

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Direktor: Prof. Dr. Michael Lohoff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Entwicklung einer verbesserten Serodiagnostik und Untersuchung  
der Eignung eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung der  
Viszeralen Leishmaniose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Rouzbeh Mahdavi**

aus Teheran, Iran

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 08.12.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. U. Steinhoff

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Schnare

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	V
TABELLENVERZEICHNIS .....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DIE LEISHMANIOSE – EINE SAMMLUNG PARASITÄRER INFektionsKRANKHEITEN .....	1
1.2 DIE TAXONOMIE VON LEISHMANIEN .....	2
1.3 DIE KLINISCHEN FORMEN DER LEISHMANIOSE.....	3
1.3.1 <i>Die Kutane Leish maniose</i> .....	3
1.3.2 <i>Die Mukokutane Leish maniose</i> .....	3
1.3.3 <i>Die Viszerale Leish maniose</i> .....	4
1.3.4 <i>Die Post-Kala-Azar dermale Leish maniose</i> .....	4
1.4 DER HUND ALS NATÜRLICHES LEISHMANIEN-RESERVOIR.....	5
1.5 DIE EPIDEMIOLOGIE DER LEISHMANIOSEN.....	6
1.6 DIE TRANSMISSION UND DER ENTWICKLUNGSZYKLUS VON LEISHMANIEN .....	9
1.7 DIE DIAGNOSE DER VISZERALEN LEISHMANIOSE .....	10
1.7.1 <i>Parasitologische Diagnostik</i> .....	11
1.7.2 <i>Molekulare Diagnostik</i> .....	11
1.7.3 <i>Immunologische Diagnostik</i> .....	11
1.8 KINESINE ALS BIOMARKER FÜR DIE SERODIAGNOSTIK DER VISZERALEN LEISHMANIOSE .....	14
1.8.1 <i>Tandem-Repeat-Proteine</i> .....	14
1.8.2 <i>Kinesine</i> .....	15
1.8.3 <i>Rekombinante Kinesin-Antigene</i> .....	16
1.9 DIE BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN DER VISZERALEN LEISHMANIOSE .....	17
1.9.1 <i>Fünfwertige Antimonpräparate</i> .....	17
1.9.2 <i>Paromomycin</i> .....	18
1.9.3 <i>Pentamidin</i> .....	18
1.9.4 <i>Amphotericin B</i> .....	19
1.9.5 <i>Miltefosine</i> .....	19
1.10 NEUE ZIELSTRUKTUR UND WIRKSTOFF ZUR BEHANDLUNG DER LEISHMANIOSE .....	21
1.10.1 <i>Das Ubiquitin-Proteasom-System</i> .....	21
1.10.2 <i>Die Rolle des Proteasoms in Leishmanien</i> .....	23
1.10.3 <i>Der Proteasominhibitor GNF-6702</i> .....	25
1.11 ZIEL DER ARBEIT .....	27

1.1.1.1	<i>Entwicklung einer verbesserten Serodiagnostik</i>	27
1.1.1.2	<i>Eignung von Proteasom-Inhibitoren zur Behandlung der Viszeralen Leishmaniose</i>	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>28</b>
2.1	MATERIAL	28
2.1.1	<i>Geräte</i>	28
2.1.2	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	29
2.1.3	<i>Kits</i>	30
2.1.4	<i>Enzyme</i>	31
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen</i>	31
2.1.6	<i>Nährmedien</i>	33
2.1.7	<i>Stammlösungen und Testsubstanzen</i>	34
2.1.8	<i>Standards</i>	34
2.1.9	<i>Vektoren</i>	35
2.1.10	<i>Primer</i>	35
2.1.11	<i>Antikörper</i>	36
2.1.12	<i>Leishmanien-Stämme</i>	36
2.1.13	<i>Bakterien-Stämme</i>	36
2.1.14	<i>Referenzsequenzen aus der Datenbank</i>	37
2.1.15	<i>Software und Programme</i>	37
2.1.16	<i>Seren</i>	38
2.1.17	<i>Kommerzielle rekombinante Antigene und serologische Tests</i>	40
2.2	METHODEN	42
2.2.1	<i>Kultivierung der Leishmanien</i>	42
2.2.2	<i>Isolation genomischer DNA</i>	43
2.2.3	<i>Bioinformatische Analyse von linearen B-Zell-Epitopen</i>	43
2.2.4	<i>Kinesin-Sequenzanalyse von Parasitenisolaten</i>	44
2.2.5	<i>Molekulare Klonierung des KLi8.3-Gens</i>	44
2.2.6	<i>Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins rKLi8.3 in E. coli</i>	45
2.2.7	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse</i>	45
2.2.8	<i>ELISA-Entwicklung für den Nachweis von Leishmania-spezifischen Antikörpern in Menschen und Hunden</i>	46
2.2.9	<i>Statistische Analyse</i>	47
2.2.10	<i>Entwicklung und Evaluierung eines ELISA-Prototyps</i>	48
2.2.11	<i>Entwicklung und Evaluierung eines Lateral Flow Test-Prototyps</i>	49
2.2.12	<i>Entwicklung und Evaluierung eines Leishmania Lineblot-Prototyps</i>	50
2.2.13	<i>Klonierung und Sequenzierung der proteasomalen 64- und 65-Untereinheiten</i>	52
2.2.14	<i>Messung der Proteasomaktivität</i>	52

2.2.15	<i>Verdünnung der Testsubstanzen</i> .....	53
2.2.16	<i>Vitalitätsstudien mittels CellTiter Glo-Assay</i> .....	53
2.2.17	<i>Parasite-Rescue-Transformation-Assay</i> .....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>57</b>
3.1	ENTWICKLUNG EINER HOCHSENSITIVEN UND SPEZIFISCHEN SERODIAGNOSTIK FÜR VISZERALE LEISHMANIOSE.....	57
3.1.1	<i>Variabilität des Kinesins in Leishmanien</i> .....	57
3.1.2	<i>Bioinformatische Vorhersage linearer B-Zell-Epitope</i> .....	58
3.1.3	<i>Identifizierung und Charakterisierung von KLi8.3</i> .....	59
3.1.4	<i>Analyse der Tandem-Repeats des Kinesin-Proteins rKLi8.3</i> .....	61
3.1.5	<i>Expression, Aufreinigung und Reaktivität von rKLi8.3</i> .....	63
3.1.6	<i>Etablierung des indirekten IgG-ELISA zum Nachweis von VL Antikörpern</i> .....	64
3.1.7	<i>Analyse der Tandem-Repeats in verschiedenen Leishmania Isolaten</i> .....	65
3.1.8	<i>Diagnostische Leistung verschiedener Antigene in Sudan und Indien</i> .....	67
3.1.9	<i>Vergleich kommerzieller ELISAs mit dem rKLi8.3-Prototyp-ELISA</i> .....	70
3.1.10	<i>Evaluierung des rKLi8.3-basierten Lateral Flow Test</i> .....	71
3.2	DIAGNOSTIK DER VISZERALEN LEISHMANIOSE BEI HUNDEN .....	72
3.3	UNTERSUCHUNG EINES NEUEN PROTEASOM-INHIBITORS ZUR BEHANDLUNG DER VISZERALEN LEISHMANIOSE.....	73
3.3.1	<i>Sequenzanalyse des Proteasoms</i> .....	73
3.3.2	<i>Sequenzalignment der <math>\beta</math>4-Untereinheiten</i> .....	74
3.3.3	<i>Sequenzalignment der <math>\beta</math>5-Untereinheiten</i> .....	74
3.3.4	<i>Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf die Lebensfähigkeit von Promastigoten</i> .....	77
3.3.5	<i>Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf a mastigote Leishmanien</i> .....	78
3.3.6	<i>Toxizität des Inhibitors auf humane Wirtszellen (THP-1)</i> .....	80
3.3.7	<i>Parasite-Rescue-Transformation-Assay</i> .....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>84</b>
4.1	DIAGNOSTIK DER VISZERALEN LEISHMANIOSE.....	84
4.1.1	<i>Einfluss der Tandem-Repeat-Anzahl und der Sequenzvariationen des Kinesins auf die Antigenität</i> .....	84
4.1.2	<i>Amplifikation und Expression von Tandem-Repeat-Sequenzen</i> .....	86
4.1.3	<i>Leistung von serodiagnostischen Tests im Sudan und Indien</i> .....	87
4.1.4	<i>Einfluss von Koinfektionen auf die diagnostische Leistung kommerzieller ELISA-Kits im Vergleich zu dem rKLi8.3-Prototyp-ELISA</i> .....	88
4.1.5	<i>Eignung des rKLi8.3-ELISA für die Serodiagnose von VL bei Hunden (CVL)</i> .....	90
4.2	UNTERSUCHUNG ZUR EIGNUNG EINES PROTEASOM-INHIBITORS ZUR BEHANDLUNG DER VISZERALEN LEISHMANIOSE ..	90
4.2.1	<i>Sequenzanalyse des Proteasomaler Untereinheiten</i> .....	91
4.2.2	<i>Untersuchungen zu m Einfluss von Inhibitoren auf eine humane Zelllinie</i> .....	92
4.2.3	<i>Einfluss von Inhibitoren auf die Vitalität intrazellulärer Leishmanien</i> .....	93

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>114</b>
8.1	KINESIN SEQUENZEN .....	114
8.1.1	<i>DNA-Sequenz von KLi8.3 (L. infantum) .....</i>	<i>114</i>
8.1.2	<i>Basensequenzen von rekombinatem 6xhis-KLi8.3 (L. infantum) .....</i>	<i>114</i>
8.1.3	<i>Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi8.3 (L. infantum) .....</i>	<i>114</i>
8.1.4	<i>Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi6.3 (L. infantum) .....</i>	<i>114</i>
8.1.5	<i>Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi7.3 (L. infantum) .....</i>	<i>115</i>
8.1.6	<i>Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi8.3 (L. donovani) .....</i>	<i>115</i>
8.1.7	<i>Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi8.3 (L. archibaldi) .....</i>	<i>115</i>
8.2	SEQUENZEN PROTEASOMALER B4 UND B5-UNTEREINHEITEN VON LEISHMANIEN .....	115
8.2.1	<i>Basensequenzen der B4-Untereinheiten .....</i>	<i>115</i>
8.2.2	<i>Basensequenzen der B5-Untereinheiten .....</i>	<i>118</i>
8.3	PROTEASOMALE AKTIVITÄT NACH INHIBITORBEHANDLUNG .....	121
8.3.1	<i>Abbildungen des Proteasomaktivitäts-Assays .....</i>	<i>121</i>
8.4	EINFLUSS VON LEISHMANIZIDEN WIRKSTOFFEN AUF PROMASTIGOTE ERREGER .....	122
8.4.1	<i>Zusätzliche Abbildungen des CellTiter Glo-Assays .....</i>	<i>122</i>
8.5	EINFLUSS VON LEISHMANIZIDEN WIRKSTOFFEN AUF AMASTIGOTE LEISHMANIEN .....	125
8.5.1	<i>Zusätzliche Abbildungen des CellTiter Glo-Assays .....</i>	<i>125</i>
8.6	EINFLUSS VON DMSO AUF LEISHMANIEN UND THP1 .....	127
8.7	EIGENE PUBLIKATIONEN .....	128
8.7.1	<i>Abstracts .....</i>	<i>128</i>
8.7.2	<i>Patent .....</i>	<i>128</i>
8.7.3	<i>Die Entwicklung von Prototypen für ELISA, Lineblot und Lateral-Flow-Tests .....</i>	<i>129</i>
8.7.4	<i>Finanzierung .....</i>	<i>129</i>
8.8	LEBENS LAUF .....	130
8.9	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....	131
8.10	DANKSAGUNG .....	132
8.11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	133

## Abkürzungsverzeichnis

AFB	Acid Fast Bacilli
Amp B	Amphotericin B
AS	Aminosäure
AUC	Area Under Curve
AuNP	kolloidaler Goldnanopartikel
CVL	Canine Viszerale Leishmaniose
DAT	direkter Agglutinationstest
DEV	diagnostische Effizienz
EC	endemische Kontrolle
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FN	falsch negativ
FT	falsch positiv
gDNA	genomische DNA
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICT	immunchromatographischer Test
IFAT	indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Test
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KAtex	Latex-Agglutinationstest
KL	Kutane Leishmaniose
KP	Kernpartikel
L.	<i>Leishmania</i>
LFT	Lateral Flow Test
MA	Malaria
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
MKL	Mukokutane Leishmaniose
NEC	nicht-endemische Kontrolle
NPV	negative prädikativer Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKDL	Post-Kala-Azar dermale Leishmaniose

PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
POC	Point of Care
PPV	positive prädikativer Wert
PTR1	Pteridin-Reduktase 1
ROC	Receiver Operating Characteristics
RT	Raumtemperatur
RP	Regulationspartikel
Sb	Antimon
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SD	Standardabweichung
spp.	<i>species pluralis</i> (mehrere nicht im Einzelnen genannte Spezies)
T.	<i>Trypanosoma</i>
TB	Tuberkulose
TMB	Tetramethylbenzidin
TN	korrekt negativ
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TP	korrekt positiv
TR	Tandem-Repeat
TX	Toxoplasmose
UE	Untereinheit
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VL	Viszerale Leishmaniose



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Etablierte Behandlungsmethoden der Viszeralen Leishmaniose .....	20
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Hersteller .....	28
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....	29
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Molekularbiologischen Kits.....	30
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Enzyme .....	31
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen .....	31
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Nährmedien .....	33
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Stammlösungen und Testsubstanzen.....	34
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Längen- und Molekulargewichtsstandards .....	34
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Vektoren .....	35
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primer .....	35
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörper .....	36
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Leishmanien-Stämme .....	36
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Bakterien-Stämme.....	36
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Referenzsequenzen aus der Datenbank .....	37
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Software und Programme .....	37
Tabelle 17: Herkunft, Anzahl und Charakterisierung der Humanserumproben .....	38
Tabelle 18: Anzahl der Humanserumproben.....	39
Tabelle 19: Anzahl und Charakterisierung der Hundeserumproben aus Kroatien .....	40
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Antigene und serologischen Tests.....	41
Tabelle 21: Mastermix für den PCR-Ansatz der $\beta$ 4- und $\beta$ 5-Untereinheiten .....	52
Tabelle 22: Diversität der Aminosäuren innerhalb der Kinesin-Repeats bei ostafrikanischen <i>L. donovani</i> -, <i>L. archibaldi</i> - und <i>L. infantum</i> -Stämmen im Vergleich zu rK39 <i>L. chagasi</i> (Brasilien), KE16 <i>L. donovani</i> (Indien) und KLO8 <i>L. donovani</i> (Sudan) .....	58
Tabelle 23: Eigenschaften der Kinesin-Tandem-Repeats von <i>Leishmania</i> .....	62
Tabelle 24: Diagnostische Leistung der rKLi6.3-, rKLi7.3- und rKLi8.3-ELISAs für VL-Seren aus Sudan .....	66
Tabelle 25: Diversität der Aminosäuren innerhalb der Kinesin-TRs von rKLi8.3, rKLd8.3 und rKLa8.3 .....	66

Tabelle 26: Diagnostisches Potential des rKLd8.3-, rKLa8.3- und rKLi8.3-ELISAs für VL im Sudan. ....	67
Tabelle 27: Diagnostisches Potential des rK39-, rKLO8- und rKLi8.3-ELISAs für VL im Sudan .....	68
Tabelle 28: Diagnostisches Potential der rK39-, rKLO8- und rKLi8.3-ELISAs für VL in Indien .....	69
Tabelle 29: Diagnostisches Potential des TECAN-, NovaLisa- und des rKLi8.3-Prototyp-ELISA .....	70
Tabelle 30: Diagnostische Performance der Lateral Flow Tests.....	71
Tabelle 31: Diagnostische Leistung des ELISAs von rK39-, KLO8- und rKLi8.3-Antigenen bei Hunden mit Viszeraler Leishmaniose .....	72
Tabelle 32: Inhibition der Vitalität promastigoter Leishmanien bei 20 µM Wirkstoffkonz. und LogIC <sub>50</sub> .....	78
Tabelle 33: Inhibition der Vitalität Amastigoter Leishmanien bei 20 µM Wirkstoffkonz. und LogIC <sub>50</sub> Werte.....	79
Tabelle 34: Inhibition der Vitalität THP1 bei 20 µM Wirkstoffkonz. und LogIC <sub>50</sub> Werte....	80

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Klassifizierung der Leishmanien .....	2
Abbildung 2: Klinische Symptome der Leishmaniose beim Menschen .....	5
Abbildung 3: Die klinischen Symptome der caninen viszerale Leishmaniose .....	6
Abbildung 4: Die weltweite Verbreitung der Viszerale Leishmaniose .....	7
Abbildung 5: Die weltweite Verbreitung der Kutanen Leishmaniose .....	8
Abbildung 6: Die weltweite Verbreitung der caninen viszerale Leishmaniose .....	8
Abbildung 7: Biphasischer Lebenszyklus von <i>Leishmania spp.</i> .....	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der diagnostischen VL-Antigene.....	17
Abbildung 9: Struktur des konstitutiven Proteasoms und des Immunoproteasoms. ....	23
Abbildung 10: Bindungsstellen von GNF-6702 im Proteasom. ....	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung des ELISA-Prototyps zum Nachweis von VL-Antikörpern mittels rKLi8.3 .....	49
Abbildung 12: Schematische Darstellung des indirekten LFA zum Nachweis von VL-Antikörpern .....	50
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Line blot-Prototyps zum Nachweis von VL-Antikörpern .....	51
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines CellTiter Glo-Assays .	54
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Digital-Image-Analysis-Direct-Counting-Assays und des Parasite-Rescue-Transformation-Assays.....	56
Abbildung 16: Lineare Vorhersage von B-Zell-Epitopen.....	59
Abbildung 17: Amplifikation und Klonierung von <i>KLi8.3</i> .....	61
Abbildung 18: Analyse der Tandem-Repeats von rKLi8.3 .....	62
Abbildung 19: Expression, Aufreinigung und Western-Blot-Analyse des rekombinanten Proteins rKLi8.3.....	63
Abbildung 20: Etablierung des indirekten IgG-ELISAs zum spezifischen Nachweis der Viszerale Leishmaniose.....	64
Abbildung 21: Einfluss von TRs auf die spezifische Antikörperbindung humaner Seren ....	65
Abbildung 22: Bindung von VL-Seren und Kontrollen (Sudan) mit Kinesinantigenen gleicher TR-Anzahl aber unterschiedlicher <i>Leishmania</i> -Stämme .....	67

