSCCLMYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGIN YQPP  
TVVPGGDLAKVQRAVCMIANSTAI AEV FARIDHKFDLMYSKRAFVHWYV GEGMEEGEFSE  
AREDLAALEKDYEEVGAESADDMGEEDVEEY

Q4QF74

MSCGNAKINSPAPSFEEVALMPNGSFKKISLSSYKGWVVLFFYPLDFSFVCPTEVIAFS  
 DSVSRFNELNCEVLACSIDSEYAHLQWTLQDRKKGGLGTMAIPMLADKTKSIARSYGVLE  
 ESQGVAYRGLFIIDPHGMLRQITVNDMPVGRSVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKG  
 DPGMKVDHMK

Q4QD99

MTALITKQRYNWMGYDGVESAVCDTALLRSDGGPANNYNMHRQQVIMEVKERLYRIKRD  
 LGLIPEEELRAEERAIQRRRMEKKRREEEERIRKEAEEAARAEEMERRHLELEEAEERAS  
 AEEVATQASAEHKHYMNSDEDSDEENGIDDEQSASLVAMLRTQEEIDSAIAGFTKGTRM  
 LLASSNGYVSYLDGVSFHFTIAKVESHNASNREKVMQALAGTNVAMPTAEEYSLEEVQRQA  
 MHDRDTARKKLDALRALQDPTYTARIRSAEKDTYGTVPVQQLMEEDGDMSALVANCEDAKR  
 FAESVRKAYNSRAAASAHALACALCTPPFTAQESTSEAQAPAGKMANAEDGVSQPTGAN  
 SPSSSTSAQ

Q4QBK1

MLISTRDAFEKRHITRSDGVEVLPREMITVAALEAGYCLASPTVGEAVGKTTYPGQMTAY  
 EFAELCEDNRSSFMSAEDMAKCVVVVAPAHVITRRSLEEIMAKGSSKNDALSDEEVDALF  
 SILDAENKGAITDKDFMRALYGNLGLRCLRSARRKLDAFEAKRRQQEALDRARAEERMKE  
 EGKAAAQKGGPTALSKEKKKKAAACC

Q4Q3A1

MSQQEGTSPTDRESTMQILNMFPGHLHLLPQTPQLHFLFTVIRDVETQRTDFIFYSERII  
 RLIFEAAALCLIPVKPFNVITPVGAVYRGVRRPDDRGIIGVSI MRAGESMERVLREMC PGVR  
 IGKILVQRDETSTDKTPDARFTYSKLPDVASRRVLLLDPMCATTGGSVIKATEILINEYG  
 VLEEDIIFLNLISAPAGIRKYLGRFPKIQIVTAAIDDDLDENRYIVPGLGDFGDRYFGTISE

Q4QB56

MGSSCTKDSAKEPQKSADKIKSTNETNQGGNASGSRKSAGGRTNEYDPKDDGFTPNNE DR  
 CPKEDGHTGKNDDGGPKEDGHAPKNDDHAPKEDGHAPKNDDHAPKEDGHAPKNDDHAPKE  
 DGHAPKNDDHAPKEDGHAPKNDDGDVQKKSSEDGDNVGEKKGNEDGNDDQPKEHAAGN

Q4Q277

MAKGRSTDAKGSQRRQKVLRLDNIRGITRGCVRRMARRGGVKRISSEVYEEVRRVLKAY  
 VEDIVRCSTAYTEYARKKTVTACDVVTALRQGHILYGYA

Q4QBF5

MPGVVEANLQKLGITLPVPAAPAASYAPFCIVGNMYYVSGQLPKDADGKLMVGLGDSL T  
 AEDGKAAAKSCAVQLIAQIRAAAGGDLKVKRVVMVRCYVNSACNFHDHPLVANGCSDLL  
 VSVFGAEVGLHARCAFGVAQLPFNSMVEIEAQFELKDDAKAAS

Q4QJ78

MAKGRSADAKSSQKRQKVLRLDNIRGITRGCVRRMARRGGVKRISSEVYGEVRRVLKAY  
 LEDIVRCSTAYTEYARKKTVTACDVVNALRQGHILYGYA

## 7.2. Aminosäuresequenzen der rekombinant exprimierten Proteinkandidaten:

### 9His-TEV-Q4Q8Z6-LEIMA (Protein A)

MGHHHHHHHHHENLYFQGGMSEISFSEMSLHEVPLASEATPSSAVVLGGRTDLRVGDFVGF  
 FQRISPSKEWKLSLKGKIALPTALTVKVAHFDAVNETTQDPISEQMVRQKAAETQKMD  
 IWHNREALRENLAQESAKEKAATQRLLAARDQTVTRQMATGDKVTASLENLDNARRRLRE  
 VPVKEWALRSSYLPSEILGVMRSVMLILYEDSVTKWEHIQEVMSRQDFMERILGWDC  
 ATPMSLSRRKRIVALCAGKDVGEAPSKKLHPSGTRSRSPSRPLVVAAKSTNPSNVVILDK  
 NVRTWINAQLSCSEAAEQEMMINSFAEQEQRALLREINDMRVGIETIEVQMLEMKN  
 ILGIDDAPRPIMPLDAYPTDTTFYKRTYPDADGRFVQEIILREAVILNFGPIAEEDAEGY  
 VRLNSAQVERLRDAVVSTNVRHDAEEMEELLARKEREEEEIAELKSRISELRNKVSILTAE  
 EEEELAQLEKLLADAERRRHATLSRIADLYACGRGAREITLAIKRPEFRYTRLHCKMSGD  
 WETILSDAERYSEMIAAFCDVSTLLNIPASYVLDIDTCCGSLIDFTVKHSGDLDDDEQL  
 QDLVNGKCFYSALCMFYEKVTFKKTSPLNTPSQQLAYDLEQRLNGPAPISGMGIKQILTDY  
 YNADGTLDEEFSDEVKAHKDYRKALITIPPLREDDVTVRGPFEQHAEDEGEALSAAVP  
 VSIMASSVAGNRNKGEDELATGATQTSIDLTDGTAATHDMTESAPAMEVHSHDMNLSYNPQ  
 PAVDAAAPAAPAAPSVSAPAENVGQPGVPNTDAGSLSRSSSEMSRVN

### 9His-TEV-Q4Q6L9-LEIMA (Protein C)

MGHHHHHHHHHENLYFQGGMGCCNSKETKKPKKEEVLQREAQYAKVSSETDSVEEQPNIEA  
 RVASVVKDLRAERIDAICAHSHACPYRYNACTVVGGEVKFYFEGGIIFCIVKEGSWYIYN  
 DSLDYEAHVTVRFGPGSNIAAGQRAELGEVEDGWTCIRAIVYPLETVHLVSGTANGYKTH  
 ITIKPLNEQYRHEACAAANGTAEAEATEAVRSLVTEGMDEEAILHRCVETTTYPVDLTFPP  
 NGEAVARAGRDRTRTPEVAMMRPTQYLLDNCLSVNDICGPVLALSIEPGNLGDSWFMCA  
 VAIMAENEAAVRSIFAQGSAPAEKAVGAYRVLVNKNGWWHTLIMDDYLPTFNRMPVFARSY  
 DNPAEVWTSLLQKAYAKLHGSYAAITGGDTLQALADLSGAPMCRFDKEWEEATDAAEKAD  
 TLANALVQFSRSGACVVLSTPGHNSESYLGRSQASDAAAFRARYKKVGLHVGYTYSLE  
 VMVEECGTLFLFKVRNPWRSSSKWTGPWSYGSREWENQDACLLCGAQKDPQDGSFWMCW  
 DASRYFDGGGVLFANPDAVDYRVKGVFCKTIPSAVLEITASESTQVFFTLSPDKRGVDR  
 KEGAALFAPIMLTVSKEEDGVQRVQKNTSWNPTMPSEEFNFVVGGRVSMWFTLGAEKYL  
 VVPRIHSGKGVKSDYDRPYVISIMSTDKLEGNVRVEAKHIHSDSKVFTNYIAYDSEELPSV  
 KVENQVRLPGKAPVTVYSATVI

### Q4QHT2-6His (Protein D)

MADQLSNEQISEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDQDG  
 SGTIDFPEFLTLMARKMQDSDSEEEIKEAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDE  
 EVDEMIREADVGDGQINYEFEVKKMMMSKLEHHHHHHH

### 9His-TEV-E9AE98-LEIMA (Protein E)

MGHHHHHHHHHENLYFQGGMATIMSEHVVKMAKEFVNFMNQAITPFHAVQTVAKMLKDAG  
 YTQLHEEKVWPELTPGGKYLLMRNGTSIIAFSVGGKFDPMNGVKIVGAHTDSPNFLKPR  
 TKSTAADYERVAVQCYGGGLWHSWFDRDLTVAGRVMISRERLEQKIIKIDKPIMRIPNLA  
 IHLTSAKDRESFSPNKESHLLIPIISTQIAARIAECDDKASNPNHCVSLIKAIASVAECN  
 PDEIVDFDLSVIDTQPAVIGGIHDEFIFSPRLDNLISCYCAVKAIIEADALENDTMMRMV  
 CLFDHEECGSSSSQGAAGSLVPDVIEHIVSNKTLRATLVANSFLLSVDGAHGCHPNYADK  
 HENAHRPALHGGPVIKYNANARYATNGLTAAVVKDVAKKAAIPIQEFVVRNDSPCGSTIG  
 PILSSLSGIKTADIGNPMISMHSIREMCGTVDVVYMTKLIIESFFINYQNPHE

### 7.3. Informationen zu den detektierten Proteinen aus *L. major*-Lysat

Die Angaben zu den einzelnen Proteinen beziehen sich auf die *Protein Knowledgebase* (UniProtKB), <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=Leishmania+major&sort=score> (n. b. = nicht bekannt).

**Tab. 2: Informationen zu den massenspektrometrisch identifizierten Proteinen.**

Protein	Name	AS	MW	Chromosom	Funktion / Bestandteil
Q4Q8Z6	Uncharakterisiertes Protein	807	89533	26	n. b.
Q4QFI9	Uncharakterisiertes Protein	930	103971	14	n. b.
Q4Q6L9	Putatives Zytoskelett-assoziiertes Protein CAP5.5	723	80009	31	Mikrotubuli-Dynamik
Q4QHT2	Putatives Calmodulin	149	16825	9	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Regulation von Enzymen und Zellprozessen
E9AE98	Putative Aspartyl-aminopeptidase	453	49673	29	intrazellulärer Protein-metabolismus
Q4QH67	GTP-Cyclohydrolase I	279	29864	11	Cofaktor-Biosynthese
E9AC78	Metallopeptidase, Clan MG, Familie M24	619	68954	2	Aminopeptidase-Aktivität
Q4Q707	Uncharakterisiertes Protein	115	13092	30	n. b.
Q4QGE5	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Familie 32	503	57033	13	Proteolyse, Metallo-carboxypeptidase-Aktivität
E9AF59	Putative Aminopeptidase P	484	53646	35	Aminopeptidase-Aktivität
Q4QFX2	Putative Inosin-Guanin-Nukleosid-Hydrolase	352	39007	14	Hydrolase-Aktivität
Q4QDM4	Uncharakterisiertes Protein	118	13320	18	n. b.
E9ACC9	Uncharakterisiertes Protein	163	17579	2	n. b.
E9AC39	Putative $\beta$ -eliminating Lyase	359	39269	1	zelluläre Aminosäure-Stoffwechselprozesse
Q4QB61	Uncharakterisiertes Protein	150	16453	23	n. b.
Q4Q7F3	p1/s1 Nuklease	316	35156	30	Endonuklease-Aktivität, katabolischer DNA Prozess
Q4Q4E4	Uncharakterisiertes Protein	193	21783	33	n. b.
Q4QFJ8	Inositol-3-phosphat-synthase	526	58301	14	Isomerase, biosynthetischer Inositol-Prozess
Q4QI64	Cathepsin L-like Protease	348	37801	8	Peptidase-Aktivität vom Cystein-Typ
Q9U1E1	Nukleosid-diphosphat-Kinase	151	16640	32	ATP-Bindung, biosynthetische Prozesse
Q4Q7X1	Glutamat-Dehydrogenase	452	49130	28	Oxidoreduktase, zelluläre Aminosäure-Stoffwechselprozesse
Q4QJG7	Trypanothion-Reduktase	491	53144	5	Oxidoreduktase, Zell-Redox-Homöostase
P69201	Ubiquitin-60S ribosomales Protein L40	128	14682	31	Ribosomales Protein, Translation
E9AEE2	Putative Inosin-Adenosin-Guanosin-Nukleosid-Hydrolase	333	36522	29	Purin-Nukleosidase-Aktivität
E9AFW0	Proteasom- Untereinheit des alpha-Typs	250	27223	35	Ubiquitin-abhängige katabolische Proteinprozesse, Endopeptidase-Aktivität
Q4QC13	Proteasom- Untereinheit des alpha-Typs	231	25097	21	Ubiquitin-abhängige katabolische Proteinprozesse, Endopeptidase-Aktivität
Q4Q4C4	$\beta$ -Tubulin	443	49740	33	GTPase-Aktivität, struktureller Zytoskelett-Bestandteil, Mikrotubuli-basierende Prozesse

Q4QGC5	$\alpha$ -Tubulin	451	49759	13	GTPase-Aktivität, stuktureller Zytoskelett-Bestandteil, Mikrotubuli-basierende Prozesse
Q4QF74	Tryparedoxin-Peroxidase	190	21173	15	Peroxidase-, Peroxiredoxin-Aktivität, Oxidoreduktase
Q4QD99	Uncharakterisiertes Protein	369	41072	19	n. b.
Q4QBK1	I/6 Autoantigen-ähnliches Protein	206	22575	22	Bindung von Kalzium-Ionen
Q4Q3A1	Putative Uracil-Phosphoribosyltransferase	242	27179	34	Uracil-Phosphoribosyltransferase-Aktivität, Glykosyltransferase
Q4QB56	Hydrophiles acyliertes Oberflächenprotein B	177	18668	23	n. b.
Q4Q277	Histon H4	100	11439	2, 25, 31, 35, 36	DNA-Bindung
Q4QBF5	Putative Endoribonuklease L-PSP (Pb5)	163	16919	23	RNase, RNA-Prozessierung, -abbau
Q4QJ78	Histon H4	100	11366	6	DNA-Bindung

#### 7.4. BLAST-Analyse ausgewählter Proteinkandidaten aus *L. major*

Die Tabellen 3-7 zeigen die mittels BLAST-Analyse ermittelten Homologien der Aminosäuresequenzen der Proteinkandidaten A-E aus *L. major* Parasiten mit denen anderer *Leishmania*-Subspezies der *Trypanosomatidae*-Familie und *Leishmaniinae*-Unterfamilie.

Die gefundenen Treffer sind nach dem Score-Wert sortiert (siehe Tab. 3-7).