Abbildung 23: Antikörperreaktion humaner Seren (Sudan) mit unterschiedlichen Kinesinantigenen .....	68
Abbildung 24: Antikörperreaktion humaner Seren (Indien) mit unterschiedlichen Kinesinantigenen .....	69
Abbildung 25: Diagnostische Leistung kommerzieller ELISA-Kits (TECAN, NovaLisa) und des rKLi8.3-Prototyp-ELISAs .....	71
Abbildung 26: Antikörperreaktion von CVL-Hundeseren mit verschiedenen Antigenen ...	73
Abbildung 27: $\beta$ 4- und $\beta$ 5-Amplifikate von <i>Leishmania infantum</i> .....	73
Abbildung 28: Alignment der Aminosäuresequenzen der proteasomalen $\beta$ 4 UE .....	75
Abbildung 29: Alignment der Aminosäuresequenzen der proteasomalen $\beta$ 5 UE .....	76
Abbildung 30: Einfluß von Wirkstoffen auf die Vitalität promastigoter <i>L. donovani</i> .....	77
Abbildung 31: Wirkung verschiedener Testsubstanzen auf die Vitalität amastigoter <i>L. donovani</i> .....	79
Abbildung 32: Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität von THP1 Zellen .....	81
Abbildung 33: Vitalitätsbestimmung nach GNF und ONX-Behandlung durch Transformation amastigoter in promastigote Leishmanien .....	82
Abbildung 34: Fluoreszenzanalyse von <i>L. donovani</i> infizierten THP1-Zellen nach Anfärbung mit Hoechst-Farbstoff .....	83
Abbildung 35: Bestimmung der Vitalität amastigoter Leishmanien durch Fluoreszenzanalyse .....	83
Abbildung 36: Einfluss von Inhibitoren auf die chymotryptische Proteasomaktivität .....	121
Abbildung 37: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität promastigoter <i>L. chagasi</i> .....	122
Abbildung 38: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität promastigoter <i>L. major</i> .....	123
Abbildung 39: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von promastigoten <i>L. major</i> .....	124
Abbildung 40: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten <i>L. chagasi</i> .....	125
Abbildung 41: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten <i>L. infantum</i> .....	126

Abbildung 42: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten <i>L. major</i> .....	127
Abbildung 43: Einfluss von DMSO auf die Vitalität von Leishmanien und THP1.....	127

### 1 Einleitung

#### 1.1 Die Leishmaniose – eine Sammlung parasitärer Infektionskrankheiten

Die Leishmaniose ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch die Protozoen der Gattung *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) ausgelöst und von Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia* übertragen werden. Sie zählt zu den *Neglected Tropical Diseases*. Die Krankheit ist in den tropischen und subtropischen Gebieten weit verbreitet und kommt in 98 Ländern in Europa, Afrika, Asien und Amerika vor (Alvar et al. 2012). Dabei treten jedoch über 90 % der neuen Fälle in nur 13 Ländern auf (Afghanistan, Algerien, Bangladesch, Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Äthiopien, Indien, Iran, Peru, Südsudan, Sudan und Syrien).

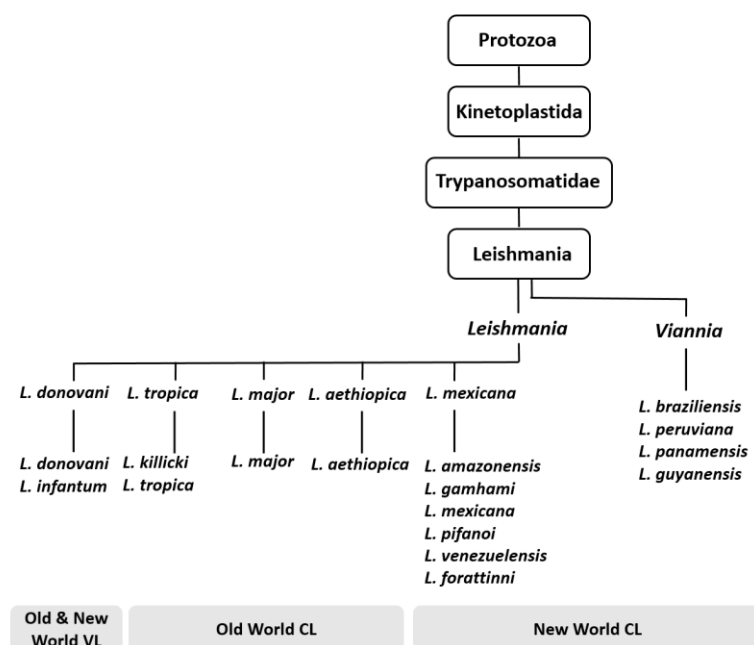
Die Leishmaniose setzt sich aus vier klinischen Hauptformen zusammen. Darunter zählen die Viszerale Leishmaniose (VL), die Kutane Leishmaniose (KL), die Mukokutane Leishmaniose (MKL) und die Post-Kala-Azar dermale Leishmaniose (PKDL). Die häufigste Form stellt die KL dar, während die VL die schwerste Form der Leishmaniosen ist. Unbehandelt führt die VL in über 95 % der Fälle zum Tod des Patienten (WHO 2022).

Alle Patienten, bei denen eine VL diagnostiziert wird, müssen schnell und vollständig behandelt werden. Die meisten VL-Infektionen treten jedoch in Ländern auf, in denen kein leistungsfähiges Gesundheitssystem vorhanden ist. Viele Infizierte haben daher keinen Zugang zu einer effizienten Diagnose bzw. Behandlung und sterben, unentdeckt vom Gesundheitssystem, in ihrer Gemeinde (Reithinger et al. 2007).

Anhand rein klinischer Symptome, die auch bei anderen Krankheiten auftreten, ist die Diagnose der VL oft schwierig. Häufig werden Ko-Infektionen mit Malaria (MA) und anderen parasitären Krankheiten aber auch mit HIV beobachtet (Cavalcanti et al. 2012).

## 1.2 Die Taxonomie von Leishmanien

Die Erreger Leishmanien gehören der Ordnung der Trypanosomatida und der Gattung *Leishmania* (L.) an. Die Gattung *Leishmania* umfasst mehr als 20 Spezies und wird je nach dem Entwicklungsstadium im Vektor, der Sandmücke, in zwei Untergattungen aufgeteilt. Die Untergattung *Viannia* entwickelt sich im Hinterdarm, während sich der Entwicklungsort der Untergattung *Leishmania* im Mittel- und Vorderdarm des Vektors befindet. Die Spezies von *Leishmania* werden auch nach ihrer geografischen Verbreitung in die der Alten Welt (Asien, Afrika und Südeuropa) und die der Neuen Welt (Nord- und Südamerika) eingeteilt. Zu der Untergattung *Viannia* gehören *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis* und *L. guyanensis*. Die Untergattung *Leishmania* kann in fünf Komplexe eingeteilt werden. Diese sind der *L. donovani*-, der *L. tropica*-, der *L. mexicana*-, der *L. major*- und der *L. aethiopica*-Komplex. Zu dem *L. donovani*-Komplex, dem Verursacher der VL, zählen folgende Spezies: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. chagasi* und *L. archibaldi*. Es wird angenommen, dass es sich sowohl bei *L. infantum* und *L. chagasi* als auch bei *L. donovani* und *L. archibaldi* jeweils um Synonyme handelt (Akhoundi et al. 2016; Lukes et al. 2007).



**Abbildung 1: Taxonomische Klassifizierung der Leishmanien.** Abkürzungen: *L.*, *Leishmania*; VL, Viszerale Leishmaniose; CL, Kutane Leishmaniose. Modifiziert nach (Bates 2007; Lukes et al. 2007; Maurício et al. 2000).

### 1.3 Die klinischen Formen der Leishmaniose

Die klinische Manifestation der Leishmanien-Infektion hängt von der Parasitenspezies, die je nach geografischem Gebiet variiert, und der Immunreaktion des Wirts ab. Die Leishmaniose wird in vier klinische Hauptformen unterteilt: die KL, die MKL, die VL und die PKDL (Chappuis et al. 2007).

#### 1.3.1 Die Kutane Leishmaniose

Die KL ist mit jährlich 700 000 bis 1,3 Millionen neuen Fällen die häufigste Form der Leishmaniose. Sie kommt im Mittleren Osten bis nach Indien, in Mittel- und Südamerika und im Mittelmeerraum vor. Die KL wird durch die Komplexe *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* in der Alten Welt und durch *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* und *L. peruviana* in der Neuen Welt verursacht (David and Craft 2009).

Die KL kann je nach Spezies verschiedene Symptome auslösen. In der Alten Welt manifestiert sie sich hauptsächlich durch Hautläsionen, die sich über Wochen und Monate entwickeln. In den meisten Fällen ist die Krankheit selbstlimitierend und die Hautläsionen heilen von selbst aus. Die KL der Neuen Welt ist dagegen oft aggressiver und es bilden sich tiefe Hautläsionen und mehrere Geschwüre, die über Jahre rückständig bleiben können (Masmoudi et al. 2013).

#### 1.3.2 Die Mukokutane Leishmaniose

Die MKL, auch als Espundia bekannt, ist eine eher seltene Form der Erkrankung. Sie kommt am häufigsten in Südamerika vor. Die Erreger der MKL sind in der Alten Welt *L. aethiopica* und in der Neuen Welt *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* und *L. panamensis* (Calvopina et al. 2004).

Die MKL ist durch Geschwüre der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut inklusive der Zerstörung der Nasenscheidewand und des Mund- und Rachenraumes nach vorangehendem Gesichtshautbefall und Erregerausbreitung über die Blut- und Lymphbahn charakterisiert (Casalle et al. 2020).



### 1.3.3 Die Viszerale Leishmaniose

Die VL, auch Kala-Azar („schwarzes Fieber“) oder Dumdum-Fieber genannt, verläuft unbehandelt in über 95 % der Fälle tödlich (Fernández-Arévalo et al. 2020). Sie wird durch Vertreter des *L. donovani*-Komplexes verursacht. Die wichtigsten Erreger der VL sind *L. donovani* und *L. infantum* (Franssen et al. 2020). *L. donovani* ist dabei vor allem auf dem indischen Subkontinent und in Ostafrika verbreitet, während *L. infantum* vorrangig in Europa, Nordafrika und Lateinamerika vorkommt (Ready 2014). Die Inkubationszeit der VL beträgt in der Regel 6 Wochen bis 6 Monate. Der Infektionsverlauf ist sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern identisch (Chappuis et al. 2007).

Das Eintreten der Symptome ist plötzlich, es kommt zu hohem Fieber, Übelkeit, Diarrhö und Husten. In Einzelfällen kann die Krankheit auch langsam mit steigendem Fieber, Appetit- und Gewichtsverlust, Trägheit und Blässe beginnen. Ein Indiz für das Vorliegen einer VL ist in manchen Fällen ein remittierendes Fieber, das zwei mal am Tag mit Temperaturen bis zu 41 °C gipfelt (Mehlhorn 2012). Da eine Mehrzahl an Knochenmarkzellen infiziert wird, entwickeln viele Patienten eine Panzytopenie (d. h. eine verminderte Produktion von roten und weißen Blutkörperchen sowie von Blutplättchen) und eine Immunsuppression, die sie anfällig für Superinfektionen macht (Ready 2014). Im weiteren Verlauf kann es zu einer Milzvergrößerung und unspezifischen B-Zell-Stimulation kommen, die zu einer polyklonalen (IgG und IgM) Hypergammaglobulinämie führt (Kumar and Nylén 2012; Suerbaum et al. 2020). Ko-Infektionen mit anderen Erregern wie *Plasmodium*-Spezies, *Mycobacterium tuberculosis* und HIV führen oft zu einem ungewöhnlichen Krankheitsbild (Beer et al. 1991; van den Bogaart et al. 2012).

### 1.3.4 Die Post-Kala-Azar dermale Leishmaniose

Die PKDL ist durch makulöse, makulo-papulöse oder knotige Hautläsionen charakterisiert und ist eine Komplikation der VL, die häufig im Sudan und seltener in anderen ostafrikanischen Ländern nach der Behandlung auftritt (Zijlstra et al. 2003). Sie kann auch bei immunsupprimierten Personen in *L. infantum*-endemischen Gebieten auftreten. PKDL-Fälle sind hochgradig infektiös, da die knotigen Hautläsionen viele Parasiten enthalten. Diese Patienten sind ein potentielles Reservoir für die epidemischen Zyklen der VL (Addy and Nandy 1992).



**Abbildung 2: Klinische Symptome der Leishmaniose beim Menschen.** A) Kutane Leishmaniose. B) Mukokutane Leishmaniose. C) Viszerale Leishmaniose. D) Post-Kala-Azar dermale Leishmaniose. (Chappuis et al. 2007)

#### 1.4 Der Hund als natürliches Leishmanien-Reservoir

Der Hund ist das Hauptreservoir für die Leishmanien-Infektion des Menschen (Baneth et al. 2008). Die Canine Viszerale Leishmaniose (CVL) wird im Mittelmeerraum vor allem durch *L. infantum* und in Süd- und Mittelamerika durch *L. chagasi* verursacht (Dantas-Torres 2007). Die CVL ist eine multisystemische Erkrankung. Da eine Vielzahl von Organsysteme betroffen ist und unterschiedliche Immunreaktionen und pathologische Mechanismen involviert sein können, sind die klinischen Symptome sehr variabel. Es kommt unter anderem zu entzündlichen Augenerkrankungen, Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Vergrößerung der Milz und der Lymphknoten, Geschwüre an Haut und Schleimhäuten, Fieber, neurologischen Störungen, Gewichtsverlust, Polyurie und Polydipsie und Muskelatrophien. Infizierte Hunde können jedoch auch asymptomatisch bleiben (Blavier et al. 2001; Quinnell and Courtenay 2009).



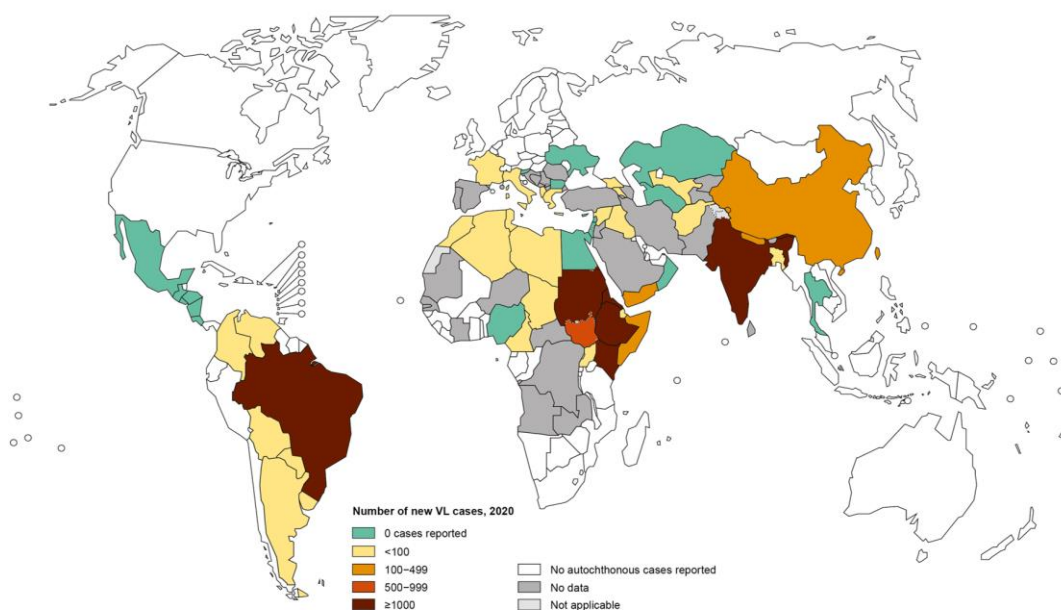
**Abbildung 3: Die klinischen Symptome der caninen viszerale Leishmaniose.** A) Lokalisierte Alopezie. B) Schanker am Ohr. C) Onychogryphose. D) Schanker in der Gesäßregion. (Fujisawa et al. 2021)

## 1.5 Die Epidemiologie der Leishmaniosen

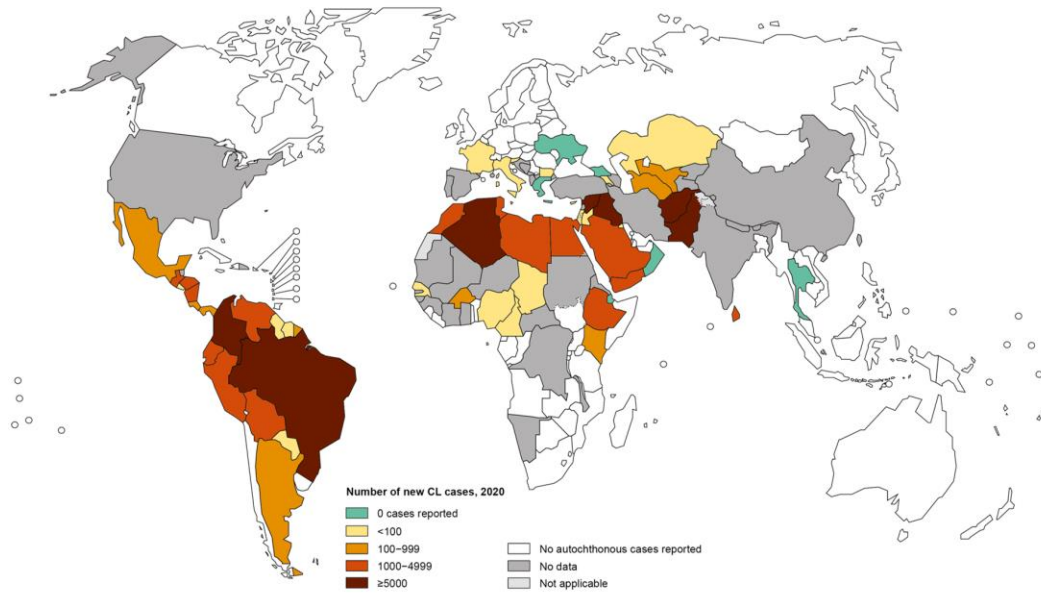
Die Leishmaniose kommt in den meisten tropischen und subtropischen Klimaregionen vor. Die Leishmaniose ist schätzungsweise in 98 tropischen, subtropischen und südeuropäischen Ländern verbreitet, wobei mehr als 350 Millionen Menschen gefährdet sind. Umwelt- und klimabedingte Veränderungen zusammen mit einer zunehmenden globalen Vernetzung fördern die geografische Ausbreitung der Sandmücke und damit auch die Verbreitung der Erkrankung in weitere Länder (Alvar et al. 2012; Georgiadou et al. 2015). Die Krankheit betrifft vor allem die ärmere Bevölkerung in Afrika, Asien und Lateinamerika und steht im Zusammenhang mit Unterernährung, Bevölkerungsmigration, schlechten Wohnverhältnissen, einem schwachen Immunsystem und fehlenden Ressourcen. Mehr als 90 % der weltweiten VL-Fälle treten, wie oben bereits erwähnt, in nur 13 Ländern auf. Die KL ist in Südamerika, dem Mittelmeerraum und Westasien weit verbreitet. Die zehn Länder mit den meisten KL-Fällen, die 75 % der weltweiten Inzidenz ausmachen, sind Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, Costa Rica, Äthiopien, Iran, Peru, Sudan und Syrien (Alvar et al. 2006). Für die KL liegt die Zahl der weltweit jährlichen Neuerkrankungen bei Menschen zwischen 700 000 und 1,3 Millionen. Für die VL zwischen 200 000 und 400 000, wobei nur 25 % bis 45 % der Fälle an die WHO gemeldet werden. Mit

schätzungsweise 12 - 15 Millionen infizierten Personen, 700 000- 1 Million jährlichen Neuerkrankungen und 20 000 – 30 000 jährlichen Todesfällen, fällt die Leishmaniose in die Kategorie der vernachlässigten tropischen Erkrankungen, von höchster Relevanz (WHO 2022).