**Tab. 3: Vergleich der Aminosäuresequenz von Q4Q8Z6 (Protein A) mit den Sequenzen anderer *Leishmaniinae*.** <http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B2015012594HT5QDLML?fil=taxonomy:1286322>

Protein	Name	Organismus	Länge (AS)	Identität (%)	Score	E-Wert
Q4Q8Z6_LEIMA	Uncharacterized protein	<i>L. major</i>	807	100,0	4096	0,0
A4I2C4_LEIIN	Uncharacterized protein	<i>L. infantum</i>	803	88,0	3586	0,0
E9BIK7_LEIDB	Uncharacterized protein	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	803	88,0	3582	0,0
E9AYH6_LEIMU	Putative uncharacterized protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	801	79,0	3240	0,0
A0A088RVL3_9TRYP	Uncharacterized protein	<i>L. panamensis</i>	871	66,0	2581	0,0
A4HF40_LEIBR	Uncharacterized protein	<i>L. braziliensis</i>	878	66,0	2569	0,0
A4I2C3_LEIIN	Putative mitotubule-associated protein Gb4	<i>L. infantum</i>	2532	22,0	285	3e-22
E9BIK6_LEIDB	Mitotubule-associated protein Gb4, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	2532	22,0	285	3e-22
A0A088RTH9_9TRYP	Mitotubule-associated protein Gb4, putative	<i>L. panamensis</i>	2524	23,0	263	1e-19
A4HF39_LEIBR	Putative mitotubule-associated protein Gb4	<i>L. braziliensis</i>	2524	23,0	259	3e-19
Q4Q8Z7_LEIMA	Putative mitotubule-associated protein Gb4	<i>L. major</i>	2615	22,0	253	2e-18
E9AYH5_LEIMU	Putative mitotubule-associated protein Gb4	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	2834	21,0	226	3e-15
A4HJA9_LEIBR	Uncharacterized protein	<i>L. braziliensis</i>	620	20,0	134	1e-4
A0A088RXR6_9TRYP	Uncharacterized protein	<i>L. panamensis</i>	620	20,0	133	2e-4
E9B1S4_LEIMU	Uncharacterized protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	627	21,0	128	7e-4
Q4Q6D7_LEIMA	Uncharacterized protein	<i>L. major</i>	627	20,0	127	9e-4
A4I6Q2_LEIIN	Uncharacterized protein	<i>L. infantum</i>	627	21,0	126	1e-3
E9BMQ2_LEIDB	Uncharacterized protein	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	627	21,0	125	2e-3
A0A088RVN1_9TRYP	Uncharacterized protein	<i>L. panamensis</i>	2015	32,0	107	2,6e-1
A4HF60_LEIBR	Uncharacterized protein	<i>L. braziliensis</i>	2320	32,0	107	2,7e-1

**Tab. 4: Aminosäuresequenz-Vergleich von Q4QFI9 (Protein B) und anderen *Leishmaniinae*.**  
<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B2015012594HTEYRWVP?fil=taxonomy:1286322>

Protein	Name	Organismus	Länge (AS)	Identität (%)	Score	E-Wert
Q4QFI9_LEIMA	Uncharacterized protein	<i>L. major</i>	930	100,0	4813	0,0
A4HW91_LEIIN	Uncharacterized protein	<i>L. infantum</i>	1006	78,0	3870	0,0
E9APZ2_LEIMU	Putative uncharacterized protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	966	72,0	3479	0,0
E9BC36_LEIDB	Uncharacterized protein	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	730	89,0	3365	0,0
A4H7W4_LEIBR	Uncharacterized protein	<i>L. braziliensis</i>	918	60,0	2637	0,0
A0A088RLQ3_9TRYP	Uncharacterized protein	<i>L. panamensis</i>	894	60,0	2579	0,0
Q4Q8Z6_LEIMA	Uncharacterized protein	<i>L. major</i>	807	95,0	1986	0,0
A4I2C4_LEIIN	Uncharacterized protein	<i>L. infantum</i>	803	87,0	1709	0,0
E9BIK7_LEIDB	Uncharacterized protein	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	803	86,0	1705	0,0
E9AYH6_LEIMU	Putative uncharacterized protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	801	79,0	1575	0,0
A0A088RVL3_9TRYP	Uncharacterized protein	<i>L. panamensis</i>	871	64,0	1238	2e-147
A4HF40_LEIBR	Uncharacterized protein	<i>L. braziliensis</i>	878	64,0	1225	2e-145
A4I2L3_LEIIN	Kinetoplast-associated protein-like protein	<i>L. infantum</i>	660	28,0	373	3e-33
E9AYS6_LEIMU	Kinetoplast-associated protein-like protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	1346	29,0	377	7e-33
E9AD01_LEIMA	Kinetoplast-associated protein-like protein	<i>L. major</i>	729	30,0	348	7e-30
E9ADL3_LEIMA	Uncharacterized protein	<i>L. major</i>	2955	30,0	327	8e-27
A4HFE2_LEIBR	Kinetoplast-associated protein-like protein	<i>L. braziliensis</i>	923	30,0	319	3e-26
A4HFE3_LEIBR	Kinetoplast-associated protein-like protein	<i>L. braziliensis</i>	485	35,0	298	2e-24
E9AM68_LEIMU	Uncharacterized protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	2840	28,0	305	3e-24

**Tab. 5: Aminosäuresequenz-Vergleich von Q4Q6L9 (Protein C) mit anderen *Leishmaniinae*.**  
<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B2015012594HTKMQH8P?fil=taxonomy:1286322>

Protein	Name	Organismus	Länge (AS)	Identität (%)	Score	E-Wert
Q4Q6L9_LEIMA	Putative cytoskeleton-associated protein CAP5.5	<i>L. major</i>	723	100,0	3826	0,0
A4I6E4_LEIIN	Putative cytoskeleton-associated protein CAP5.5	<i>L. infantum</i>	724	91,0	3473	0,0
E9BMG9_LEIDB	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	724	91,0	3465	0,0
E8NHG6_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0440_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	724	84,0	3232	0,0
A0A088SFS7_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	726	63,0	2448	0,0
E8NHQ2_LEIMU	WGS CADB00000000 data, contig 8	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	445	86,0	2052	0,0
C6K3U9_9TRYP	Putative cytoskeleton-associated protein CAP5.5	<i>Crithidia sp.</i> ATCC 30255	702	59,0	1913	0,0
A4HJ23_LEIBR	Putative cytoskeleton-associated protein CAP5.5	<i>L. braziliensis</i>	484	67,0	1758	0,0
Q4QCS8_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	823	35,0	927	1e-108
Q4QCS9_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	976	35,0	926	3e-107
A4HYN0_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	821	35,0	915	5e-107
E9AUQ7_LEIMU	Calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	934	33,0	917	3e-106
A4HJ24_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	714	33,0	900	7e-106
A4HYW1_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	1014	35,0	915	2e-105
A0A088RWX8_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	714	32,0	894	5e-105
E9BMH1_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	777	32,0	893	3e-104
E9B1J6_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	708	32,0	888	3e-104
Q4Q6L7_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	732	33,0	889	4e-104
A4I6E6_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	777	32,0	887	2e-103
A0A088RPK1_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	815	33,0	882	3e-102
A0A088S8S0_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	849	33,0	882	6e-102
E8NHG8_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0460a_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	786	32,0	877	8e-102
E8NHM4_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0460c_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	708	32,0	870	1e-101
E8NHM2_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0460e_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	708	32,0	867	4e-101