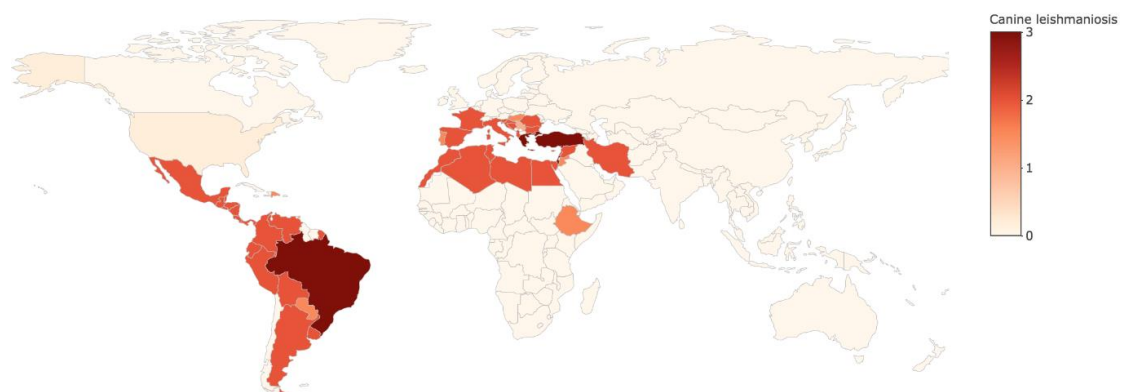
Hunde spielen eine große Rolle bei der Epidemiologie der Leishmaniose. Infizierte Hunde sind das Hauptreservoir für den Erreger und spielen eine Schlüsselrolle bei der Übertragung auf den Menschen (Alvar et al. 2004). Hunde können durch *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. tropica* und *L. peruviana* infiziert werden und sind im Mittelmeerraum, in Afrika, in Asien und in Lateinamerika endemisch. Es wird geschätzt, dass es in Südwesteuropa mindestens 2,5 Millionen infizierte Hunde gibt (Baneth et al. 2008; Inceboz 2019). Durch die Mitnahme von Hunden in klassische Urlaubsländer am Mittelmeer und steigende Importzahlen von Hunden aus Ost- und Südeuropa, entstehen neue endemische Gebiete. Die Zahl der infizierten Hunde in Südamerika wird ebenfalls auf mehrere Millionen geschätzt und in einigen Gebieten Venezuelas und Brasiliens, wo die Prävalenz von infizierten Hunden hoch ist, kommen auch beim Menschen hohe Infektionsraten vor (Werneck et al. 2007).



**Abbildung 4: Die weltweite Verbreitung der Viszeralen Leishmaniose** Die Karte stellt die geografische Verteilung der VL-Neuerkrankungen in der Bevölkerung da. (WHO 2021b)



**Abbildung 5: Die weltweite Verbreitung der Kutanen Leishmaniose** Die Karte stellt die geografische Verteilung der KL-Neuerkrankungen in der Bevölkerung da. (WHO 2021a)



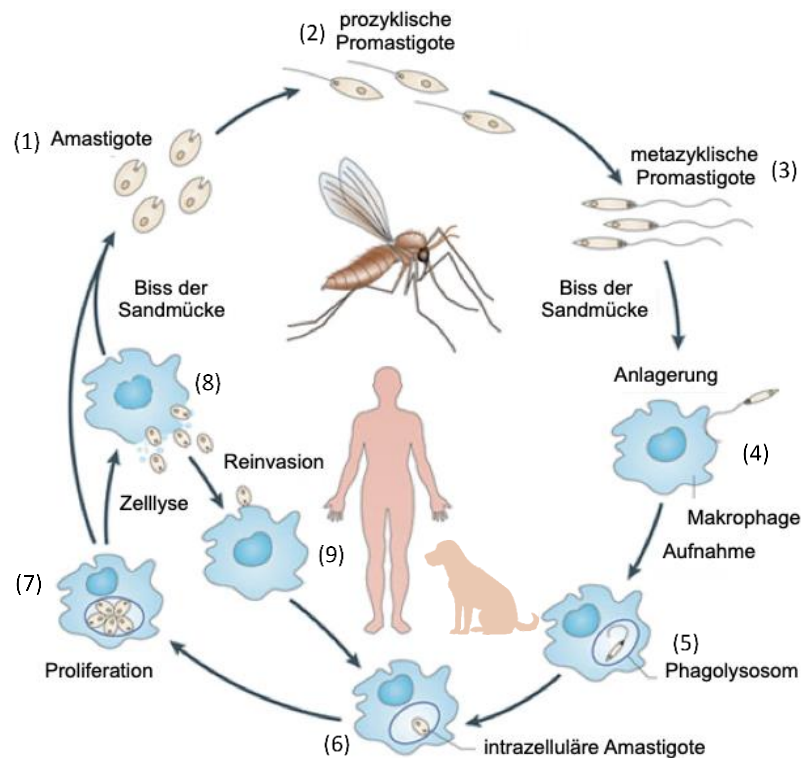
**Abbildung 6: Die weltweite Verbreitung der caninen viszerale Leishmaniose.** Die Karte stellt die geografische Verteilung der CVL-Fälle auf der Erde da. (Scott Weese 2018)

### 1.6 Die Transmission und der Entwicklungszyklus von Leishmanien

Der Lebenszyklus der Leishmanien weist zwei verschiedene Formen auf: eine promastigote Form, die sich im Darm des Vektors befindet und eine amastigote Form, die sich intrazellulär im Säugetierwirt entwickelt (Sunter and Gull 2017). Promastigote Leishmanien sind extrazellulär, länglich, begeißelt, beweglich und haben eine Größe von 15-20  $\mu\text{m}$ . Die amastigoten Leishmanien dagegen sind intrazellulär, rund bis eiförmig, ohne Flagellum, nicht beweglich und haben eine Größe von 2-5  $\mu\text{m}$ . Diese Form vermehrt sich in den Phagolysosomen von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems des Wirbeltierwirts (Handman 1999; RUDZINSKA et al. 1964).

Leishmanien werden durch Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* in der Alten Welt und *Lutzomyia* in der Neuen Welt übertragen, indem die Mücke die promastigote Form in die Haut einbringt (Bañuls et al. 2007). Eine Übersicht über den Entwicklungszyklus der Leishmanien ist in Abbildung 7 dargestellt. Die metazyklischen Promastigoten befinden sich im Pharynx der Mücke (Secundino et al. 2005). Promastigote Parasiten werden beim Stich über den Speichel der Sandmücke auf den Wirbeltierwirt übertragen. Die Parasiten werden daraufhin in der Haut von dendritischen Zellen und Makrophagen aufgenommen und wandeln sich in Amastigote um. Sie vermehren sich und überleben in Phagolysosomen durch eine komplexe Parasit-Wirt-Interaktion (Lodge et al. 2006).

Die Parasiten verbreiten sich über das Lymph- und Gefäßsystem und infizieren andere Monozyten und Makrophagen, was zu einer Infiltration des Knochenmarks, Hepatosplenomegalie und manchmal vergrößerten Lymphknoten (Lymphadenopathie) führt (Mehlhorn 2012; Walochnik Julia 2010). Tötet eine naive Sandmücke eine weitere Blutmahlzeit aus einem bereits mit Leishmanien infizierten Wirt, werden Amastigote aufgenommen, die sich in den Makrophagen des Wirts befinden. Die Amastigoten wandeln sich im Darm der Sandmücke dann in prozyklische Promastigote. Diese prozyklischen Promastigoten wandeln sich dann in schwimmend fortbewegende Promastigoten um. Über den Rüssel der Sandmücke wandern die nun promastigoten Parasiten wieder an die erste Station ihres Zyklus und schließen somit den Lebenslauf (Bates 2007).



**Abbildung 7: Biphasischer Lebenszyklus von *Leishmania* spp.** Der Lebenszyklus von Leishmanien erstreckt sich über Wirbeltierwirte und Sandmücken. (1) Beim Stich des Wirbeltiers durch eine Sandmücke, nimmt diese Amastigoten auf, (2) die sich innerhalb der peritrophen Membran zu prozyklischen Promastigoten entwickeln. (3) Durch weitere Teilungsschritte entstehen infektiöse, metazyklische Promastigote, die sich im Pharynx des Vektors sammeln. (4) Bei einer weiteren Blutmahlzeit dieser Mücke, inokuliert sie die Promastigote in das Wirbeltier, wo sie sich an Makrophagen anlagern und (5) durch Phagozytose in das Phagolysosom aufgenommen werden. (6) Innerhalb der parasitophoren Vakuole wandelt sich der Promastigot zum Amastigot. (7) Durch fortwährende Zweiteilung vermehrt sich der Amastigot, (8) bis die Wirtszelle platzt und die Amastigoten freigesetzt werden und (9) so weitere Zellen infizieren können. Modifiziert nach (Kaye and Scott 2011).

## 1.7 Die Diagnose der Viszeralen Leishmaniose

Die Diagnose der VL ist eine große Herausforderung, da ihre klinischen Symptome mit häufig vorkommenden Krankheiten wie Tuberkulose (TB), Typhus und MA übereinstimmen können (Thakur et al. 2020). Das diagnostische Verfahren sollte einfach, sicher und automatisierbar sein und kostengünstige Reagenzien sowie leicht zu bedienen zu sein, ohne die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beeinträchtigen. In den meisten Fällen handelt es sich bei der VL um eine Krankheit, die arme Menschen in Ländern mit unterentwickelten und unterfinanzierten Gesundheitssystemen betrifft. Aus diesem Grund sind genaue, zuverlässige und kosteneffiziente Schnelldiagnoseinstrumente für eine wirksame Kontrolle und Eliminierung der VL unerlässlich. Für die Diagnose der VL werden derzeit verschiedene Methode eingesetzt.

### 1.7.1 Parasitologische Diagnostik

Der direkte Parasiten-Nachweis ist eine sehr spezifische Methode und gilt als erste Wahl bei der VL-Diagnose. Die mikroskopische Untersuchung eines Blutausstrichs oder des Buffy-Coats ist ein nicht-invasiver, First-Line-Test. Im Falle eines negativen Ergebnisses wird das gleiche Verfahren an Milzbiopsien oder Knochenmark durchgeführt und ist bis heute die spezifischste Diagnosemethode, die auf dem indischen Subkontinent und in Ostafrika eingesetzt wird (Ejazi and Ali 2013). Im Ausstrich von Lymphknoten-, Knochenmark- oder Milzaspiraten können nach Giemsa- oder Leishman-Färbung Amastigote unter dem Lichtmikroskop mit Immersionsöl erkannt werden. Die mikroskopische Untersuchung kann jedoch auch zu falsch-negativen Ergebnissen führen, da die Anzahl der Parasiten, vor allem bei asymptomatischen Fällen, gering ist. Dabei ist die Sensitivität bei Milzaspiraten mit 93 % bis 99 % am höchsten, bei Knochenmarkspiraten liegt sie bei 52 % bis 85 %, in Lymphknoteninspiraten bei 52 % bis 58 % (Chappuis et al. 2007). Die invasive parasitologische Diagnostik ist jedoch aufwändig und kompliziert und kann nur in speziellen Einrichtungen durchgeführt werden.

### 1.7.2 Molekulare Diagnostik

Bisher sind verschiedene molekulare Nachweismethoden entwickelt worden, die auf den Nachweis spezifischer DNA- und/oder RNA-Gene abzielen (Srivastava et al. 2011b). Zu diesen Methoden gehört die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die quantitative PCR. Je nach Zielgen beträgt die Sensitivität zwischen 70 % und 100 %, während die Spezifität zwischen 87 % und 100 % liegt (Srivastava et al. 2011a). Als Proben können sowohl Knochenmark- als auch Lymphknotenaspirate und Blut verwendet werden (Osman et al. 1997). Die PCR bietet zudem eine Möglichkeit die Spezies zu bestimmen, um die Behandlung genauer anzupassen (Wortmann et al. 2005). Obwohl diese Verfahren im Vergleich zu serologischen Methoden eine höhere Sensitivität für asymptomatische Fälle und Infektionen im Frühstadium aufweisen, sind sie teuer und erfordern aufwendige Geräte, Reagenzien und Fachpersonal.

### 1.7.3 Immunologische Diagnostik

Die immunologische Diagnostik basiert auf dem Nachweis von *Leishmania*-Antigenen oder Anti-*Leishmania*-Antikörpern in den Blutproben. Es wurden mehrere serologische Tests für



die VL entwickelt, um parasitologische Methoden zu ersetzen. Diese wurden in verschiedenen endemischen Regionen mit unterschiedlichen Ergebnissen bewertet (Singh et al. 2005). Serologische Methoden zum Nachweis von Anti-*Leishmania*-Antikörpern können zur Diagnose von *Leishmania*-Infektionen sowohl beim Menschen als auch bei Hunden eingesetzt werden. Sensitivität und Spezifität solcher Tests hängen jedoch von den verwendeten Antigenen ab (Palatnik-de-Sousa et al. 2001). Derzeit verwenden die meisten klinischen Laboratorien serologische Verfahren zum Nachweis erregerspezifischer Antikörper, da direkte Methoden oft invasiv, ein hohes Infektionsrisiko bergen und aufwendig sind. Es gibt mehrere serologische Diagnostikmethoden: den Direkten Agglutinationstest (DAT), den Indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT), den Latex-Agglutinationstest (KAtex), den Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) und den Immunchromatographischen Test (ICT).

### **1.7.3.1 Direkter Agglutinationstest**

Der DAT, der ursprünglich als Alternative zu dem riskanten Verfahren der Milzaspiration entwickelt wurde, war der erste Test zum Nachweis von Antikörpern, der zur VL-Diagnose eingesetzt wurde und wird seit mehr als 25 Jahren verwendet. Er ermöglicht den Nachweis von Parasitenantikörpern im Blut oder Serum durch direkte Agglutination (Boelaert et al. 2014). Sensitivität und Spezifität variieren von 70,5 % bis 100 % bzw. 53 % bis 100 % (Mondal et al. 2010). Der DAT weist folgende Nachteile auf: Er dauert verhältnismäßig lang, benötigt eine aufwendige Laborausstattung mit spezifischen Reagenzien und ist damit verhältnismäßig teuer. Das benötigte Testantigen muss bei 4-8 °C gelagert werden, was in tropischen und subtropischen Ländern mit mangelhafter Infrastruktur nicht gewährleistet werden kann (Adams et al. 2012).

### **1.7.3.2 Indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Test**

Promastigote oder amastigote Formen wurden als Antigenquelle für den IFAT verwendet. Der IFAT basiert auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Nachweis von Antikörpern, die die Parasiten erkennen. Dabei wird ein primärer Antikörper verwendet, der an das Antigen bindet und einen Antigen-Antikörper-Komplex bildet (Sakkas et al. 2016). Der IFAT ist in den meisten Ländern der Goldstandard für die serologische Diagnose der CVL. Obwohl er eine hohe Spezifität und Sensitivität (90 % bzw. 100 %) aufweist, ist die

Sensitivität bei asymptomatischen Infektionen im Vergleich zum ELISA geringer (Mettler et al. 2005; Otranto et al. 2004).

### **1.7.3.3 Latex-Agglutinationstest**

Der KAtex ist der einzige kommerziell erhältliche diagnostische Test, der für den Nachweis von 5-20 kDa Glykoprotein im Urin von VL-Patienten entwickelt wurde (Ejazi and Ali 2013). Der KAtex zeigt eine Sensitivität von 85,7 % bei HIV-VL-Patienten. Jedoch ist die geringe Spezifität bei immunkompetenten Patienten ist eine große Einschränkung (Riera et al. 2004, 2004). Die geringe Sensitivität und das 5-minütige Abkochen des Urins zur Vermeidung falsch positiver Reaktionen, begrenzen die Verwendung des KAtex in verschiedenen endemischen Regionen.

### **1.7.3.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**

Der ELISA wird häufig zum Nachweis von Anti-*Leishmania*-Antikörpern eingesetzt, da er eine hohe Sensitivität und Spezifität, eine gute Reproduzierbarkeit und einen hohen Probendurchsatz bietet. Die Sensitivität/Spezifität dieser Methode hängt allerdings von dem verwendeten Antigen und dem geografischen Ursprung der Parasiten ab und kann durch die Verwendung rekombinanter Proteine verbessert werden (Srivastava et al. 2011b). Mehrere rekombinante Antigene wurden im ELISA für die Serodiagnostik der VL verwendet. Das am häufigsten verwendete Antigen rK39 (ein Kinesin-Protein von *L. infantum*) zeigt eine sehr gute Leistung in mehreren endemischen Gebieten, in Ostafrika allerdings ist die Genauigkeit wesentlich geringer (Chappuis et al. 2007).