E9AIH1_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	816	33,0	870	2e-100
E9BES2_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	687	32,0	852	3e-99
C6K3U5_9TRYP	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>Crithidia</i> sp. ATCC 30255	784	31,0	856	8e-99
A4HYW2_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	687	32,0	849	9e-99
Q4QCS7_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	687	33,0	849	9e-99
E9AUQ9_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	687	32,0	843	7e-98
A4I6K4_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	784	30,0	849	8e-98
Q4Q6M4_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	855	29,0	853	1e-97
E9BMG5_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	784	30,0	846	2e-97
E9B1J0_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	784	30,0	845	3e-97
A0A088RSA8_9TRYP	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. panamensis</i>	704	32,0	837	8e-97
A4HE81_LEIBR	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. braziliensis</i>	705	32,0	836	1e-96
A4HJ14_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	783	30,0	836	6e-96
A0A088RWU9_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	783	30,0	835	8e-96
A0A088RPY0_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	689	31,0	817	4e-94
E9BHQ8_LEIDB	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	706	32,0	817	6e-94
E9AIH3_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	687	31,0	815	8e-94
A4I1J4_LEIIN	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. infantum</i>	706	32,0	814	2e-93
Q4Q9U3_LEIMA	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. major</i>	705	32,0	809	9e-93
E9AXM9_LEIMU	Calpain family cysteine protease-like protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	705	32,0	805	3e-92
E8NHM8_LEIMU	WGS CADB00000000 data, contig 66	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	581	33,0	782	3e-90
A4HS39_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	855	32,0	786	3e-88
E9AK26_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	797	32,0	781	6e-88
Q9U0T9_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	854	32,0	778	4e-87
E9B809_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	855	34,0	773	2e-86
A4H3W4_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	856	32,0	773	2e-86
A0A088S1L0_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	856	32,0	765	3e-85
Q4QCS6_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	743	30,0	758	4e-85
E9BES3_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	743	30,0	756	8e-85
A4HYW3_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	743	30,0	755	1e-84

E9AIH4_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	743	30,0	749	7e-84
E8NHF1_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0460b_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	508	34,0	726	7e-83
A0A088RS13_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	743	30,0	741	1e-82
E9AUR0_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	743	30,0	723	4e-80
A4HJ22_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	947	30,0	704	3e-76
A4I6F0_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	939	31,0	698	2e-75
A0A088RXG6_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	949	30,0	698	2e-75
E9BMG8_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	939	31,0	695	5e-75
E8NHG7_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0430_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	941	31,0	680	6e-73
E8NHG3_LEIMU	Putative uncharacterized protein LmxM_30_0440a_1	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	169	71,0	613	6e-71
Q4Q6M0_LEIMA	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. major</i>	938	30,0	662	1e-70
E9AUQ8_LEIMU	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	651	37,0	636	1e-68
C6K3U8_9TRYP	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>Crithidia</i> sp. ATCC 30255	1022	27,0	564	1e-57
A4HYW4_LEIIN	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. infantum</i>	999	27,0	524	2e-52
E9BES4_LEIDB	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	1105	27,0	516	4e-51
A0A088RXA9_9TRYP	Calpain-like protein, putative	<i>L. panamensis</i>	1015	26,0	495	1e-48
A4HJ15_LEIBR	Putative calpain-like protein	<i>L. braziliensis</i>	1497	26,0	493	6e-48
A0A088S8S5_9TRYP	Calpain-like cysteine peptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	544	30,0	473	2e-47
E9AIH6_LEIBR	Putative calpain-like cysteine peptidase	<i>L. braziliensis</i>	544	30,0	468	1e-46
Q4Q6M3_LEIMA	Putative calpain-like protein	<i>L. major</i>	932	27,0	475	3e-46
A4I6K5_LEIIN	Putative calpain-like protein	<i>L. infantum</i>	936	28,0	470	1e-45
E9B1J1_LEIMU	Putative calpain-like protein	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	936	28,0	469	2e-45
E9BMG6_LEIDB	Calpain-like protein, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	936	28,0	468	2e-45
C6K3U6_9TRYP	Putative calpain protein	<i>Crithidia</i> sp. ATCC 30255	1643	26,0	470	4e-45

**Tab. 6: Homologie-Suche für die Aminosäuresequenz von *L. major* Q4QHT2 (Protein D).**  
<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B201501252ERW5GSHMR?fil=taxonomy:1286322>

Protein	Name	Organismus	Länge (AS)	Identität (%)	Score	E-Wert
Q4QHT2_LEIMA	Putative calmodulin	<i>L. major</i>	149	100,0	755	1e-99
B1PSN3_LEIDO	Calmodulin	<i>L. donovani</i>	149	100,0	755	1e-99
V5RIA5_LEIAM	Calmodulin-like protein	<i>L. amazonensis</i>	149	100,0	755	1e-99
E9AMU3_LEIMU	Putative calmodulin	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	149	100,0	755	1e-99
A0A088RJ41_9TRYP	Calmodulin, putative	<i>L. panamensis</i>	149	100,0	755	1e-99
E9B9Y3_LEIDB	Calmodulin, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	149	100,0	755	1e-99
A4HU13_LEIIN	Putative calmodulin	<i>L. infantum</i>	149	100,0	755	1e-99
A4H5R9_LEIBR	Putative calmodulin	<i>L. braziliensis</i>	149	100,0	755	1e-99

**Tab. 7: BLAST der Aminosäuresequenz von *L. major* E9AE98 (Protein E).**  
<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B201501252ERW5PB9F0?fil=taxonomy:1286322>

Protein	Name	Organismus	Länge (AS)	Identität (%)	Score	E-Wert
E9AE98_LEIMA	Aspartyl putative aminopeptidase	<i>L. major</i>	453	100,0	2366	0,0
A4I4V0_LEIIN	Putative aspartyl aminopeptidase	<i>L. infantum</i>	453	95,0	2277	0,0
E9BL44_LEIDB	Aspartyl aminopeptidase, putative	<i>L. donovani</i> (strain BPK282A1)	453	95,0	2270	0,0
E9ALI8_LEIMU	Putative aspartyl aminopeptidase	<i>L. mexicana</i> (strain MHOM/GT/2001/U1103)	453	94,0	2245	0,0
A0A088RY37_9TRYP	Aspartyl aminopeptidase, putative	<i>L. panamensis</i>	453	89,0	2155	0,0
A4HHN5_LEIBR	Putative aspartyl aminopeptidase	<i>L. braziliensis</i>	453	88,0	2149	0,0

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] **World Health Organization** (WHO), Homepage, [www.who.int/en/](http://www.who.int/en/), Stand 2015
- [2] **Singh S** (2014). Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of *Leishmania*-HIV co-infection in India. *Int J Infect Dis* **29**: 103-112.
- [3] **von Stebut E, Schleicher U, Bogdan C** (2012). Cutaneous leishmaniasis as travelers' disease. Clinical presentation, diagnostics and therapy. *Hautarzt* **63**: 233-246.
- [4] **Weitzel T, Mühlberger N, Jelinek T, Schunk M, Ehrhardt S, Bogdan C, Arasteh K, Schneider T, Kern WV, Fätkenheuer G, Boecken G, Zoller T, Probst M, Peters M, Weinke T, Gfrörer S, Klinker H, Holthoff-Stich ML; Surveillance Importierter Infektionen in Deutschland (SIMPID) Surveillance Network** (2005). Imported leishmaniasis in Germany 2001-2004: data of the SIMPID surveillance network. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**:471-476.
- [5] **von Stebut E, Sunderkötter C** (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Hautarzt* **58**: 445-458.
- [6] **Naucke TJ** (2007). Leishmaniose – Einzug in Deutschland. *Tierärztl. Umschau* **62**: 495-500.
- [7] **von Stebut E, Udey MC** (2004). Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* **6**: 1102-1109.
- [8] **David CV, Craft N** (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* **22**: 491-502.
- [9] **Kaye P, Scott P** (2011). Leishmaniasis: complexity at the host pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* **9**: 604-615.
- [10] **Mauël J** (2002). Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **2**: 201-226.
- [11] **Sacks D, Noben-Trauth N** (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* **2**: 845-858.
- [12] **Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG** (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577.
- [13] **Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Kaushal H, Lezama-Davila C, Salotra P, Satoskar AR** (2011). A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. *Am J Trop Med Hyg* **85**: 64-65.
- [14] **Soni P, Prasad N, Khandelwal K, Ghiya BC, Mehta RD, Bumb RA, Salotra P** (2011). Unresponsive cutaneous leishmaniasis and HIV co-infection: report of three cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **77**: 251.
- [15] **World Health Organization** (2013). Map, Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012, [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_CL\\_2013.png?ua=1](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png?ua=1)