### **1.7.3.5 Immunchromatographischer Test**

ICTs basieren auf einem chromatographischen Verfahren. Dabei handelt es sich um einen Antigen-Antikörper-Komplex, der auf der Membran eingeschlossen wird. ICTs sind kostengünstig, praktisch, schnell und für den Feldeinsatz geeignet. Wie beim ELISA hängt die Spezifität und Sensitivität des ICTs von dem verwendeten Antigen ab. Der ICT ist relativ zuverlässig bei der Diagnose der VL in mehreren Ländern. Kommerziell zugelassene Schnelldiagnostiktests für VL basieren entweder auf rK39 von *L. infantum* oder rKE16 von *L. donovani* (Burns et al. 1993; Sivakumar et al. 2006). ICTs, die entweder auf rK39 oder

rKE16 basieren, variieren stark in den endemischen Regionen für die VL (Indien, Ostafrika, Brasilien). Der rK39-Schnelltest ist in Ostafrika (Sudan und Äthiopien) weniger effizient und weist eine Sensitivität zwischen 70 % und 94 % auf (Pattabhi et al. 2010).

### **1.8 Kinesine als Biomarker für die Serodiagnostik der Viszeralen Leishmaniose**

Kinesine bestehen aus Tandem-Repeats (TR). Proteine, die solche repetitiven Domänen enthalten, sind häufig potente B-Zell-Antigene. VL-Patienten entwickeln starke Antikörperreaktionen gegen Kinesine, was diese Proteine zu geeigneten Antigenen für die VL-Diagnose macht (Delucchi et al. 2020; Goto et al. 2007).

#### **1.8.1 Tandem-Repeat-Proteine**

Gene, die für Proteine mit TR-Domänen kodieren, sind durch zwei oder mehr Kopien eines Aminosäure (AS)-Musters definiert, und kommen in verschiedenen Protozoenparasiten vor. TR-Proteine sind häufig das Ziel von B-Zell-Antworten und Antikörperreaktionen gegen TR-Proteine sind meist sehr stark (Bhatia et al. 1999; Burns et al. 1993). Antikörper gegen TR-Proteine wurden bei der Leishmaniose (Bhatia et al. 1999) aber auch anderen parasitären Krankheiten wie der Chagas-Krankheit (Burns et al. 1992) und MA (Coppel et al. 1984) gefunden. Trypanosomatide Parasiten, einschließlich *Leishmania* und *Trypanosoma (T.)*, sind reich an Proteinen mit TR-Domänen, die eine große Anzahl von Repeats enthalten (Goto et al. 2008). TR-Proteine von Protozoen können die Immunantwort des Wirtes beeinflussen und zum Überleben der Parasiten beizutragen. Hypergammaglobulinämie ist eine der bekanntesten Symptome bei Menschen mit VL (Boelaert et al. 2000). So wurde gezeigt, dass bei einer Leishmanieninfektion bestimmte B-Zell-Populationen und Immunglobulinspiegel einen negativen Einfluss auf die Kontrolle der Infektion aufweisen (Kane and Mosser 2001). Anti-*Leishmania*-IgG z. B. kann zur Bildung von Interleukin-10 (IL-10) durch Makrophagen, was für das Überleben von Leishmanien im Säugetierwirt von Vorteil sein kann (Miles et al. 2005). Die einzige Funktion, die für fast alle TR-Proteine charakterisiert wurde, ist die starke antigene Wirkung und damit die Bildung von Antikörpern.

### 1.8.2 Kinesine

Kinesine sind eine Superfamilie von Motorproteinen, die wichtige Bestandteile des Mikrotubulus-Zytoskeletts der meisten eukaryotischen Zellen sind. Als Motorproteine binden Kinesine an Mikrotubuli und hydrolysieren ATP, um Energie zu erzeugen. Sie haben verschiedene zelluläre Funktionen, wozu der intrazelluläre Transport, die Reorganisation des Zytoskeletts und die Signaltransduktion zählen. Aufgrund der Bedeutung des Mikrotubulus-Zytoskeletts bei Leishmanien spielen Kinesine wahrscheinlich eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Differenzierung dieser Organismen (Miki et al. 2005; Vale 2003). Bei *L. donovani* wurde festgestellt, dass das Kinesin eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und dem intrazellulären Transport verschiedener Stoffe, einschließlich Vesikeln, Organellen und großer Proteinkomplexe, der Bildung von Zytoskelettfilamenten und dem Flagellenschlag spielt. Das Protein ist sowohl auf der Ebene der Nukleotidsequenz als auch der AS-Sequenz hoch konserviert und weist 80 % bis 90 % Identität mit anderen *Leishmania*-Arten und 35 % bis 45 % Identität mit Trypanosomen aber auch Mäusen und Menschen auf. Kinesine besitzen eine hochkonservierte Kinesin-Motor-Domäne, die sich meist am N-Terminus des Proteins befindet und werden sowohl in Promastigoten als auch in Amastigoten exprimiert. Das *Leishmania*-Kinesin besteht aus TR und enthält 39 repetitive AS-Einheiten (K39) (Burns et al. 1993; Iwai et al. 2004). *L. donovani* und *L. infantum* besitzen homologe Kinesine (LdK39 bzw. LcK39). LdK39 ist ein ATP-abhängiges Kinesin, das sich an das kortikale Zytoskelett bindet und an den posterioren und anterioren Enden der Zellen akkumuliert. Die polarisierten Enden des kortikalen Zytoskeletts haben wichtige Funktionen für das Zellwachstum, die Zellentwicklung und die Veränderung der Zellform (Gerald et al. 2007). Phylogenetische Analysen zeigten, dass LdK39 mit der Kinesin-3-Familie verwandt ist (Dagenbach and Endow 2004). Die Kinesin-3-Familie enthält fünf große Unterfamilien, die bei der Organellenmotilität, dem Vesikeltransport und der Modulation des Akto-Myosin-Zytoskeletts eine Rolle spielen (Kopp et al. 2006; Miki et al. 2005). Obwohl die K39-Gruppe in der Nachbarschaft der Kinesin-3-Familie angeordnet ist, scheint LdK39 kein Mitglied der Kinesin-3-Familie zu sein. Im Gegensatz zu LdK39 gibt es im Genom von *L. major* mindestens zwei weitere Proteinsequenzen, die eindeutig der Kinesin-3-Familie zugeordnet werden können (Berriman et al. 2005). Das LcK39-Kinesin wurde ursprünglich beim Screening einer Expressionsbibliothek von *L. infantum* mit Seren von VL Patienten identifiziert. Solche Patienten zeigten eine starke humorale Reaktion auf ein

Epitop von K39, das TR von 39 AS-Wiederholungseinheiten enthält. Im ORF von LdK39 sind die Wiederholungen etwa 66 Mal hintereinander angeordnet und stellen eine ausgedehnte Region dar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Coiled-Coil-Struktur bildet (Burns et al. 1993; Gerald et al. 2007). Interessanterweise enthält das K39-Homolog von *L. major* auch die Kinesin-TR, dennoch bilden KL Patienten, die mit *L. major* infiziert sind keine nachweisbaren Antikörper gegen K39 (Qu et al. 1994). Im Gegensatz hierzu entwickeln die meisten VL Patienten eine starke Antikörperreaktion gegen Epitope des K39-Kinesins und produzieren reichlich Anti-K39-Antikörper (IgG) (Qu et al. 1994). Aufgrund dieser Kinesineigenschaft wurde das rekombinante K39-Epitop (rK39) ein wichtiger Bestandteil der VL Serodiagnose.

### 1.8.3 Rekombinante Kinesin-Antigene

Inzwischen wurden mehrere Kinesine hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die VL Serodiagnostik charakterisiert. Hierzu zählen rK39, rK28, rKE16 und rKLO8.

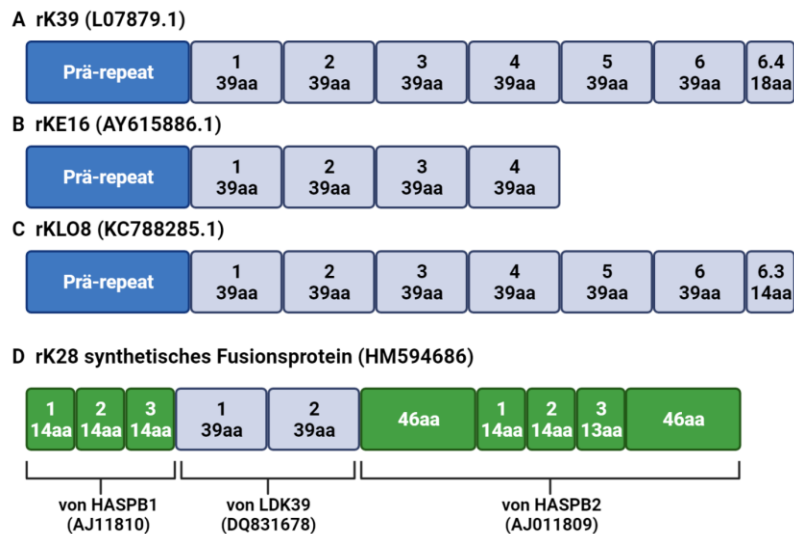
rK39 ist ein 39 AS-wiederholendes B-Zell-Epitop des Kinesin-Proteins von *L. chagasi* (Brasilien). Am N-Terminus befinden sich 46 AS (Prä-Repeat Region), gefolgt von 6,4 Wiederholungen von 39 AS. Feldstudien mit rK39 weisen in verschiedenen Ländern eine hohe Zuverlässigkeit auf. Jedoch zeigten rK39-basierte Tests eine geringere Sensitivität und Spezifität in Ost-Afrika (75-85 %, bzw. 70-92 %) (Burns et al. 1993; Pattabhi et al. 2010).

rKE16 ist ein rekombinantes Kinesinprotein, das aus einem *L. donovani* Isolat aus Indien stammt. rKE16 besteht aus 4 TR mit jeweils 39 AS. Dieses rekombinante Protein wurde für die Serodiagnostik der indischen VL mittels ELISA untersucht. Im Vergleich zu rK39 hat rKE16 eine bessere Sensitivität bei Patienten aus Indien (97,7 % und 100 %) und Pakistan (95,8 % und 100 %) (Sivakumar et al. 2006).

rKLO8 ist ein neues rekombinantes Protein von *L. donovani* (Sudan) mit hoher Reaktivität gegenüber VL-Seren aus dem Sudan. Das Protein hat ähnliche Struktur wie rK39. Es besteht aus einem Prä-Repeat (46 AS) und 6,3 Wiederholungen der 39 AS. Dieses Protein zeigte bei Patienten aus dem Sudan eine höhere Sensitivität (98 % bzw. 96,2 %) und Spezifität (96,1 % bzw. 94,8 %) als rK39 (Abass et al. 2013).

Das rK28 ist ein rekombinantes Fusionsprotein mit TR der K39-Kinesin-Regionen. Zwei Repeats von K39 aus *L. donovani* (Sudan) werden von den Antigenen K9 (drei Repeats je 14 AS vom haspb1-Gen) und K26 (offenes Leseraster mit 133 AS vom haspb2-Gen) flankiert.

Im Vergleich zu rK39 zeigte das rK28 eine höhere Sensitivität (93,6 % und 96,8 %) und Spezifität (92,4 % und 96,2 %) im Sudan (Pattabhi et al. 2010).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der diagnostischen VL-Antigene.** A) rK39, B) rKE16, C) rKLO8, D) synthetisches Fusionsprotein rK28 mit verschiedenen Komponenten. Kinesin-Sequenzen sind in hellblau, Prä-Repeat-Region in dunkelblau und HASPB-Sequenzen in grün dargestellt.

## 1.9 Die Behandlungsmöglichkeiten der Viszeralen Leishmaniose

Die derzeit verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten für die VL sind bezüglich Wirksamkeit, Nebenwirkungen und Kosten oft sehr problematisch, was die Behandlung zum Teil sehr schwierig macht. Zu den derzeit verwendeten Anti-*Leishmania*-Medikamenten gehören fünfwertige Antimonpräparate, Pentamidin, Amphotericin B (Amp B) und Miltefosine, die bekanntermaßen auf verschiedene Stoffwechselwege der Parasiten abzielen (Moore and Lockwood 2010). Tabelle 1 enthält eine Zusammenfassung der VL-Behandlungen und ihre Eigenschaften.

### 1.9.1 Fünfwertige Antimonpräparate

Die Therapie mit fünfwertigen Antimonpräparaten ist in den meisten geografischen Regionen eine hochwirksame Behandlung der VL. Über den genauen Wirkmechanismus ist man sich bisher noch nicht ganz einig. Es wird angenommen, dass pentavalentes Antimon (Sb(V)) durch den Stoffwechsel der amastigoten Leishmanien in eine trivalente Form umgewandelt werden muss, um aktiv zu werden (Shaked-Mishan et al. 2001). Die reduzierte Sb (III)-Form bewirkt nicht nur eine Enzymhemmung des Energiestoffwechsels

und der Makromolekül-biosynthese, sondern verändert auch das Thiol-Redox-Gleichgewicht, das für die toxischen Effekte reaktiver Sauerstoffspezies im Parasiten verhindert (Mandal et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit der Wirkungsweise ist, dass Sb(V) selbst einen Komplex mit ribosehaltigen Molekülen formt und die DNA Topoisomerase Typ I inhibiert (J et al. 2021). Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, geht die Behandlung mit Antimonpräparaten mit starken Nebenwirkungen einher, die sich unter anderem in Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Arthralgie, Hepatitis, Pankreatitis und Herzrhythmusstörungen äußern (Moore and Lockwood 2010).

### 1.9.2 Paromomycin

Paromomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das ein breites Wirkungsspektrum gegenüber verschiedensten Bakterien und Protozoen zeigt. Der Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der Proteinsynthese durch Angreifen mehrerer ribosomaler Proteine und der Depolarisierung der mitochondrialen Membran im Parasiten (Maarouf et al. 1997). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Schwerhörigkeit, Schmerzen an der Einstichstelle, Erythema, Bläschen und Hautreizungen sowie ein Ansteigen der Leberenzyme. Es wurde gezeigt, dass die Effektivität der Medikamente stark von Wirts- und Parasitenfaktoren abhängig ist und somit Dosen, die in Indien für eine Behandlung ausreichen, in Ost-Afrika nur eine geringe Wirkung hatten (Reguera et al. 2019).

### 1.9.3 Pentamidin

Pentamidin ist ein kationisches Diamidin, das in den 1980er Jahren für die Behandlung der Lungenentzündung, die durch *Pneumocystis carinii* bei HIV-Patienten verursacht wird, eingesetzt wurde (Reguera et al. 2019). Dieser Wirkstoff akkumuliert in den Mitochondrien, wodurch das mitochondriale Membranpotenzial gesenkt und die mitochondriale Topoisomerase Typ-II inhibiert wird. Jedoch weist auch dieses Medikament eine Reihe von Nebenwirkung wie Hypoglykämie, Hyperglykämie, Nephrotoxizität und Hepatotoxizität auf. Ebenso wurden resistente Stämme gegen Pentamidin beobachtet (J et al. 2021; Matos et al. 2020).

### 1.9.4 Amphotericin B

Amp B ist ein Polyen-Antimykotikum, das auch zur Behandlung der VL eingesetzt wird. Es bindet an die Ergosterolmoleküle in der Zellmembran der Parasiten, hemmt selektiv die Membransynthese und verursacht Poren oder Kanäle in der Lipiddoppelmembran, was zum Tod des Parasiten führt (Torrado et al. 2008). Amp B ist wegen seiner starken und manchmal irreversiblen Nebenwirkungen (z. B. schwere Nierenschäden) ein Medikament der zweiten Wahl bei der Behandlung der VL. Mittlerweile sind Lipidformulierungen von Amp B verfügbar. Liposomale Formulierungen zeigen eine geringe Toxizität, sind jedoch sehr teuer. Der hohe Kostenfaktor schränkt den Einsatz dieses Medikaments, vor allem in ärmeren Ländern, derzeit stark ein (Moore and Lockwood 2010).

### 1.9.5 Miltefosine

Miltefosine ist ein membranaktives Alkylphospholipid (Hexadecylphosphocholin), das ursprünglich als Krebsmedikament eingesetzt wurde (Croft et al. 1987). Der genaue Wirkmechanismus von Miltefosine ist nicht klar definiert, seine Wirkung basiert aber auf der intrazellulären Akkumulation des Wirkstoffs innerhalb der Parasiten, die zum Apoptose-ähnlichen Tod der Zellen führt (Verma and Dey 2004). In einer Studie wurde gezeigt, dass Miltefosine die Produktion von Interferon (IFN)- $\gamma$ -, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ - und IL-12 in Makrophagen induziert, die die angeborene Immunantwort des Wirts stimulieren (Ghosh et al. 2013). Es ist das einzige Medikament, das oral verabreicht wird. Nebenwirkungen können unter anderem Erbrechen, Durchfall und Nephrotoxizität sein. Die lange Halbwertszeit von Miltefosine (150-200 Stunden) führt zu einer möglichen Resistenzentwicklung, was in Indien bereits beobachtet wurde (Kumar 2013).