- [16] **Kumar R, Engwerda C** (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology* **3**: e13.
- [17] **Melchionda F, Varani S, Carfagnini F, Belotti T, Di Muccio T, Tigani R, Bergamaschi R, Pession A** (2014). Spleen nodules: a potential hallmark of Visceral Leishmaniasis in young children. *BMC Infect Dis* **14**: 620.
- [18] **Herwaldt BL** (1999). Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199.
- [19] **Handman E** (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **14**: 229-243.
- [20] **El Hassan AM, Khalil EA** (2001). Post-kala-azar dermal leishmaniasis: does it play a role in the transmission of *Leishmania donovani* in the Sudan? *Trop Med Int Health* **6**: 743-744.
- [21] **Desjeux P** (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 239-243.
- [22] **Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J** (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**: 334-359.
- [23] **Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M** (1993). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**: 94-96.
- [24] **Berhe N, Wolday D, Hailu A, Abraham Y, Ali A, Gebre-Michael T, Desjeux P, Sönnnerborg A, Akuffo H, Britton S** (1999). HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS* **13**: 1921-1925.
- [25] **Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Britton S** (1999). *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today* **15**: 182-187.
- [26] **Wolday D, Akuffo H, Demissie A, Britton S** (1999). Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4<sup>+</sup> T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun* **67**: 5258-5264.
- [27] **Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, Bellas C, Perez-Corral F, Alvar J** (1998). Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* **58**: 436-443.
- [28] **Warburg A, Schlein Y** (1986). The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* **35**: 926-930.
- [29] **Mosser DM, Edelson PJ** (1985). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* **135**: 2785-2789.
- [30] **Reiner SL, Locksley RM** (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**: 151-177.

- [31] **Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM** (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* **155**: 3102-3111.
- [32] **von Stebut E** (2007). Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* **16**: 340-346.
- [33] **von Stebut E** (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* **17**: 115-122.
- [34] **Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D** (2000). A 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. *J Immunol* **165**: 969-977.
- [35] **Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD** (1988). Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun* **56**: 336-342.
- [36] **Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM** (1994). *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4<sup>+</sup> T cells during initiation of infection. *J Exp Med* **179**: 447-456.
- [37] **Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL** (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* **183**: 515-526.
- [38] **Sartori A, Oliveira MA, Scott P, Trinchieri G** (1997). Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J Immunol* **159**: 2849-2857.
- [39] **Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL** (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* **28**:1389-1400.
- [40] **Prina E, Jouanne C, de Souza Lão S, Szabo A, Guillet JG, Antoine JC** (1993). Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol* **151**:2050-2061.
- [41] **Kima PE, Soong L, Chicharro C, Ruddle NH, McMahon-Pratt D** (1996). *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* **26**: 3163-3169.
- [42] **Couret N, Prina E, Mougneau E, Saraiva EM, Sacks DL, Glaichenhaus N, Antoine JC** (1999). Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol* **29**: 762-773.
- [43] **Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L** (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**: 1311-1315.

- [44] **Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E** (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* **203**:177-188.
- [45] **Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E** (2006). Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* **20**: 2460-2467.
- [46] **Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Röllinghoff M, Moll H** (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* **167**: 418-425.
- [47] **von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC** (1998). 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. *J Exp Med* **188**: 1547-1552.
- [48] **Domínguez M, Torano A** (1999). Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med* **189**: 25-35.
- [49] **Ochsenbein AF, Zinkernagel RM** (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* **21**: 624-630.
- [50] **Moll H, Fuchs H, Blank C, Röllinghoff M** (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**:1595-1601.
- [51] **Flohé S, Lang T, Moll H** (1997). Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* **65**: 3444-3450.
- [52] **Flohé SB, Bauer C, Flohé S, Moll H** (1998). Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur J Immunol* **28**: 3800-3811.
- [53] **Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, Kostecki V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK** (1999). Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol* **163**: 3890-3897.
- [54] **von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen BV, Cushing M, Sacks DL, Udey MC** (2000). *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* **30**: 3498-3506.
- [55] **Park AY, Hondowicz BD, Scott P** (2000). IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol* **165**: 896-902.
- [56] **Berberich C, Ramírez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, Moll H** (2003). Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* **170**: 3171-3179.

- [57] **Sato K, Fujita S** (2007). Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* **56**: 183-191.
- [58] **Iezzi G, Fröhlich A, Ernst B, Ampenberger F, Saeland S, Glaichenhaus N, Kopf M** (2006). Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J Immunol* **177**: 1250-1256.
- [59] **Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A** (1997). *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* **186**: 1819-1829.
- [60] **Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D** (2002). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* **168**: 3992-4000.
- [61] **Stenger S, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C** (1994). Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* **180**: 783-793.
- [62] **Li J, Hunter CA, Farrell JP** (1999). Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol* **162**: 974-979.
- [63] **Ramachandra L, Boom WH, Harding CV** (2008). Class II MHC antigen processing in phagosomes. *Methods Mol Biol* **445**: 353-377
- [64] **Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampé R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P** (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**: 1306-1309.
- [65] **Yewdell JW, Bennink JR** (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* **17**: 51-88.
- [66] **den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ** (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J Exp Med* **192**: 1685-1696.
- [67] **Mitchell GF** (1983). Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with *Leishmania tropica major*. *J Immunogenet* **10**: 395-412.
- [68] **Holaday BJ, Sadick MD, Wang ZE, Reiner SL, Heinzel FP, Parslow TG, Locksley RM** (1991). Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. *J Immunol* **147**: 1653-1658.
- [69] **Moll H, Scollay R, Mitchell GF** (1988). Resistance to cutaneous leishmaniasis in nude mice injected with L3T4+ T cells but not with Ly-2+ T cells. *Immunol Cell Biol* **66**: 57-63.
- [70] **Hill JO, Awwad M, North RJ** (1989). Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J Exp Med* **169**: 1819-1827.

- [71] **Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G** (1991). Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* **3**: 587-597.
- [72] **Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M** (1998). Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun* **66**: 3968-3970.
- [73] **Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM** (1991). Production of interferon-gamma, interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7011-7015.
- [74] **Scott P** (1991). IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* **147**: 3149-3155.
- [75] **da Silva Santos C, Brodskyn CI** (2014). The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Public Health* **2**: 165.
- [76] **Herath S, Kropf P, Müller I** (2003). Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol* **25**: 559-567.
- [77] **Zou W, Restifo NP** (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **10**: 248-256.
- [78] **Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A** (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* **168**: 1675-1684.
- [79] **Moll H, Röllinghoff M** (1990). Resistance to murine cutaneous leishmaniasis is mediated by TH1 cells, but disease-promoting CD4<sup>+</sup> cells are different from TH2 cells. *Eur J Immunol* **20**: 2067-2074.
- [80] **Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Röllinghoff M** (1998). The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* **115**: 191-202.
- [81] **Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM** (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* **169**: 59-72.
- [82] **Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL** (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* **194**: 1497-1506.
- [83] **Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL** (2002). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**: 502-507.
- [84] **Belkaid Y** (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* **3**: 875-885.