Tabelle 1: Etablierte Behandlungsmethoden der Viszeralen Leishmaniose

Medikament	Wirkmechanismus	Vorteile	Nachteile
Fünfwertige Antimonpräparate	Zwei Hypothesen: 1. Prodrug – wird zu toxischem Sb(III) reduziert 2. Intrinsische Toxizität von Sb(V) durch Komplexbildung mit Ribose	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lange Geschichte effektiver Behandlungen</li> <li>- Günstig</li> <li>- Leicht zugänglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxizität (Übelkeit, Diarrhö, Arthralgie, Hepatitis, Pankreatitis, Herzrhythmusstörung)</li> <li>- Lange Therapiedauer</li> <li>- Resistenzbildung</li> </ul>
Paromomycin	Hemmung der Proteinsynthese	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Günstig</li> <li>- Breites Wirkungsspektrum</li> <li>- Gute Heilungsrate in Indien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxizität (Ototoxizität, Schmerzen, Erythema, Hautreizungen, Anstieg Leberenzyme)</li> <li>- Medikamenteneffizienz hängt stark an Wirts- und Parasitenfaktoren</li> </ul>
Pentamidin	Akkumulation in Mitochondrien führt zur Senkung des mitochondrialen Membranpotenzials und inhibiert mitochondriale Topoisomerase Typ II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gut für Sekundärprävention von HIV-Patienten</li> <li>- Kurze Therapiedauer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxizität (Hypo-/ Hyperglykämie, Nephro-/ Hepatotoxizität, Herzkrankung, Diabetes)</li> <li>- Geringe Effektivität als 1. Behandlung</li> <li>- Resistenzbildung</li> </ul>
Amphotericin B	Bindet an Ergosterolmoleküle der Zellmembran und bildet so Poren oder Kanäle → durch die erhöhte Membranpermeabilität Einstrom von Ionen → Zelltod	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hohe Effektivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxizität (Fieber, Rigor, Hypotension, Hämoglobinlevel↓)</li> </ul>
Liposomales Amphotericin B		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hohe Effektivität</li> <li>- Geringe Toxizität</li> <li>- Einmalige Dosierung ausreichend</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sehr teuer</li> </ul>
Miltefosine	Akkumulation im Parasiten, die zur Apoptose führt	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Orales Präparat</li> <li>- Hohe Effektivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxizität (Erbrechen, Durchfall, gastrointestinale sowie Nephrotoxizität, Teratogenität)</li> <li>- Teuer</li> </ul>

### **1.10 Neue Zielstruktur und Wirkstoff zur Behandlung der Leishmaniose**

Die Strategie zur Kontrolle der VL basiert auf chemotherapeutischen Methoden. Diese chemotherapeutischen Therapien haben jedoch mehrere Nebenwirkungen, hohe Toxizität, hohe Behandlungskosten, zunehmende Medikamentenresistenzen und geringe Wirksamkeit, weshalb die Identifizierung neuer Zielstrukturen sehr wichtig ist (Chawla and Madhubala 2010). Es ist entscheidend, dass therapeutische Zielstrukturen im Wirtsorganismus entweder nicht vorhanden sind oder sich zwischen Parasit und Wirt unterscheiden, damit es als Target für ein Medikament genutzt werden kann. Außerdem sollte das ausgewählte Target für das Überleben des Parasiten absolut notwendig sein. Aus phylogenetischer Sicht gehören Leishmanien zu den alten eukaryotischen Linien. Sie unterscheiden sich deutlich von ihren Säugetierwirten (Chawla and Madhubala 2010). Daher ist es möglich, neue Targets zu finden, die für diese Erreger spezifisch sind. Das Proteasom ist ein Enzymkomplex mit mehreren Untereinheiten (UE), der für den Abbau kurzlebiger, abnormaler oder geschädigter Proteine in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist. Bei den Kinetoplastida (Leishmanien und Trypanosomen) ist das Proteasom an der Zelldifferenzierung und -replikation beteiligt und aufgrund spezifischer Sequenzunterschiede zwischen Wirts- und Parasitenproteasom könnte dieser Enzymkomplex ein vielversprechendes therapeutisches Target sein (Xie et al. 2019).

#### **1.10.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist das wichtigste proteolytische System, das den Proteinabbau/turnover steuert und viele zelluläre Prozesse in eukaryotischen Zellen reguliert, z. B. die DNA-Reparatur, Stressantworten und die Zellproliferation (Park et al. 2020). Das Proteasom, der wichtigste Bestandteil des UPS, ist ein großer Proteinkomplex, der multikatalytische Proteaseeigenschaften enthält (Collins and Goldberg 2017).

Proteasomen kommen in allen Eukaryoten und Archaeen sowie in einigen Bakterien vor. In eukaryotischen Zellen befinden sie sich im Zytoplasma und im Zellkern (Baumeister et al. 1998). Das Proteasom ist ein großer ATP-abhängiger Enzymkomplex, der eine proteinhydrolytische Aktivität besitzt. Während Proteasomen für das Überleben prokaryotischer Zellen nicht unbedingt wichtig sind, ist ihre Funktion für das Überleben von eukaryotischen Zellen entscheidend. Neben ihrer Beteiligung am Proteinumsatz und der

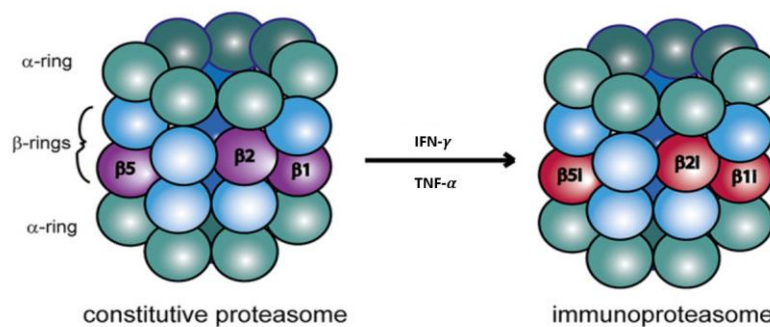
Beseitigung beschädigter Proteine sind sie an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, z. B. an der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose, der Transkriptionsregulation, der Proteintranslation, dem Chromatinumbau, der DNA-Reparatur und der Antigenpräsentation über MHC Klasse I (Baugh et al. 2009; Muñoz et al. 2015).

Das eukaryotische 26S-Proteasom wird in zwei Unterkomplexe unterteilt: in den 19S-Regulationspartikel (RP) und den 20S-Kernpartikel (KP). Der 20S-KP ist etwa 700 kDa groß und enthält 14  $\alpha$ - und 14  $\beta$ - Untereinheiten (UEs), die in vier Ringen mit einem Hohlraum in der Mitte angeordnet sind. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus sieben  $\alpha$ -UEs ( $\alpha$ 1-7), und die beiden inneren Ringe bestehen aus sieben  $\beta$ -UEs ( $\beta$ 1-7) (Budenholzer et al. 2017). Die  $\alpha$ -Ringe regulieren den Zugang zum KP, wobei die  $\alpha$ 3-UE für die Öffnung des zentralen Kanals und die Stabilisierung im geschlossenen Zustands entscheidend ist (Leister et al. 2022). Die UEs, die für die Peptidhydrolyse benötigt werden, sind in den  $\beta$ -Ringen lokalisiert. Die  $\beta$ -UEs sind dabei so positioniert, dass sie die Substrate im Innenraum des Zylinders spalten. In Eukaryoten zeigen nur die  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-UEs eine hydrolytische Aktivität. Sie enthalten katalytisch aktive Threoninreste an ihren N-Termini mit einer nukleophilen Hydrolaseaktivität, was darauf hinweist, dass das Proteasom eine Threoninprotease ist. Die  $\beta$ 1-UE besitzt eine Caspase-ähnliche Aktivität, sie spaltet einen sauren AS-Rest (Asp bzw. Glu). Die  $\beta$ 2-UE hat eine Trypsin-ähnliche Aktivität und spaltet Substrate mit einem basischen Rest (Lys, Arg). Die  $\beta$ 5-UE weist eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf und spaltet nach hydrophobischen Resten. Einige hydrophobe Substrate werden gegenüber anderen bevorzugt, wobei Leu, Phe und Tyr am bevorzugtesten sind (Bibo-Verdugo et al. 2017).

Der 20S-KP, der die katalytischen UEs  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 enthält, wird als konstitutives oder Standardproteasom bezeichnet (Krüger et al. 2001). Proteasomen werden durch Proteinkomplexe aktiviert, die an die Endringe der  $\alpha$ -UEs binden. Der bekannteste Aktivator ist PA700, auch als 19S-RP bezeichnet, der von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert ist und sich an den 20S-KP bindet, um das 26S-Proteasom zu bilden. Der 19S-RP ist für die Substraterkennung, die Substratentfaltung und den Substrattransport sowie das Ubiquitin-Recycling verantwortlich.

Das Immunoproteasom ist eine Isoform, die meist in Zellen des Immunsystems, wie antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten, exprimiert wird. Das Immunoproteasom unter inflammatorischen Bedingungen durch  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$ , aber

auch durch Infektionen und Autoimmunerkrankungen, induziert werden. Die Expression des Immunproteasoms führt meist zu einer Verbesserung der MHC I-Antigenpräsentation, indem es die Bildung von Peptiden mit hoher Affinität für MHC I-Moleküle verstärkt (Kimura et al. 2015). Bei einer Infektion mit Viren und intrazellulären Bakterien werden die drei katalytischen Proteasom-UEs im infizierten Gewebe durch die Immunproteasom-UEs  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL-1) und  $\beta 5i$  (LMP7) ersetzt. Gleichzeitig kann der 19S-RP durch den 11S-RP ersetzt werden, der aus den Proteasom-Aktivatoren  $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ) und  $\beta$  (PA28 $\beta$ ) besteht (Leister et al. 2022).



**Abbildung 9: Struktur des konstitutiven Proteasoms und des Immunproteasoms.** Der 20S-Kerpartikel des Proteasoms besteht aus zwei Paaren von inneren  $\beta$ -Ringen und zwei Paaren von äußeren  $\alpha$ -Ringen. Das konstitutive Proteasom enthält die katalytischen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ . Inflammatorische Zytokine induzieren die Expression der drei isoformen Untereinheiten  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (LMP10),  $\beta 5i$  (LMP7), die sich am Proteasomkern zum Immunproteasom zusammenfügen. Modifiziert nach (Leister et al. 2022).

### 1.10.2 Die Rolle des Proteasoms in Leishmanien

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist wichtig für die Regulierung der zellulären Transformationen, die bei der Differenzierung des *Leishmania*-Parasiten zwischen seinen morphologischen Hauptformen auftreten. Eines der wichtigsten Merkmale im Lebenszyklus der Leishmanien ist dabei der morphologische Wechsel vom Promastigot zum Amastigot (Bates 2018). Das UPS ist entscheidend für die Umwandlung (Burge et al. 2020), bei der Form, Größe und zytosolische Struktur für den Infektionszyklus angepasst werden müssen; diese Änderung umfasst eine kontrollierte Proteolyse (Muñoz et al. 2015). Das Proteasom spielt somit eine entscheidende Rolle im Überleben und der Pathogenität der Leishmanien, da der Stadienwechsel nicht nur die Synthese neuer

Proteine, sondern auch den Abbau von Proteinen erfordert, die von der Zelle nicht weiter benötigt werden (Méndez-Vilas 2013).

Die Methionin-Adenosyltransferase (MAT), die in *L. donovani* gefunden wurde, ist ein wichtiges Enzym für die Stoffwechselprozesse von Leishmanien. Ihr Produkt, S-Adenosylmethionin, ist an trans-Methylierungs-, trans-Sulfurierungs- und Polyamin-Produktionsreaktionen beteiligt. Die Regulierung des MAT-Spiegels spielt dabei eine wichtige Rolle während des Übergangs zu verschiedenen Lebenszyklusphasen der Leishmanien. Es wurde nachgewiesen, dass das UPS von *L. donovani* eine wichtige Rolle beim Umsatz von MAT spielt und somit das Überleben des Parasiten beeinflussen kann. Darüber hinaus spielt das UPS eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus in Leishmanien (Muñoz et al. 2015).

Die Regulierung des Proteinspiegels eines Kinesins aus *L. major* (LmjKIN13-1) zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit vom Zellzyklus. Während es in der G2- und M-Phase hoch exprimiert wurde, konnten nach der Mitose nur noch sehr geringe Mengen nachgewiesen werden. Diese Abnahme ist essenziell für den Start des nächsten Zyklus und wird durch das UPS umgesetzt (Muñoz et al. 2015).

Ein weiteres Protein in diesem Zusammenhang ist die Pteridin-Reduktase 1 (PTR1) aus *L. donovani*. PTR1 ist am Pterin- und Folatstoffwechsel beteiligt. Es wurde gezeigt, dass PTR1 in der stationären Wachstumsphase abgebaut wird, wenn die Parasiten die Metazyklogenese beginnen und dass der Abbau von PTR1 während der stationären Wachstumsphase höchstwahrscheinlich durch Proteasomen vermittelt wird. Dieser Abbau führt zu niedrigen H4-Biopterinspiegeln, die die Metazyklogenese fördern und anschließend zu hochinfektösen Parasitenstadien führen (Muñoz et al. 2015).

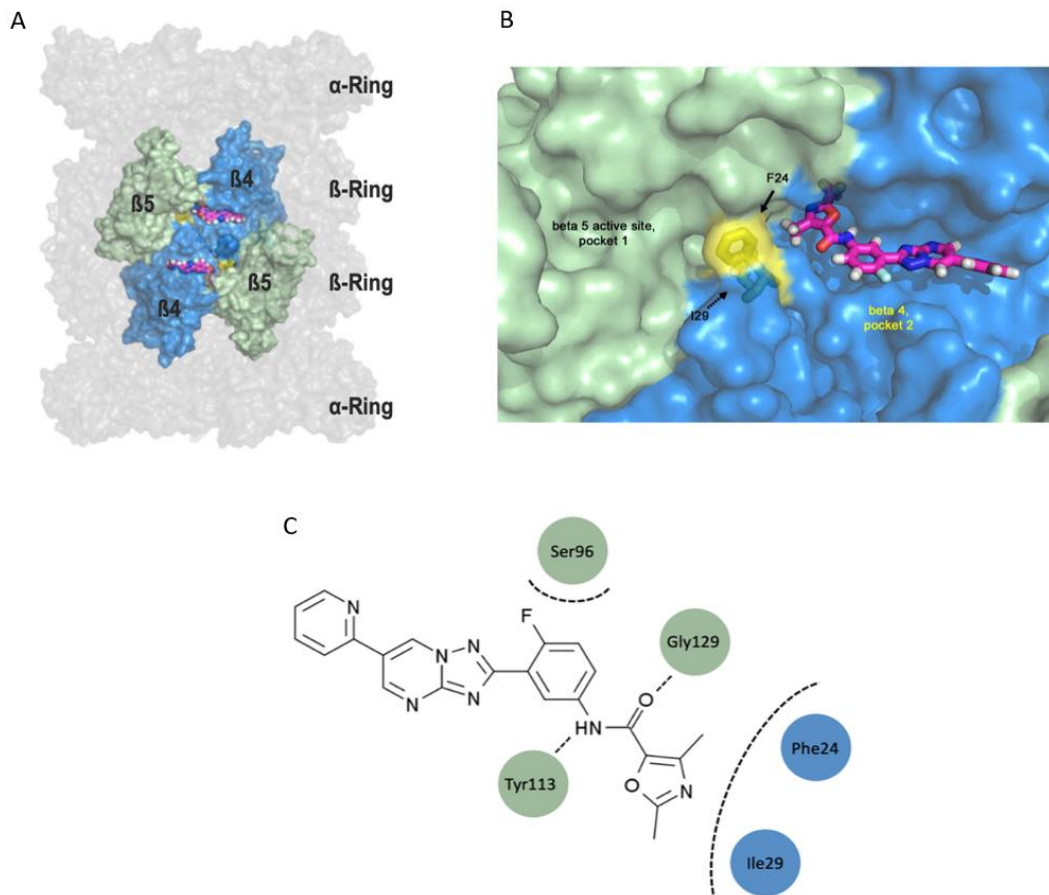
Alle oben genannten Beispiele zeigen, dass das UPS eine wesentliche Rolle für das Überleben und die Pathogenese von Leishmanien spielt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Verwendung proteasomaler Inhibitoren eine Auswirkung auf das Zellwachstum und die Zellentwicklung hat (Bibo-Verdugo et al. 2017). Ein essentieller Befund ist, dass sich die Proteasomen von Säugetieren und kinetoplastiden Parasiten wesentlich unterscheiden, weshalb das Proteasom der Kinetoplastida hinsichtlich der Eignung als therapeutisches Target untersucht werden sollte (Bibo-Verdugo et al. 2017).

### 1.10.3 Der Proteasominhibitor GNF-6702

GNF-6702 ist ein Kinetoplastid-spezifischer Wirkstoff, der vom Genomics Institute der Novartis Research Foundation im Jahr 2016 entwickelt wurde. Drei Krankheiten werden durch Kinetoplastida verursacht: Leishmaniose wird durch verschiedene *Leishmania*-Arten, während die Schlaf- und Chagas-Krankheit, durch, *T. brucei* bzw. *T. cruzi* verursacht werden. Das Proteasom wurde als Target für *Trypanosoma* und *Leishmania* vorgeschlagen, da eine Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren Veränderungen im Zellwachstum und in der Entwicklung der Parasiten gezeigt hat (Bibo-Verdugo et al. 2017; Khare et al. 2016). GNF-6702 inhibiert das Kinetoplastiden-Proteasom über einen nicht-kompetitiven Mechanismus, hemmt aber nicht das Proteasom der Wirtszellen.

Der Wirkstoff interagiert nicht mit dem Threonin-Rest in den  $\beta$ 5-UEs, sondern bindet an die benachbarte  $\beta$ 4-UE an der Schnittstelle zwischen der  $\beta$ 4- und der  $\beta$ 5-UE. Durch Mutagenese-Studien wurde untersucht, welche AS des Proteasoms für die Bindung des Inhibitors von entscheidender Bedeutung sind. Es zeigte sich, dass die Positionen Ser96, Tyr113 und Gly129 in den  $\beta$ 5-UEs und die Positionen Phe24 und Ile29 in den  $\beta$ 4-UEs für die Bindung von kritischer Relevanz sind. Die  $\beta$ 4-Reste (Phe24 und Ile29) sind bei *L. donovani*, *T. cruzi* und *T. brucei* konserviert, während sie in der  $\beta$ 4-UE der menschlichen Proteasomen nicht vorkommen.

Bei einer oralen Dosierung von 10 mg/kg (2x täglich) GNF-6702 wurde die Parasitenbelastung in der Leber von Mäusen, die mit *L. donovani* infiziert waren, nach acht Tagen Behandlung um mehr als 99,8 % reduziert. Damit zeigte es eine bessere Wirksamkeit gegenüber dem einzig zugelassenen, oralen Anti-*Leishmania*-Medikament Miltefosine (1x täglich, 12 mg/kg). GNF-6702 war auch gegen *T. brucei*- und *T. cruzi*-Kulturen wirksam, mit EC<sub>50</sub>-Werten von 70 nM, bzw. 120 nM (Bibo-Verdugo et al. 2017; Khare et al. 2016). Diese Arbeit bestätigt, dass sich das Kinetoplastid-Proteasom als ein vielversprechendes Target für die Behandlung einer Leishmanieninfektion erweist.



**Abbildung 10: Bindungsstellen von GNF-6702 im Proteasom.** (A) Oberflächendarstellung einer modellierten Proteasomstruktur mit Darstellung der relativen Positionen der  $\beta$ 4- (blau) und  $\beta$ 5-UEs (grün). GNF-6702 ist kugelförmig (pink) dargestellt und bindet in eine Tasche auf der Oberfläche der  $\beta$ 4-UE. Die anderen 20S-Proteasomuntereinheiten sind grau gefärbt. (B) GNF-6702 bindet an die benachbarte  $\beta$ 4-UE an der Schnittstelle zwischen der  $\beta$ 4- und der  $\beta$ 5-UE. Das aktive Zentrum der  $\beta$ 5-UE (Tasche 1, chymotrypsinähnliche Aktivität) ist grün gefärbt. Die  $\beta$ 4-Tasche (Tasche 2) mit gebundenem GNF6702 ist blau gefärbt. Die  $\beta$ 4-Reste F24 und I29 sind gelb gefärbt. (C) Darstellung der kritischen Aminosäuren für die Bindung des Inhibitors. Grün gefärbte Aminosäuren befinden sich in der  $\beta$ 5-Untereinheit, blau gefärbte in der  $\beta$ 4-Untereinheit. Modifiziert nach (Khare et al. 2016) (C: mit Genehmigung von Sandra Witt verwendet).

### **1.11 Ziel der Arbeit**

#### **1.11.1 Entwicklung einer verbesserten Serodiagnostik**

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines neuen Antigens für die Diagnose der humanen und caninen VL. Dies soll die Zuverlässigkeit der VL-Diagnostik im Vergleich zu den derzeitigen Methoden verbessern. Weiterhin soll der Einfluss der Sequenzvariationen und TR-Anzahlen der Kinesine hinsichtlich der Bindung von VL-spezifischen Antikörpern untersucht werden. Am Ende soll eine hochsensitive und spezifische Serodiagnostik für die VL entwickelt werden, die unabhängig vom Endemiegebiet und der Parasitenart eingesetzt werden kann.

#### **1.11.2 Eignung von Proteasom-Inhibitoren zur Behandlung der Viszeralen Leishmaniose**

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollen die derzeitigen Medikamente zur Behandlung der Leishmaniose mit einem Wirkstoff der neueren Generation, dem Proteasomeninhibitor GNF-6702, verglichen werden. Hierzu soll zunächst untersucht werden, ob die Zielstrukturen von GNF-6702, die proteasomalen UEs  $\beta 4$  und  $\beta 5$ , bei Leishmanien-Stämmen konserviert sind und der Inhibitor somit generell für die Behandlung der VL und KL geeignet ist. Daraufhin soll untersucht werden, wie sich die Behandlung mit diesem Inhibitor auf das Wachstum und das Überleben von sowohl Leishmanien (promastigote und amastigote Form) als auch menschliche Zellen (THP1) auswirkt.



## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Hersteller

Gerät	Typ	Hersteller
Agarose-Photographie	MicroChemi DNR	Bio-Imaging Systems
Heizblock	Dri Block DB1A	Techne
Inkubator	Heraeus BBD6220	Thermo Scientific
Labor-Homogenisator	Microfluidizer M-110L	Microfluidics
PCR-Thermocycler	C1000 Touch Thermal Cyclers	BIO-RAD
Peristaltikpumpe	Peristaltic Pump P-3	Pharmacia Fine Chemical
Photometer (DNA)	NanoDrop-1000	peQLab / Thermo Fisher
Photometer (Microplate Reader)	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Photometer (OD)	BioPhotometer	Eppendorf
Proteinreinigung	Äkta™ Purifier	GE HealthCare
Schüttler	GFL Typ 3005	GFL
	KS 260 basic Shaker	IKA
	Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
SDS-PAGE Apparatur	Mini-Protean II SDS-PAGE	BIO-RAD
Spannungsgerät (Agarose-Gel)	E815 Power Supply	Consort
	Standard Power Pack P25	Biometra
Transilluminator	UVT-20	Herolab
Waage	BL 610	Sartorius
	Adventurer Pro AV812M	OHAUS
Wasserbad	Julabo 5A	Julabo
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1 L-R	Thermo Scientific
	Biofuge pico	Heraeus Instruments
	MICRO STAR 117R	VWR
	Sorvall LYNX 6000	Thermo Scientific
	Sorvall LYNX 6000 Superspeed	Thermo Scientific
	Immuno™ Wash 8	Nunc™
Microtiterplatten-Washer	MicroChemi	DNR Bio-Imaging Systems
Western Blot-Transfersystem	Trans-Blot Turbo	BIO-RAD
Bench	Clean bench HERAsafe	Heraeus Instruments
pH-Meter	inoLab Präzisions-pH-Meter	inoLab
Vortexer	uniTexer	LLG
Zellzähler	TC20 Automated Cell Counter	BIO-RAD
Filter	Amicon Ultra 15 Ultracel-30K	Merck
XK-Säule	HiLoad 16/600 Superdex 200	GE Healthcare
IMAC-Säule	His-Trap FF (1 ml & 5 ml)	Cytiva
Dialysekassette	Slide-A-Lyzer 10K Dialysis Cassettes G2 3 ml	Thermo Scientific

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Agar-Agar	Merck
Agarose LE	Biozym
Ammoniumpersulfat	Sigma
Coomassie Brilliant Blue 250	Roth
DMS	Sigma
Imidazol	Roth
IPTG	Gerbu
Isopropanol	Acros
LB Broth Base	Invitrogen
PMSF	Sigma
Phosphat buffered saline (PBS)	Bio & Sell
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 30 % Acrylamid	Roth
SDS	Sigma
TEMED	Fluka
Urea	Sigma
Tris-Base	Roth
Ethanol	Sigma
Glycin	Roth
BSA	Sigma, Thermo Scientific
Tween20	Merck
Schwefelsäure	Fluka
Eisessig	Roth
Natriumdehydrogencarbonat	Biochrom
EDTA	Promega
Natronlauge	Sigma
Nickel(II)-sulfat	Roth
100x Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
HEPES	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Destilliertes Wasser	Berlin Chemie
6x SDS-Probenpuffer nach Laemmli	Eigenherstellung Institut für Mikrobiologie
5x Phusion GC-Puffer	Thermo Scientific
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
CutSmart Puffer	New England Biolabs
Dimethylsulfoxid	Sigma
dNTPs	Qiagen
Essigsäure	Roth
Gel-Red	Biotium
Laktose	Roth
MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma
MOPS	Sigma
Ni Sepharose™ 6 Fast Flow	GE Healthcare

Name	Hersteller
Ni Sepharose™ 6 Fast Flow Nickelbeads	GE Healthcare
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Polyvinylidenfluorid-Membran	Biozym
Potassium Acetat	Sigma
RbCl <sub>2</sub>	Merck
Sodium Dodecyl Sulfat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Thermo Pol Puffer	New England Biolabs
Whatman Paper	Biozym
DMSO	Sigma
EDTA	AppliChem
HCl	Thermo Scientific
Trypanblau	BIO-RAD
Formaldehyd	Sigma
10x Thermo Polymerase Puffer	Thermo Scientific
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Enzo Lifesciences
Ampicillin	Sigma
Penicillin / Streptomycin 100x	AppliChem
Kanamycin	Sigma
GNF-6702	Novartis
Miltefosine	Sigma Aldrich
Amphotericin B	Sigma Aldrich
Bortezomib	Sigma Aldrich
ONX-0914	Sigma Aldrich
MG-132	Sigma Aldrich
Chloramphenicol	Sigma Aldrich

### 2.1.3 Kits

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Molekularbiologischen Kits

Name	Hersteller
NucleoSpin Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Maxi Purification Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin Gel Ex and PCR clean-up	Macherey-Nagel
TA Cloning™ Kits mit PCR™ 2.1-Vektor	Invitrogen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
TMB Substrate Reagent Set	BD
Nickel-NTA-Säule	Thermo Scientific
TOPO TA-Cloning	Invitrogen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology
AlamarBlue	BIO-RAD
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega

### 2.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Enzyme

Name	Hersteller
PhusionHot Start II DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Taq DNA-Polymerase	Thermo Scientific, New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Calf Intestinale Phosphatase (Quick-CIP)	New England Biolabs
BamHI HF	New England Biolabs
NdeI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Proteinreinigung	
	HEPES 47,66 g
	NaCl <sub>2</sub> 146,7 g
	MgCl <sub>2</sub> 40,66 g
	KCl 14,91 g
	Imidazol 27,24 g
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
	Auf pH 8,0 einstellen
	HEPES 4,76 g
	NaCl <sub>2</sub> 14,61 g
	MgCl <sub>2</sub> 4,07 g
	KCl 1,49 g
	Imidazol 34 g
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
	Auf pH 8,0 einstellen
0,5 M EDTA (pH 8,0)	EDTA 93 g
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
0,5 M NaOH	NaOH 20 g
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
	PBS (10x) 50 ml
	β-Mercaptoethanol 75 µl
	5 ml
	Imidazol (1 M) 10 ml
	25 ml
	200 ml
	H <sub>2</sub> O ad 500 ml
	Auf pH 7,4 einstellen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		
<b>SDS-PAGE</b>			
Färbelösung	EtOH (99 %)	400	ml
	Eisessig (99 %)	80	ml
	Coomassie Blue 250	3,2	g
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
Entfärbelösung	EtOH (99 %)	300	ml
	Eisessig (99 %)	100	ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
Laufpuffer (10x)	Tris Base	30,28	g
	Glycin	144,14	g
	SDS	10	g
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
12 %iges Trenngel (Mengenangabe 2 Gele)	H <sub>2</sub> O	4,9	ml
	30 % Acrylamid	6	ml
	1,5 M Tris pH 8,8	3,8	ml
	10 % SDS	150	µl
	10 % APS	150	µl
	Temed	8	µl
Sammelgel (Mengenangabe 2 Gele)	H <sub>2</sub> O	2,7	ml
	30 % Acrylamid	670	µl
	1,0 M Tris pH 6,8	500	µl
	10 % SDS	40	µl
	10 % APS	40	µl
	Temed	4	µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	Tris-Base	18,17	g
	H <sub>2</sub> O	ad 100	ml
	Auf pH 8,8 einstellen		
1,0 M Tris (pH 6,8)	Tris-Base	12,11	g
	H <sub>2</sub> O	ad 100	ml
	Auf pH 6,8 einstellen		
<b>ELISA</b>			
Coating Puffer (0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6)	NaHCO <sub>3</sub>	8,4	g
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
	Mit NaOH auf pH 9,6 einstellen		
Waschpuffer (0,05 % Tween20 in PBS)	PBS (1x)	10	l
	Tween20	5	ml
Blockingpuffer (3 %)	Bovines Serumalbumin (BSA)	30	g
	ELISA-Waschpuffer	ad 1	l
	Steril filtrieren		
Blockingpuffer (5 %)	BSA	50	g
	ELISA-Waschpuffer	ad 1	l
	Steril filtrieren		
2-N-Schwefelsäure	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (27 %)	27	ml
	H <sub>2</sub> O	473	ml

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		
<b>Western Blot</b>			
Transferpuffer	SDS-Laufpuffer (1x)	800	ml
	Methanol	200	ml
Waschpuffer (0,05 % Tween20 in PBS)	PBS (1x)	1	l
	Tween20	0,5	ml
Blockingpuffer	Western Blot-Waschpuffer	100	ml
	Milchpulver	10	g
1 % Milch-PBS-Tween20-Puffer	Western Blot-Blockingpuffer	5	ml
	Western Blot-Waschpuffer	45	ml
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>			
TAE-Laufpuffer (50x)	Tris-Base	242	g
	Eisessig	57,1	ml
	EDTA (0,5 M)	100	ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
<b>Proteasomassay</b>			
Lysepuffer (Herstellung Zelllysate)	HEPES	50	mM
	EDTA	5	mM
	NaCl	150	mM
	Triton x 100	1	%
	ATP	2	mM
	Auf pH 7,5 einstellen		
Proteasomassay-Puffer	HEPES	1,19	g
	EDTA	0,029	g
	H <sub>2</sub> O	ad 100	ml
	Auf pH 7,6 einstellen		

## 2.1.6 Nährmedien

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung / Hersteller		
SOC Medium	Invitrogen		
NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium	New England BioLabs		
LB-Medium (lysogeny broth)	LB Broth Base	20	g
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
LB-Agar (1,5 %)	LB Broth Base	20	g
	Agar	15	g
	H <sub>2</sub> O	ad 1	l
	Ggf. Zugabe von Antibiotika für Selektivmedien		
Promastigotenmedium	RPMLI-1640	500	ml
	FCS	50	ml
	L-Glutamin (200 mM)	5	ml
	NEAS	5	ml
	β-Me	2,5	ml
	Penicillin / Streptomycin	5	ml
	Humaner Urin	12,5	ml

Medium	Zusammensetzung / Hersteller		
Einfriermedium	RPMI-1640	7,8	ml
	FCS	1,2	ml
	DMSO	1	ml
Amastigotenmedium 1	RPMI-1640	500	ml
	FCS	50	ml
	Folsäure	5	ml
	Adenosin	5	ml
	MES	2,5	ml
	Penicillin / Streptomycin	5	ml
	L-Glutamin (200 mM)	12,5	ml
	Auf pH 5,5 einstellen		
Amastigotenmedium 2	Grace's Insect Medium	500	ml
	FCS	100	ml
	BME	5	ml
	Penicillin / Streptomycin	5	ml
	Humaner Urin	10	ml
	Auf pH 5,5 einstellen		
THP1-Medium	RPMI-1640	500	ml
	FCS	50	ml
	Sodium Pyruvat (100 mM)	5	ml
	Penicillin / Streptomycin	5	ml
	L-Glutamin (200 mM)	5	ml

### 2.1.7 Stammlösungen und Testsubstanzen

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Stammlösungen und Testsubstanzen

Stammlösung / Testsubstanz		Lösemittel
Ampicillin	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O
Kanamycin	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O
PMSF	0,1 M	EtOH
IPTG	1 M	H <sub>2</sub> O
GNF-6702	10 mM	DMSO
Miltefosine	10 mM	H <sub>2</sub> O
Amphotericin B	10 mM	DMSO
Bortezomib	10 mM	DMSO
ONX-0914	10 mM	Caprisol
MG-132	10 mM	DMSO

### 2.1.8 Standards

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Längen- und Molekulargewichtsstandards

Name	Hersteller
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler™ 100 b DNA Ladder	Thermo Scientific

### 2.1.9 Vektoren

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Name	Genotyp / Phänotyp	Hersteller
pCR2.1-TOPO	High copy, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Invitrogen
pET28a (+)	Low copy, His-Tag, Kan <sup>R</sup>	EMD Biosciences
pQE41	His-Tag, Amp <sup>R</sup>	E. Abass (AG Prof. Dr. U. Steinhoff)

### 2.1.10 Primer

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primer

Verwendung	Sequenz
Forward Primer für die Klonierung von KLi8.3 in pCR2.1	5'-GAGCTCGCAACCGAGTGGGAGG-3'
Reverse Primer für die Klonierung von KLi8.3 in pCR2.1	5'-GCTCCGCAGCGCTCC -3'
Forward Primer für die Subklonierung von KLi8.3 in pET28a	5'-GTACATATGGAGCTCGCAACCGAGTGGGAGGACGCA -3'
Reverse Primer für die Subklonierung von KLi8.3 in pET28a	5'-TACCTCGAGCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTACTCCGCAG C-3'
Forward Primer für die Subklonierung von KLi8.3 in pET28a ( <i>L. archibaldi</i> )	5'-GTACATATGGAGCTCGCA ACCGAGTGGGAG -3'
Reverse Primer für die Subklonierung von KLi8.3 in pET28a ( <i>L. archibaldi</i> )	5'-TACCTCGAGTGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTACTCCGCAGC -3'
Forward Sequenzierprimer (M13) für den pCR2.1 Vektor	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
Reverse Sequenzierprimer (M13) für den pCR2.1 Vektor	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Forward Sequenzierprimer (LacO) für den pET28a Vektor	5'-GGGAATTGTGAGCGGATAACA ATTCCCC-3'
Reverse Sequenzierprimer (T7) für den pET28a Vektor	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Forward β4 Subunit	5'-ATGGCGGAGACTGCGATTGCGTT-3'
Reverse β4 Subunit	5'-CTAGTGCACCGCCGTGATGACCT-3'
Forward β5 Subunit	5'-ATGTTGCTGATTCGAGTCCG-3'
Reverse β5 Subunit	5'-CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGT-3'

Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH synthetisiert. Nach Angaben des Herstellers wurden die lyophilisierten Oligonukleotide in sterilem Wasser gelöst (100 pmol/μl). Aus dieser Stammlösung wurden Arbeitslösungen mit Konzentrationen von 10 pmol/μl hergestellt.