- [85] **Sacks D, Anderson C** (2004). Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* **201**: 225-238.
- [86] **Scott P** (2005). Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* **7**: 1707-1713.
- [87] **Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T** (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* **165**: 6107-6115.
- [88] **Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C** (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**: 1133-1141.
- [89] **Ghilardi N, Ouyang W** (2007). Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol* **19**: 383-393.
- [90] **Dong C** (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* **8**: 337-348.
- [91] **Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK** (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- [92] **Nylén S, Gautam S** (2010). Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* **2**: 135-146.
- [93] **Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT** (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**: 1123-1132.
- [94] **Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y** (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* **171**: 6173-6177.
- [95] **Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E** (2009). IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* **182**: 3039-3046.
- [96] **Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, de Jesus A, de Almeida RP, da Silva JS** (2014). Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon- $\gamma$  to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *J Infect Dis* pii: jiu531 [Epub ahead of print].
- [97] **Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xénarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA** (1997). IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4<sup>+</sup> T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* **6**: 541-549.
- [98] **Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA** (2001). *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* **19**: 23-45.
- [99] **Vermeulen V** (2006), **Galert T** (überarbeitet 2014) et al., Die Bedeutung des Tierversuchs für die Forschung; Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den

- Biowissenschaften (drze), <http://www.drze.de/im-blickpunkt/tierversuche-in-der-forschung/die-bedeutung-des-tierversuchs-fuer-die-forschung>
- [100] **Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi MD** (1995). The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7804-7808.
- [101] **Zahn S, Kirschsiefen P, Jonuleit H, Steinbrink K, Von Stebut E** (2010). Human primary dendritic cell subsets differ in their IL-12 release in response to *Leishmania major* infection. *Exp Dermatol* **19**: 924-926.
- [102] **Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, von Stebut E** (2011). Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *J Exp Med* **208**: 885-891.
- [103] **Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Netto M, Barral A** (2007). Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 854-859.
- [104] **Díaz YR, Rojas R, Valderrama L, Saravia NG** (2010). T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis* **202**: 406-415.
- [105] **Trujillo CM, Robledo SM, Franco JL, Velez ID, Erb KJ, Patiño PJ** (2002). Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*-Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* **24**: 455-462.
- [106] **Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V** (2009). Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* **70**: 383-390.
- [107] **Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A, Kemp M, Hey A, Christensen CB, Dafalla M, el Kadar AY, el Hassan AM, Theander TG** (1995). Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin Exp Immunol* **100**: 239-245.
- [108] **Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ** (2001). 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. *Infect Immun* **69**: 3232-3239.
- [109] **Geiger B, Wenzel J, Hantschke M, Haase I, Ständer S, von Stebut E** (2010). Resolving lesions in human cutaneous leishmaniasis predominantly harbour chemokine receptor CXCR3-positive T helper 1/T cytotoxic type 1 cells. *Br J Dermatol* **162**: 870-874.
- [110] **Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, Sarrafnejad A, Shahrestani T, Mahboudi F, Khamesipour A** (2010). CD8<sup>+</sup> T cells as a source of IFN- $\gamma$  production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e845.

- [111] **Kolde G, Luger T, Sorg C, Sunderkotter C** (1996). Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology* **192**: 56-60.
- [112] **Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A** (2008). Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* **180**: 6139-6148.
- [113] **Katara GK, Ansari NA, Singh A, Ramesh V, Salotra P** (2012). Evidence for involvement of Th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL). *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1703.
- [114] **Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, Reed SG, Panisko DM, Limmer BL** (1990). Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg* **43**: 464-480.
- [115] **Bommer W, Eibl HJ, Engel KR, Kuhlencord A, Sindermann H, Sundar S, Zappel H** (2004). Leishmaniasis - oral treatment with hexadecylphosphocholine. *Wien Klin Wochenschr* **116**: 24-29.
- [116] **Griewank K, Gazeau C, Eichhorn A, von Stebut E** (2010). Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 652-659.
- [117] **Ramesh V, Katara GK, Verma S, Salotra P** (2011). Miltefosine as an effective choice in the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Br J Dermatol* **165**: 411-414.
- [118] **Chakravarty J, Sundar S** (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* **2**: 167-176.
- [119] **Rama M, Kumar NV, Balaji S** (2015). A comprehensive review of patented antileishmanial agents. *Pharm Pat Anal* **4**: 37-56.
- [120] **Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F** (2005). Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine* **23**: 3642-3648.
- [121] **Souza AE, Bates PA, Coombs GH, Mottram JC** (1994). Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **63**: 213-220.
- [122] **Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasser K, Godal T, Smith PG, Modabber F** (1999). A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* **17**: 466-472.
- [123] **Castés M, Blackwell J, Trujillo D, Formica S, Cabrera M, Zorrilla G, Rodas A, Castellanos PL, Convit J** (1994). Immune response in healthy volunteers vaccinated with killed leishmanial promastigotes plus BCG. I: Skin-test reactivity, T-cell proliferation and interferon-gamma production. *Vaccine* **12**: 1041-1051.

- [124] **Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S, Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Modabber F** (1996). Comparative safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania major* vaccines with or without BCG in human volunteers. *Clin Dermatol* **14**: 489-495.
- [125] **De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça SC** (1999). Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* **17**: 1179-1185.
- [126] **Peters NC, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL** (2009). Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog* **5**: e1000484.
- [127] **Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, 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 JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, 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 DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ** (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436-442.
- [128] **Kronenberg K, Brosch S, Von Stebut E** (2008). Vaccinations against cutaneous *Leishmania* infection. *G Ital Dermatol Venereol* **143**: 125-137.
- [129] **Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG** (1993). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11473-11477.
- [130] **Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP** (1995). Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun* **63**: 4261-4267.
- [131] **Vélez ID, Gilchrist K, Martínez S, Ramírez-Pineda JR, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM** (2009). Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **28**: 329-337.
- [132] **Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, Laughlin EM, Coler RN, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Sundar S, Piazza FM** (2011). A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine* **29**: 3531-3537.

- [133] Nascimento E, Fernandes DF, Vieira EP, Campos-Neto A, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Kahn SJ, Beckmann AM, Pine SO, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM (2010). A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **28**: 6581-6587.
- [134] Llanos-Cuentas A, Calderón W, Cruz M, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Bertholet S, Laughlin EM, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM (2010). A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis. *Vaccine* **28**: 7427-7435.
- [135] Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY (1990). Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* **145**: 2281-2285.
- [136] Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacquet R, Rafati S, Corradin G, Mauël J, Fasel N (1999). The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **18**: 850-859.
- [137] Sjölander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, Handman E (1998). Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine* **16**: 2077-2084.
- [138] Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N (1995). Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* **268**: 563-566.
- [139] Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA (1998). Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med* **4**: 1409-1415.
- [140] Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**: 8427-8432.
- [141] Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG (1998). Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* **66**: 3279-3289.
- [142] Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG (2002). Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* **70**: 2828-2836.
- [143] Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Owendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG (1998). LelF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* **161**: 6171-6179.