### 2.1.11 Antikörper

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörper

Name	Hersteller
Peroxidase-conjugated Rabbit-Anti-Dog IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Peroxidase-conjugated Donkey-Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Mouse-Anti-PentaHis antibody	Qiagen
Peroxidase-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG	Pierce

### 2.1.12 Leishmanien-Stämme

Promastigote Leishmanien wurden vom Labor für Parasitologie - Mykologie des Universitätskrankenhauses von Montpellier (Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Leishmanien-Stämme

Stamm	Geografische Herkunft	Referenzcode / Isolat
<i>L. donovani</i> 2349	Sudan	IORI/SD/91/D43
<i>L. donovani</i> 2133	Sudan	MHOM/SD/90/D56
<i>L. donovani</i> 1791	Äthiopien	MHOM/ET/89/450
<i>L. donovani</i> 0703	Indien	MHOM/IN/80/DD8
<i>L. archibaldi</i> 3463	Sudan	MHOM/SD/97/LEM3463
<i>L. archibaldi</i> 2350	Sudan	IORI/SD/91/D27
<i>L. archibaldi</i> 3475	Sudan	MHOM/SD/97/LEM3475
<i>L. infantum</i> 0494	Sudan	MHOM/SD/82/GILANI
<i>L. infantum</i> 0235	Tunesien	MHOM/TN/80/IPT1
<i>L. infantum</i> 0461	Algerien	MHOM/DZ/83/LIPA120
<i>L. infantum</i> 0108	Frankreich	MHOM/FR/79/LEM108
<i>L. chagasi</i> 0590	Brasilien	MHOM/BR/74/M2682
<i>L. major</i> 2009	Israel	MHOM/IL/81/FEBNI
<i>L. donovani</i> LO8	Sudan	Sudanesisches Isolat

### 2.1.13 Bakterien-Stämme

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Bakterien-Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Hersteller
BL 21 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rBmB-) gal dcm (DE3)</i>	Invitrogen
BL21 pLysS	<i>F- ompT hsdS B (r B -m B -) gal dcm (DE3) pLysS (Cam R)</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> NEB® Stable (C3040H)	<i>F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMSmcrBC)</i>	BioLabs
HB101	<i>F-, thi-1, hsdS20 (rB-, mB-), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (strr), xyl-5, mtl-1.</i>	Promega

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Hersteller
MAX Efficiency™ Stbl2™	<i>F</i> - <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA</i> <i>Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) λ</i>	Invitrogen
NEB® 5-alpha F'I q Competent <i>E. coli</i> (C2992H)	<i>F'</i> <i>proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) / fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i> <i>endA1 thi-1 hsdR17</i>	BioLabs
One Shot™ Stbl3™	<i>F mcrB mrrhsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 supE44 ara-14 galk2 lacY1</i> <i>proA2 rpsL20(Str<sup>R</sup>) xyl-5 λ-leumtl-1</i>	Invitrogen
One Shot™ TOP10	<i>F</i> - <i>mcrA Δ( mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1</i> <i>araD139 Δ( araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
SURE2 Supercompetent Cells	<i>e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F'</i> <i>proAB lacIqΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]</i>	Agilent Technologies

### 2.1.14 Referenzsequenzen aus der Datenbank

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Referenzsequenzen aus der Datenbank

Sequenznummer	Spezies	Herkunft
DQ831678	<i>L. donovani</i> LdK39	Sudan
HM594686	<i>L. donovani</i> rK28	Sudan
AY615886.1	<i>L. donovani</i> KE16	Indien
AB256033	<i>L. donovani</i>	Indien, Bangladesch
KM265138	<i>L. donovani</i>	Indien
FR799601	<i>L. donovani</i>	Nepal
DQ648599	<i>L. donovani</i> Morena	Indien
KC788285.1	<i>L. donovani</i> KLO8	Sudan
L07879.1	<i>L. infantum</i> rK39	Brasilien
XM_001464261	<i>L. infantum</i> LcK39	Brasilien

### 2.1.15 Software und Programme

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Software und Programme

Programm	Anbieter / Link
Bioinformatics.org	<a href="https://www.bioinformatics.org/">https://www.bioinformatics.org/</a>
Clustal Omega	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo</a>
Excel	Microsoft Corporation
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	<a href="https://web.expasy.org">https://web.expasy.org</a>
GraphPad Prism8, GraphPad Prism9	GraphPad Software
IEDB Analysis Resource	<a href="http://tools.immuneepitope.org">http://tools.immuneepitope.org</a>
JalView	<a href="https://www.jalview.org">https://www.jalview.org</a>
MedCalc	<a href="https://www.medcalc.org">https://www.medcalc.org</a>
NCBI BLAST®	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Prisma QuickCalcs	<a href="https://www.graphpad.com/quickcalcs/">https://www.graphpad.com/quickcalcs/</a>
SnapGene®	Insightful Science
Tandem Repeat Finder	<a href="https://tandem.bu.edu/trf/trf.advanced.submit.html">https://tandem.bu.edu/trf/trf.advanced.submit.html</a>
MARS Data Analysis Software	BMG Labtech

2.1.16 Seren

2.1.16.1 Humane Serumproben

Es wurden insgesamt 395 humane Serumproben, darunter VL-positive und -negative sowie andere Infektionen aus Afrika (n=335), Indien (n=30), Südamerika (n=20) und Europa (n=10) untersucht. Die Seren aus Ostafrika wurden im Labor für biomedizinische Forschung der Ahfad-Universität (Omdurman, Sudan) gesammelt und bei -20°C gelagert. VL-Patienten (n=172) wurden durch Lymphknotenaspiration bestätigt und die negativen Kontrollproben (n=85) wurden von gesunden Personen im Dorf Doka (VL-Endemiegebiet) gesammelt. Zu den Kontrollseren aus Ostafrika wurden Malaria (MA, n=5) und Tuberkulose (TB, n=26) untersucht. Die Seren aus Indien beinhalten VL (n=19), endemische Kontrollen (n=9), MA (n=1) und Toxoplasmose (TX, n=1) und wurden in Bihar, Nordindien, gesammelt. VL wurde durch gefärbte Milzausstriche und TX durch spezifische Antikörperfärbung diagnostiziert. Alle anderen Seren wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland, charakterisiert und zur Verfügung gestellt, darunter Seren von VL- (n=8), KL (n=14), Chagas- (n=8), Schistosomiasis- (n=7), Amöbiasis- (n=2), Echinokokkose- (n=3), Trichinose- (n=3), MA- (n=5) und TX-Patienten (n=19). Außerdem wurden Seren von 10 nicht-endemischen Kontrollen (NEC) aus Deutschland in die Tests einbezogen. Alle Seren wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 17: Herkunft, Anzahl und Charakterisierung der Humanserumproben

Herkunft (Land)	Anzahl Seren	Klinischer Fall	Eigenschaften	Klassifizierung
Sudan	288	VL (n = 172)	Die Diagnose basiert auf dem Nachweis von Parasiten in gefärbten Lymphknotenabstrichen.	Bestätigte VL-Patienten
		EC (n = 85)	Aus dem gleichen VL-Endemiegebiet (Sudan).	
		MA (n = 5)	Die Diagnose erfolgte durch den Nachweis von Malaria-Parasiten in Blutabstrichen.	Negativkontrollen
		TB (n = 26)	Die Diagnose erfolgte durch den Nachweis von AFB der TB im Sputumabstrich.	
Deutschland	10	NEC (n = 10)	Nicht-endemische gesunde Freiwillige aus Deutschland.	

Herkunft (Land)	Anzahl Seren	Klinischer Fall	Eigenschaften	Klassifizierung
Indien	30	VL (n = 19)	Die Diagnose basiert auf dem Nachweis von Parasiten in gefärbten Lymphknotenabstrichen.	Bestätigte VL-Patienten
		EC (n = 9)	Aus dem gleichen VL-Endemiegebiet (Indien).	
		MA (n = 1)	Die Diagnose erfolgte durch den Nachweis von Malaria-Parasiten in Blutabstrichen.	Negativkontrollen
		TX (n = 1)	Die Diagnose erfolgte durch den Nachweis von Toxoplasmose-spezifischen Antikörpern.	

Abkürzungen: VL, Viszerale Leishmaniose; NEC, nicht-endemische Kontrollen; EC, endemische Kontrollen; MA, Malaria; TB, Tuberkulose; TX, Toxoplasmose; AFB, Acid Fast Bacilli.

**Tabelle 18: Anzahl der Humanserumproben**

Klinischer Fall (Parasit)	Anzahl Seren	Klassifizierung
VL ( <i>L. donovani</i> / <i>L. infantum</i> )	(n = 8)	Bestätigte VL-Patienten
KL ( <i>L. tropica</i> )	(n = 6)	
KL ( <i>L. braziliensis</i> )	(n = 2)	Negativkontrollen
KL ( <i>L. major</i> )	(n = 6)	
Chagas ( <i>T. cruzi</i> )	(n = 8)	
Schistosomiasis	(n = 7)	
Amöbiasis	(n = 2)	
Echinokokkose	(n = 3)	
Trichinose	(n = 3)	
Malaria	(n = 5)	
Toxoplasmose	(n = 19)	

Abkürzungen: VL, Viszerale Leishmaniose; KL, Kutane Leishmaniose; *L.*, *Leishmania*; *T.*, *Trypanosoma*

### 2.1.16.2 Hundeseren

Leishmanien infizierte bzw. negativ getestete Hundeseren (n=332) wurden von der Serumbank der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zagreb-Kroatien erhalten. Die Infektion von Hunden mit *L. infantum* wurde durch mikroskopische Analyse von Knochenmarkaspiraten oder IFAT bestätigt. Dies war das wichtigste Eignungskriterium für CVL-Serumproben, die in dieser Studie verwendet wurden.

Tabelle 19: Anzahl und Charakterisierung der Hundeserumproben aus Kroatien

Herkunft (Land)	Anzahl Seren	Klinischer Fall	Eigenschaften	Klassifizierung
Kroatien	332	CVL (n = 183)	Durch IFAT bestätigt	Bestätigte CVL-Hunde
		EC (n = 149)	Aus dem gleichen VL-Endemiegebiet (Kroatien)	Negativkontrollen

Abkürzungen: CVL, Canine Viszerale Leishmaniose; EC, endemische Kontrollen

### 2.1.17 Kommerzielle rekombinante Antigene und serologische Tests

#### 2.1.17.1 Rekombinantes Protein rK39

Das rekombinante Antigen rK39 von *L. infantum* wurde von Rekom Biotech, S.L., Granada Spanien, erworben. Es enthält 6.4 repetitive immunodominante Epitope des Kinesinproteins. Es wurde als 6x His-markiertes His-rK39-Fusionsprotein am C-Terminus des Kinesinproteins von *L. chagasi* mit 100%iger Identität mit der Referenznummer AAA29254.1 exprimiert. Die Proteinkonzentration wurde analog zum rKLi8.3 mit dem BCA-Protein-Assay (Thermo Fisher Scientific), bestimmt und das Protein wurde bei -80°C gelagert.

#### 2.1.17.2 rK39-Schnelltest (IT LEISH)

Für den Nachweis von VL-Antikörpern im Humanserum wurden IT LEISH-Dipstick-Kits von Bio Rad, Deutschland, verwendet. IT LEISH ist ein ICT, der das rekombinante Antigen K39 benutzt, um Antikörpern gegen *Leishmania spp.* nachzuweisen. Der Test wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Seren wurden als positiv bewertet, wenn eine dunkelviolette Bande sichtbar wurde. Die Kontrollbande muss immer vorhanden sein, um das Testresultat zu bestätigen. Wenn die Kontrollbande nicht vorhanden ist, galt der Test als ungültig. Die Proben mit ungültigen Ergebnissen wurden wiederholt.

#### 2.1.17.3 Kommerzielles ELISA-Kit *L. infantum* IgG (NovaLisa™ /TECAN™)

Die Mikrotiterplatten sind mit *Leishmania* Antigenen beschichtet, an die die Antikörper von VL-Patienten binden. Ungebundenes Probenmaterial wurde durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die gebundenen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wurde ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des

Konjugates entstanden sind, wurden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen. Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Schwefelsäure wurde hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Dadurch entsteht ein gelber Farbumschlag. Die Absorption bei 450/620 nm wurde mit einem ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät abgelesen. Es wurden die Ergebnisse der ELISA-Kits anhand der von den Herstellern empfohlenen Cut-off-Werte für den Antikörpernachweis ausgewertet. Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle. Anschließend wurden die Ergebnisse in Einheiten [U] berechnet:

$$[\text{Einheiten} = \text{Units} = \text{U}] = \frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut} - \text{off}}$$

**Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Antigene und serologischen Tests**

Test	Antigen	Parasit	Hersteller
rKLi6.3 ELISA	rKLi6.3	<i>L. infantum</i> LEM0494	Diese Arbeit
rKLi7.3 ELISA	rKLi7.3	<i>L. infantum</i> LEM0494	Diese Arbeit
rKLa8.3 ELISA	rKLa8.3	<i>L. archibaldi</i> LEM2350	Diese Arbeit
rKld8.3 ELISA	rKld8.3	<i>L. donovani</i> LEM2133	Diese Arbeit
rKLi8.3 ELISA	rKLi8.3	<i>L. infantum</i> LEM0494	Diese Arbeit
rKLi8.3 Prototyp ELISA	rKLi8.3	<i>L. infantum</i> LEM0494	NovaTecImmundiagnostica GmbH
rKLi8.3 Prototyp Lateral Flow Test	rKLi8.3	<i>L. infantum</i> LEM0494	Eurofins Ingenasa S.A.
rKLO8 ELISA	rKLO8	<i>L. donovani</i> LO8	E. Abass (AG Prof. Dr. U. Steinhoff)
rK39 ELISA	rK39	<i>L. infantum</i> LEM589	Rekom Biotech, Spanien
IT LEISH	rK39	<i>L. chagasi</i> BA-2	BIO-RAD, Frankreich
NovaLisa	<i>L. infantum</i> Lysat	<i>L. infantum</i>	NovaTec Immundiagnostica GmbH
TECAN	<i>L. infantum</i> Lysat	<i>L. infantum</i>	IBL International GmbH

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Kultivierung der Leishmanien

##### 2.2.1.1 Kultivierung promastigoter Leishmanien

Die promastigoten Leishmanien wurden auf Blutagarplatten kultiviert. Um diese herzustellen wurde Kaninchenblut mechanisch defibriniert. Das Fibrin wurde für 5 min auf 500 x g bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. 5 ml Blut wurden in einem frischen Falcon mit 5 ml NaCl (0,9 %) und 100 µl Penicillin/Streptomycin vermischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Parallel dazu wurde BHI-Agar in einem Wasserbad bei 55 °C erwärmt. Auf 10 ml Blut wurden 20 ml BHI-Agar gegeben und gut vermenget. Dieser Ansatz wurde zügig mit einer Mehrfachpipette auf eine 96-Well-Platte (50 µl/Well) gegeben. Die Platte wurde dabei in einem schrägen Winkel aufgestellt und nachfolgend 2 h bei RT ausgehärtet. Im Anschluss wurde die Platte, mit einem Deckel verschlossen, in einer sterilen Tüte verpackt und bei 4 °C gelagert. 1 ml Suspension von Promastigoten wurde in 9 ml Promastigotenmedium gegeben. Mit einer Multipipette wurden jeweils 100 µl des Gemischs in die Wells einer vorgewärmten Blutagarplatte überführt. Die Kultur wurde bei 27 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Vitalität der Kultur zu gewährleisten, wurden die Leishmanien-Stämme spätestens nach 7 Tagen passagiert, in der Regel lagen circa 4 Tage zwischen den Passagen. Hierzu wurden 16 Wells der alten Leishmanien-Kultur aus der Blutagarplatte entnommen und zusammen mit 9 ml frischem Promastigotenmedium in eine neue Blutagarplatte überführt.

##### 2.2.1.2 Transformation von promastigoten in amastigote Leishmanien

Um die promastigoten Leishmanien außerhalb der Wirtszelle *in vitro* zu Amastigoten (axenische Amastigote) zu transformieren, wurde zunächst die Zellzahl der entsprechenden Promastigoten-Kultur bestimmt. Die Zellzahl wurde auf  $6 \times 10^6$  eingestellt und nach Zentrifugation (10 min bei 4 000 rpm, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Amastigotenmedium aufgenommen und in weiteren 9 ml des Mediums in einer 25ml-Kulturflasche resuspendiert. Die Inkubation für die Transformation der Promastigoten erfolgte über mindestens 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2 Isolation genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Leishmanien-Kulturen mussten die Zellen zunächst geerntet werden. Dazu wurden die Leishmanien aus der Blutagarplatte entnommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Mit PBS wurde auf ein Volumen von 35-40 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 3800 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und auf ein Volumen von 40 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin erneut verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 min auf 13 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 20 µl abgenommen und der restliche Ansatz gevortext. 300 µl Zellyse-Puffer wurde hinzugefügt, gut resuspendiert und 1,5 µl RNAase A (10 mg/ml) wurde dem Ansatz hinzugefügt und gut gemischt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min im Wasserbad, danach 1 min auf Eis inkubiert. Es wurden 100 µl Protein-Präzipitations-Solution zugegeben, 30 s gevortext und wiederum 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min auf 13 000 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und 300 µl Isopropanol wurden hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen konnte die DNA-Fällung beobachtet werden. Diese wurde erneut für 5 min auf 13 000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 300 µl Ethanol (70 %) wurden hinzugefügt. Daraufhin fand erneut ein Zentrifugationsschritt statt. Der Überstand wurde verworfen und die DNA an der Luft getrocknet. Zum Eluieren der DNA wurden 100 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Die DNA wurde im Wasserbad bei 65 °C für 1 h inkubiert und die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem NanoDrop.

### 2.2.3 Bioinformatische Analyse von linearen B-Zell-Epitopen

In dieser Arbeit wurde das Antigenitätspotenzial von verschiedenen Kinesin-Antigenen untersucht. Dazu wurde die vollständige AS-Sequenz von Kinesin-Antigenen mit Hilfe der linearen Vorhersage von B-Zell-Epitopen durch das Programm BepiPred 1.0 mit einem Cut-off von 0,35 analysiert (Larsen et al. 2006). Die Darstellung der Antigenitätswerte wurde in der Programmierumgebung R v. 3.5.2 mit dem Paket ggplot2 v. 3.3.2 erstellt.



### 2.2.4 Kinesin-Sequenzanalyse von Parasitenisolaten

Das Muster der Kinesin-Variabilität wurde überprüft, um zu sehen, ob die Kinesin-Diversität innerhalb verschiedener Stämme einen Einfluss auf die Antigenität hat. Hierzu wurden über 53 Kinesin-Fragmente verschiedener *Leishmania*-Arten und -Stämme aus dem Sudan kloniert, sequenziert und bioinformatisch analysiert. Es wurde eine Homologie-Analyse durch BLAST-NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und Multiple Sequence Alignment mit dem Programm CLUSTAL-OMEGA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Jalview berechnet und dargestellt.

### 2.2.5 Molekulare Klonierung des KLi8.3-Gens

Das Genfragment, das die immundominanten Wiederholungen des *L. infantum*-Stammes (MHOM/SD/82/GILANI) aus Sudan kodiert, hier bezeichnet als KLi8.3, wurde aus gDNA von Promastigoten amplifiziert. Der Parasit wurde in RPMI-1640 mit L-Glutamin, NaHCO<sub>3</sub> und 10 % (v/v) FCS kultiviert und die gDNA wurde nach Standardprotokollen hergestellt (siehe 2.2.1.2). Die Vorwärts- (5'-GAGCTCGCAACCGAGTGGGAGG-3') und Rückwärts- (5'-GCTCCGCAGCGCGCTCC-3') PCR-Primer wurden entsprechend dem veröffentlichten *L. infantum* JPCM5 putative kinesin K39 (GenBank: XM\_001464261.2) entworfen. Die PCR-Reaktion wurde mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase durchgeführt. Die Reaktion wurde in insgesamt 50 µl durchgeführt, die 5 % (v/v) DMSO, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl GC-Puffer, 10 mM dNTPs-Mix und 200 ng gDNA enthalten. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 98 °C für 30 s, gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung bei 98 °C für 10 s, Annealing bei 71,1 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 60 s. Die amplifizierten Produkte zeigten mehrere Banden mit einer Größe, die 117 bp-Wiederholungen entspricht. Das größte Amplifikationsprodukt (1117 bp) wurde von Gel gereinigt und kloniert in einen pCR®2.1-TOPO Vektor. Kompetente Zellen aus *E. coli* HB101 wurden mit dem rekombinanten Plasmid pCR2.1/KLi8.3 transformiert. Die klonierte Sequenz wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Die Sequenz von KLi8.3 wurde analysiert, um TR mit dem Tandem-Repeat-Finder zu lokalisieren und anzuzeigen. Für die Expression des rekombinanten Polypeptids wurde die für KLi8.3-kodierende DNA-Sequenz in den His-tag-Vektor pET28a (+) subkloniert. Das DNA-Konstrukt pCR2.1/KLi8.3 wurde als Template verwendet mit den Vorwärts- (5'-GTACATATGGAGCTCGCAACCGAGTGGGAGGACGCA-3') und Rückwärtsprimern (5'-

TACCTCGAGCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTACTCCGCAGC-3') amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit Phusion Hot Start II DNA Polymerase gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit *NdeI* und *XhoI* Restriktionsenzymen verdaut und in-frame von 6× His-tag in die entsprechenden Stellen des Vektors pET28a (+) kloniert, um das Plasmidkonstrukt (pET28a/KLi8.3) zu erzeugen. Das rekombinante Plasmid wurde durch DNA-Sequenzierung und Restriktionsanalyse verifiziert und anschließend in NEB 5-alpha F'Iq Competent *E. coli*-Zellen transformiert.