- [144] **Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG** (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Infect Immun* **75**: 4648-4654.
- [145] **Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A** (1987). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J Immunol* **139**: 221-227.
- [146] **Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D** (2001). The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* **166**: 5122-5128.
- [147] **Afrin F, Ali N** (1997). Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun* **65**: 2371-2377.
- [148] **Sharma SK, Dube A, Nadeem A, Khan S, Saleem I, Garg R, Mohammad O** (2006). Non PC liposome entrapped promastigote antigens elicit parasite specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell immune response and protect hamsters against visceral leishmaniasis. *Vaccine* **24**: 1800-1810.
- [149] **Firouzmand H, Badiie A, Khamesipour A, Heravi Shargh V, Alavizadeh SH, Abbasi A, Jaafari MR** (2013). Induction of protection against leishmaniasis in susceptible BALB/c mice using simple DOTAP cationic nanoliposomes containing soluble *Leishmania* antigen (SLA). *Acta Trop* **128**: 528-535.
- [150] **Eskandari F, Talesh GA, Parooie M, Jaafari MR, Khamesipour A, Saberi Z, Abbasi A, Badiie A** (2014). Immunoliposomes containing Soluble *Leishmania* Antigens (SLA) as a novel antigen delivery system in murine model of leishmaniasis. *Exp Parasitol* **146**: 78-86.
- [151] **Afonso LC, Schariton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P** (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**: 235-137.
- [152] **Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A** (1987). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. *J Immunol* **139**: 3118-3125.
- [153] **Bogdan C, Schröppel K, Lohoff M, Röllinghoff M, Solbach W** (1990). Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* **20**: 2533-2540.
- [154] **Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJ** (1999). Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *J Immunol Methods* **229**: 1-22.
- [155] **Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA** (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* **12**: 442-447.

- [156] **Raker V, Stein J, Montermann E, Maxeiner J, Taube C, Reske-Kunz AB, Sudowe S** (2015). Regulation of IgE production and airway reactivity by CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> regulatory T cells. *Immunobiology* **220**: 490-499.
- [157] **Brosch S, Dietze-Schwonberg K, Lopez Kostka S, Lorenz B, Haak S, Becher B, von Stebut E** (2015). Disease control in cutaneous leishmaniasis is independent of IL-22. *J Invest Dermatol* **135**: 308-311.
- [158] **Hezarjaribi HZ, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z** (2014). Evaluation of protective effect of IL-22 and IL-12 on cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Asian Pac J Trop Med* **7**: 940-945.
- [159] **Jansohn M & Rothhämel S (Hrsg.)**. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. **5.**, neu bearb., akt. u. erw. Aufl. 2012, XXIII, 660 S.
- [160] **Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH** (2000). A novel transcription factor, **T-bet**, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**: 655-669.
- [161] **Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M** (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* **39**: 839-847.
- [162] **Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, Würtele M, de Carvalho LM, Carmona e Ferreira R, Mortara RA, Barbiéri CL, Mieczkowski P, da Silveira JF, Briones MR, Pereira GA, Bahia D** (2013). The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res* **20**: 567-581.
- [163] **Satheesh Kumar S., Gokulasuriyan RK, Ghosh M** (2014). Comparative *in-silico* genome analysis of *Leishmania (Leishmania) donovani*: A step towards its species specificity. *Meta Gene* **2**: 782-798.
- [164] **Michalovich D, Overington J, Fagan R** (2002). Protein sequence analysis in silico: application of structure-based bioinformatics to genomic initiatives. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 574-580.
- [165] **Seyed N, Zahedifard F, Safaiyan S, Gholami E, Doustdari F, Azadmanesh K, Mirzaei M, Saeedi Eslami N, Khadem Sadegh A, Eslami Far A, Sharifi I, Rafati S** (2011). In silico analysis of six known *Leishmania major* antigens and in vitro evaluation of specific epitopes eliciting HLA-A2 restricted CD8 T cell response. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1295.
- [166] **Kleemann P, Distler E, Wagner EM, Thomas S, Klobuch S, Aue S, Schnürer E, Schild H, Theobald M, Plachter B, Tenzer S, Meyer RG, Herr W** (2012). Varicella-zoster virus glycoproteins B and E are major targets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells reconstituting during zoster after allogeneic transplantation. *Haematologica* **97**: 874-882.

- [167] **Wieser R, Golecki JR, Brunner G** (1981). Isolation of surface lectins of GH3 cells from whole cells and isolated plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **648**: 275-283.
- [168] **Gupta RK, Silver HK, Reisfeld RA, Morton DL** (1979). Isolation and immunochemical characterization of antibodies from the sera of cancer patients which are reactive against human melanoma cell membranes by affinity chromatography. *Cancer Res* **39**: 1683-1695.
- [169] **Kerblat I, Tongiani-Dahshan S, Aude-Garcia C, Villiers M, Drouet C, Marche PN** (2000). Tetanus toxin L chain is processed by major histocompatibility complex class I and class II pathways and recognized by CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Immunology* **100**: 178-184.
- [170] **Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL** (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-1468.
- [171] **Wang B, Merva M, Dang K, Ugen KE, Williams WV, Weiner DB** (1995). Immunization by direct DNA inoculation induces rejection of tumor cell challenge. *Hum Gene Ther* **6**: 407-418.
- [172] **Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY** (1998). DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol* **72**: 191-200.
- [173] **Alam K, Moinuddin, Jabeen S** (2007). Immunogenicity of mitochondrial DNA modified by hydroxyl radical. *Cell Immunol* **247**: 12-17.
- [174] **Guan G, Wang H, Liang W, Cao C, Tao L, Naseem S, Konopka JB, Wang Y, Huang G** (2015). The mitochondrial protein Mcu1 plays important roles in carbon source utilization, filamentation, and virulence in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* pii: S1087-1845(15) 00009-2 [Epub ahead of print].
- [175] **Añez-Rojas N, García-Lugo P, Crisante G, Rojas A, Añez N** (2006). Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **97**: 140-145.
- [176] **Rojas A, García-Lugo P, Crisante G, Añez-Rojas N, Añez N** (2008). Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored membrane proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop* **105**: 139-144.
- [177] **Mulczyk M, Adamus G, Witkowska D, Romanowska E** (1981). Studies on virulence of *Shigella flexneri*. Protective effect of outer membrane proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **29**: 85-90.
- [178] **Romero-Saavedra F, Laverde D, Wobser D, Michaux C, Budin-Verneuil A, Bernay B, Benachour A, Hartke A, Huebner J** (2014). Identification of peptidoglycan-associated proteins as vaccine candidates for enterococcal infections. *PLoS One* **9**: e111880.
- [179] **Handman E, Mitchell GF** (1985). Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5910-5914.

- [180] **Mitchell GF, Handman E** (1986). The glycoconjugate derived from a *Leishmania major* receptor for macrophages is a suppressogenic, disease-promoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* **8**: 255-263.
- [181] **James SL, Pearce EJ, Sher A** (1985). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. I. Partial characterization of antigens recognized by antibodies from mice immunized with soluble schistosome extracts. *J Immunol* **134**: 3432-3438.
- [182] **Lockey TD, Slobod KS, Caver TE, D'Costa S, Owens RJ, McClure HM, Compans RW, Hurwitz JL** (2000). Multi-envelope HIV vaccine safety and immunogenicity in small animals and chimpanzees. *Immunol Res* **21**: 7-21.
- [183] **Iborra S, Parody N, Abánades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, Barral-Netto M, Alonso C, Soto M** (2008). Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect* **10**: 1133-1141.
- [184] **Bertholet S, Goto Y, Carter L, Bhatia A, Howard RF, Carter D, Coler RN, Vedvick TS, Reed SG** (2009). Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* **27**: 7036-7045.
- [185] **Schwonberg K**. Identifizierung von neuen Peptidkandidaten für die Impfstoff-Entwicklung gegen die murine kutane Leishmaniasis. *Dissertation* (2013).
- [186] **Falk J**. D-Aminosäuren-substituierte Peptidepitope induzieren T-Zell-Toleranz *in vivo*. *Dissertation* (2003).
- [187] **Kyburz D, Aichele P, Speiser DE, Hengartner H, Zinkernagel RM, Pircher H** (1993). T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur J Immunol* **23**: 1956-1962.
- [188] **Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK** (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction *in vivo*. *Immunity* **1**: 327-339.
- [189] **Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Gefter ML, Kamradt T** (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* **26**: 130-135.
- [190] **Murphy K**. Janeway's Immunobiology. 8th Edition. *Garland Science* (2012).
- [191] **Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B** (2009). Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci* **98**: 1278-1316.
- [192] **Ramírez L, Santos DM, Souza AP, Coelho EA, Barral A, Alonso C, Escutia MR, Bonay P, de Oliveira CI, Soto M** (2013). 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 leishmaniasis. *Vaccine* **31**: 1312-1319.
- [193] **Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB** (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA *via* species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9237-9242.

- [194] **Wagner H** (2001). Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* **14**: 499-502.
- [195] **Brodszyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M** (2003). Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* **2**: 705-717.
- [196] **Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu CY, Kirman JR, Turon TN, Davey DF, Davis H, Klinman DM, Coler RN, Sacks DL, Seder RA** (2002). Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* **195**: 1565-1573.
- [197] **Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA** (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* **186**: 1137-1147.
- [198] **Agallou M, Athanasiou E, Koutsoni O, Dotsika E, Karagouni E** (2014). Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known *Leishmania infantum* Proteins. *Front Immunol* **5**: 268.
- [199] **De Clercq E, Nuwer MR, Merigan TC** (1970). Potentiating Effect of Freund's Adjuvant on Interferon Production by Endotoxin or Poly rI\*Poly rC. *Infect Immun* **2**: 69-76.
- [200] **Niedergang F, Hémar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A** (1995). The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem* **270**: 12839-12845.
- [201] **Autenrieth SE, Autenrieth IB** (2009). Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* **127**: 523-529.
- [202] **Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C** (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* **176**: 6770-6776.
- [203] **Melby PC, Sacks DL** (1989). Identification of antigens recognized by T cells in human leishmaniasis: analysis of T-cell clones by immunoblotting. *Infect Immun* **57**: 2971-2976.
- [204] **Rafati S, Baba AA, Bakhshayesh M, Vafa M** (2000). Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin Exp Immunol* **120**: 134-138.
- [205] **Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J** (2001). *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* **69**: 4719-4725.
- [206] **Kelly BL, Stetson DB, Locksley RM** (2003). *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med* **198**: 1689-1698.
- [207] **Gonzalez-Aseguinolaza G, Taladriz S, Marquet A, Larraga V** (1999). Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* **259**: 909-916.

- [208] **Yao C, Donelson JE, Wilson ME** (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 1-16.
- [209] **Forget G, Gregory DJ, Olivier M** (2005). Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **280**: 30542-30549.
- [210] **Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M** (2008). A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania infection*: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* **38**: 1071-1081.
- [211] **Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, Luxenburg R, Rosenfeld A, Colina R, McMaster RW, Olivier M, Costa-Mattioli M, Sonenberg N** (2011). *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe* **9**: 331-341.
- [212] **Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M** (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. *PLoS One* **15**: e95007.
- [213] **Murray PJ, Spithill TW, Handman E** (1989). The PSA-2 glycoprotein complex of *Leishmania major* is a glycosylphosphatidylinositol-linked promastigote surface antigen. *J Immunol* **143**: 4221-4226.
- [214] **Symons FM, Murray PJ, Ji H, Simpson RJ, Osborn AH, Cappai R, Handman E** (1994). Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* **67**: 103-113.
- [215] **McMahon-Pratt D, Traub-Cseko Y, Lohman KL, Rogers DD, Beverley SM** (1992). Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Mol Biochem Parasitol* **50**:151-160.
- [216] **Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG** (1996). Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* **157**: 5034-5041.
- [217] **Wenzel UA, Bank E, Florian C, Förster S, Zimara N, Steinacker J, Klinger M, Reiling N, Ritter U, van Zandbergen G** (2012). *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *FASEB J* **26**: 29-39.
- [218] **Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, Reed SG** (1995). A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* **181**: 1527-1537.
- [219] **Jaafari MR, Badiie A, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, Barkhordari F, McMaster WR, Mahboudi F** (2007). The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. *Vaccine* **25**: 6107-6117.
- [220] **Mölle K**. Vakzinierung gegen die murine kutane Leishmaniose mit TAT-LACK transduzierten dendritischen Zellen. *Dissertation* (2006).

- [221] **Kronenberg K, Brosch S, Butsch F, Tada Y, Shibagaki N, Udey MC, von Stebut E** (2010). Vaccination with TAT-antigen fusion protein induces protective, CD8(+) T cell-mediated immunity against *Leishmania major*. *J Invest Dermatol* **130**: 2602-2610.
- [222] **Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y, Matsumoto Y** (2010). Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from *Leishmania major* infection. *Vaccine* **28**: 2207-2213.
- [223] **Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D** (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**: 1351-1354.
- [224] **de Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M** (2009). Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitol Int* **58**: 319-324.
- [225] **Peters NC, Bertholet S, Lawyer PG, Charmoy M, Romano A, Ribeiro-Gomes FL, Stamper LW, Sacks DL** (2012). Evaluation of recombinant *Leishmania* polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* **189**: 4832-4841.
- [226] **Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ** (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* **101**: 226-230.
- [227] **Ghosh AK, Dasgupta S, Ghose AC** (1995). Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**: 291-296.
- [228] **Isaza DM, Restrepo M, Restrepo R, Caceres-Dittmar G, Tapia FJ** (1996). Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* **55**: 365-369.
- [229] **Dudda JC, Simon JC, Martin S** (2004). Dendritic cell immunization route determines CD8<sup>+</sup> T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol* **172**: 857-863.
- [230] **Dudda JC, Martin SF** (2004). Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments. *Trends Immunol* **25**: 417-421.
- [231] **Siewert C, Menning A, Dudda J, Siegmund K, Lauer U, Floess S, Campbell DJ, Hamann A, Huehn J** (2007). Induction of organ-selective CD4<sup>+</sup> regulatory T cell homing. *Eur J Immunol* **37**: 978-989.
- [232] **Ghose AC, Haldar JP, Pal SC, Mishra BP, Mishra KK** (1980). Serological investigations on Indian kala-azar. *Clin Exp Immunol* **40**: 318-326.
- [233] **Evans TG, Smith D, Pearson RD** (1990). Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J Parasitol* **76**: 212-217.
- [234] **Rachamim N, Jaffe CL** (1993). Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol* **150**: 2322-2331.

- [235] **Kautz-Neu K, Kostka SL, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E** (2011). A role for leukocyte-derived IL-1RA in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* **131**: 1650-1659.
- [236] **Von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Moelle K, Knop J, Sunderkotter C, Udey MC** (2003). Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* **198**: 191-199.
- [237] **Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG** (1997). A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today* **13**: 80-82.
- [238] **Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ** (2006). Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* **5**:144-156.
- [239] **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- [240] **Nestle M, Roberts WK** (1969). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J Biol Chem* **244**: 5213-5218.
- [241] **Adkins S, Burmeister M** (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* **240**: 17-23
- [242] **Waring MJ** (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**: 269-282.
- [243] **Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y** (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**: 7847-7851.
- [244] **Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R** (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* **143**: 1283-1289.
- [245] **Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y** (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261**: 11398-1403.
- [246] **Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y** (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**: 18545-1852.
- [247] **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-41.

## **9. Danksagung**

## **10. Publikationen und Präsentationen**





## **11. Lebenslauf**