### **2.2.6 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins rKLi8.3 in *E. coli***

Die Expression von rKLi8.3 in transformierten *BL21(DE3)* kompetenten *E. coli* wurde nach Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) und Inkubation für 3 h bei 37 °C und 200 U/min induziert. Nach dem Zentrifugieren (20 Min/ 4 °C/ 3500 rpm) wurden die Bakterienzellen in Lysepuffer (20 mM HEPES; 250 mM NaCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM KCl; 40 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert. Die Zelllyse wurde mit einem M-110L Microfluidizer® durchgeführt. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation (Sorvall LYNX600, 20 min/ 20 000 rpm/ 4 °C) gewonnen. Das Protein wurde über eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie mit HisTrap HP 5 mL Säule gereinigt. Das rKLi8.3-Protein wurde mit Elutionspuffer (20 mM HEPES; 250 mM NaCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM KCl; 500 mM Imidazol, pH 8,0) in einem Volumen von 10 ml eluiert. Das Eluat wurde mithilfe von Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-15 (mwco: 30 kDa) auf 2 ml konzentriert. Mit der Größenausschlusschromatographie wurden Verunreinigungen und eventuelle Aggregate entfernt. Die Chromatographie wurde mit Hilfe einer ÄKTaprime durchgeführt und die Säule (HiLoad 16/600 Superdex 200) mit PBS-Puffer äquilibriert. Proteinhaltige Elutionsfraktionen wurden gepoolt und gemäß den experimentellen Anforderungen auf 1 000–2 000 µl konzentriert. Das gereinigte rKLi8.3-Protein mit 393 AS und einem Molekulargewicht von 43,2 kDa wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Endkonzentration wurde mit dem BCA-Protein-Assay gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

### **2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse**

Bakterielle Extrakte, die das Plasmid pET28a/rKLi8.3 enthalten, wurden auf 12,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt und vor und nach (3 h) Induktion mit IPTG mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt. Die Reaktivität des rekombinanten Proteins rKLi8.3 wurde in einer Western-

Blot-Analyse mit gepooltem Serum von 10 Patienten mit bestätigter *L. donovani*-Infektion aus dem Sudan und gepooltem Serum von 10 gesunden Kontrollen (Sudan) untersucht. Daraufhin wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Transfermembran unter Verwendung von Bio-Rad Semi-dry Trans-Blot bei 200 mA für 1 h übertragen. Die Membran wurde dann mit 5% BSA (w/v) in 100 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (v/v) und 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 (Blocking-Puffer) blockiert und dann 18 h lang bei 4 °C mit entweder Patienten- oder Kontrollseren (1:1000 in Blocking Puffer) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Blots 1 h lang bei RT mit Peroxidase-konjugiertem Esel-Antihuman-IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) inkubiert (1:10000 Verdünnung). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels Chemilumineszenz.

### **2.2.8 ELISA-Entwicklung für den Nachweis von *Leishmania*-spezifischen Antikörpern in Menschen und Hunden**

Der ELISA wurde zur Bestimmung der Antikörper bei VL durchgeführt. Die ELISAs wurden mit MaxiSorp™ Polystyrol-ELISA-Platten mit hoher Proteinbindungskapazität durchgeführt. Die optimalen Beschichtungskonzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Antigene wurden durch Titrations ermittelt. Alle Antigene wurden in 0,1 M NaCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 9,6) in Mengen von 5 ng pro Well verdünnt. Die ELISA-Platten wurden mit den Antigenen beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20 gewaschen und dann mit 3 % (w/v) BSA (Menschen) oder 5 % (w/v) BSA (Hunde) im gleichen Puffer bei RT für 1 h geblockt. Nach weiteren Waschschritten wurden 50 µl positive oder negative Serumproben, die 1:800 verdünnt waren, in jedes Well gegeben und danach wurden die Platten 45 min lang bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden bei den Humanseren 50 µl/Well Peroxidase-konjugiertes AffiniPure Donkey Anti-Human IgG (H+L) (1:10000) und bei Hundeseren 50 µl/Well Peroxidase-konjugiertes Rabbit-Anti-Dog IgG (H+L) (1:10000) in jedes Well gegeben. Die Platte wurde daraufhin eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit Wasserstoffperoxid und TMB visualisiert. Die Reaktion wurde mit 2N Schwefelsäure nach 10 min Inkubation im Dunkeln gestoppt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 450/570 nm mit einem ELISA-Microreader gemessen. Jede Probe wurde doppelt und mindestens zweimal getestet und der Mittelwert wurde berechnet. Proben mit ungültigen oder widersprüchlichen Ergebnissen wurden wiederholt.

### 2.2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analysesoftware GraphPad Prism (GraphPad Prism Inc., San Diego, Ca) wurde zur Auswertung der Daten verwendet. Die Zuverlässigkeit der diagnostischen Tests wurde durch Bestimmung der Sensitivität, der Spezifität, des positiv prädiktivem (PPV) und negativ prädiktivem Wertes (NPV), der diagnostischen Effizienz (DEV) und des Cut off-Werts bewertet. Hierzu wurden folgende Standardformeln verwendet:

**Sensitivität:** Die Sensitivität eines Tests bezieht sich auf die Fähigkeit des Tests, die Patienten mit einer bestimmten Krankheit korrekt zu identifizieren.

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{TP}{TP + FN} * 100$$

**Spezifität:** Die Spezifität eines Tests definiert sich über die Fähigkeit des Tests, Patienten ohne die entsprechende Krankheit korrekt zu identifizieren.

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{TN}{TN + FP} * 100$$

**Positiv prädiktiver Wert:** Der positiv prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Krankheit vorhanden ist, wenn der Test positiv ist.

$$\text{PPV (\%)} = \frac{TP}{TP + FP} * 100$$

**Negativ prädiktiver Wert:** Der negativ prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Krankheit nicht vorhanden ist, wenn der Test negativ ist.

$$\text{NPV (\%)} = \frac{TN}{TN + FN} * 100$$

**Diagnostische Effizienz:** Die DEV kann Prognosewerte, Spezifität und Sensitivität umfassen. Die Werte der DEV quantifizieren die Brauchbarkeit eines Tests in Bezug auf eine bestimmte Krankheit.

$$\text{DEV (\%)} = \frac{TN + TP}{TP + FP + TN + FN} * 100$$

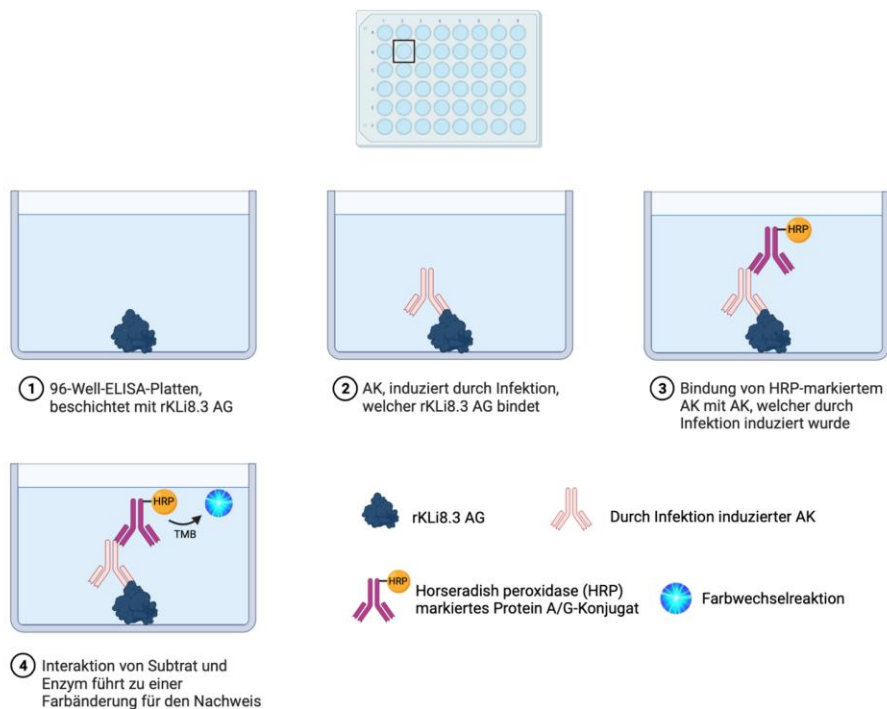
**Cut off-Wert:** Ein Cut-Off-Wert wird zur Einordnung von Messresultaten als positiv bzw. negativ geltende Werte verwendet. Die OD-Werte, die oberhalb eines Cut-Offs liegen, werden als positiv bewertet, die Werte unterhalb des Cut Offs werden als negativ eingestuft. Die Cut-off-Werte für jedes rekombinante Protein wurden als mittlere Absorptionswerte von 85 Seren gesunder Kontrollen aus dem Sudan plus 3 Standardabweichungen (SD) definiert.

$$\text{Cut off} = \text{durchschnittliche Absorption der Kontrollseren} + 3 \times \text{SD}$$

Mit Hilfe der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve kann die Aussagekraft von Testverfahren verglichen werden. Jedem möglichen Cut-off Wert kann eine Kombination aus Sensitivität und Spezifität zugeordnet werden. Diese Wertepaare werden in einem Diagramm aufgetragen und durch eine Linie verbunden, wodurch die sogenannte ROC-Kurve entsteht. Die x-Achse zeigt 1-Spezifität von 100 % bis 0 % und die y-Achse 1-Sensitivität von 0 % bis 100 %. Für die qualitative Bewertung des Testverfahrens wird die Area Under Curve (AUC) berechnet. Je höher der AUC-Wert (max. 1), d.h. je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist die Diskriminierungsfähigkeit des Testverfahrens. Die Messergebnisse und die ROC-Kurve wurden mit GraphPad Prism bei einem Konfidenzintervall von 95 % erstellt und ausgewertet.

### **2.2.10 Entwicklung und Evaluierung eines ELISA-Prototyps**

Gereinigtes rKLi8.3 wurde dem Hersteller, Golden Standard, zur Entwicklung von ELISA-Kits und Schnelltests zur Verfügung gestellt. Mittelstark bindende 96-Well-ELISA-Platten (Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurden mit 100 µl/Well von 1 µg/ml rKLi8.3-Antigen in Carbonat-Puffer (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten einmal mit 250 µl Wash-after-coat-Puffer (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach) gewaschen und mit Stabilisierungs- und Blocking-Puffer (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach) für 1 h bei RT geblockt. Nachdem die Platten 30 - 40 min bei 37 °C getrocknet wurden, wurden sie bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden 1:100 in Verdünnungspuffer (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) verdünnt. 100 µl/Well der verdünnten Proben wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von 3 Waschvorgängen mit Waschpuffer (0,2 M Phosphat, pH = 7,2; NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) und einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit 100 µl/Well einer titrierten Verdünnung eines mit HRP markierten Protein-A/G-Konjugats (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland). Nach 3 weiteren Waschvorgängen mit Waschpuffer wurden die Platten 15 min lang bei RT mit 3,3',5,5'-TMB-Substratlösung (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl/Well Stopplösung (0,2 mol/l Schwefelsäure; NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) gestoppt und durch Messung bei 450 nm in einem Plattenlesegerät (Anthos Labtec Instruments, Wals-Siezenheim, Österreich) ausgewertet.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des ELISA-Prototyps zum Nachweis von VL-Antikörpern mittels rKLi8.3.** (generiert von Thu Dinh, BioRender)

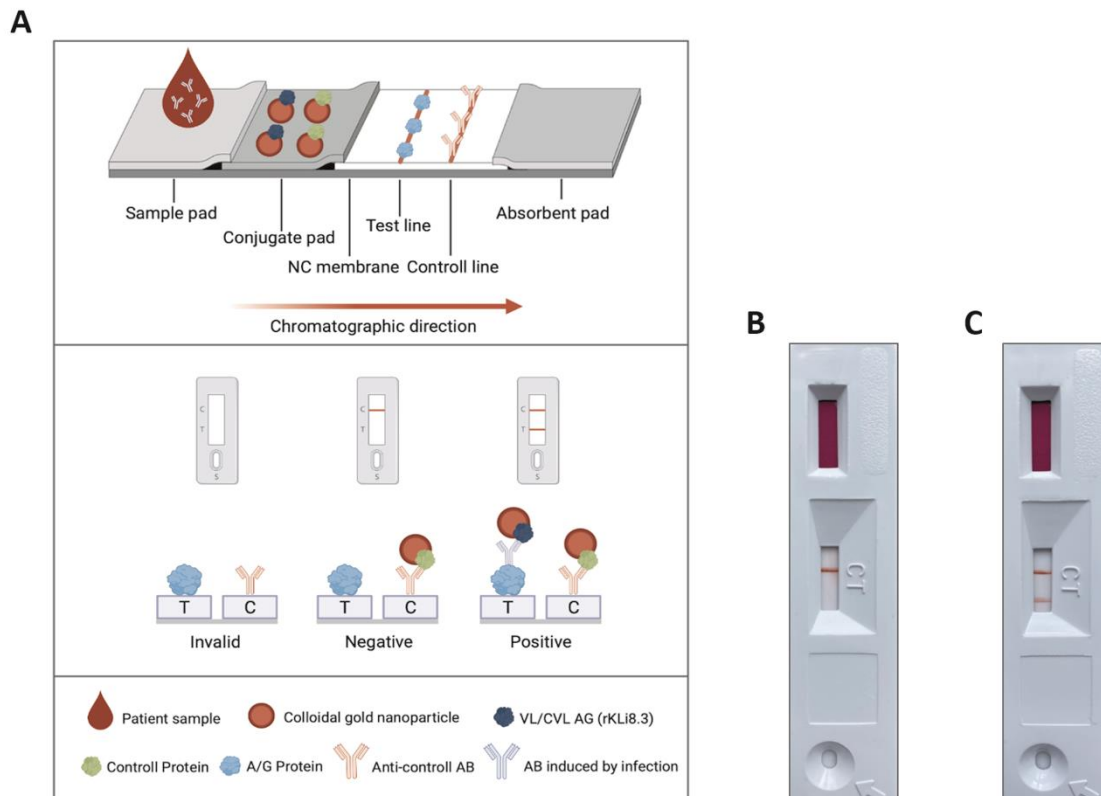
### 2.2.11 Entwicklung und Evaluierung eines Lateral Flow Test-Prototyps

Als Testreagenz wurde Protein A/G (Thermo) verwendet, das in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 mit Saccharose und Natriumazid verdünnt wurde. Als Kontrollreagenz diente ein monoklonaler Antikörper gegen ein Kontrollprotein, der in demselben Puffer verdünnt wurde. Beide Mischungen wurden in zwei parallelen Linien auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe einer Dispensierplattform (Matrix 1600, Kinematic Automation) aufgetragen. Die Membranen wurden 5 min lang bei 45 °C getrocknet, versiegelt und bei RT unter trockenen Bedingungen gelagert.

Als Test- und Kontrolldetektorreagenzien wurden VL/CVL-Antigene und ein Kontrollprotein an 40 nm große kolloidale Goldnanopartikel (AuNPs) gekoppelt. Die AuNPs wurden auf 1 OD in Boratpuffer pH 8,0 verdünnt, und die Zielproteine wurden der Mischung im selben Puffer zugesetzt. Die Partikel wurden 30 min lang unter Rühren mit den Proteinen inkubiert. Anschließend wurden die Partikel weitere 30 min bei 2500 xg zentrifugiert und in 20 mM Tris-HCl-Puffer mit Saccharose und BSA resuspendiert.

Für die Konjugatlösung wurden Test- und Kontroll-AuNPs gemischt, um eine Endkonzentration von jeweils 5 OD zu erreichen, und auf das Konjugatpad gegeben. Die

Konjugat-Pads wurden 30 min lang bei 45 °C getrocknet und bei RT unter trockenen Bedingungen gelagert. Die Chromatographiestreifen wurden zu Kassetten zusammengesetzt (EUROFINS INGENASA S.A.) (Abbildung 12). 20 µl Blut oder 10 µl Serum wurden in die Auftragszone gegeben. Nachdem die Probe vollständig absorbiert war, wurden 150 µl Laufpuffer (Tris-HCl pH 7,5, NaCl, BSA und NaN<sub>3</sub>) tropfenweise hinzugefügt. Die Ergebnisse wurden nach 10 min abgelesen.

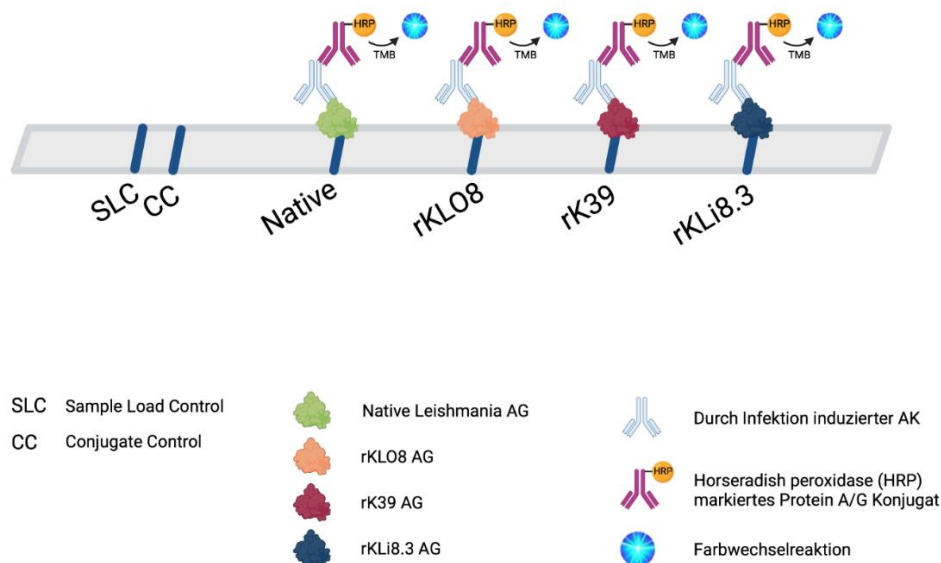


**Abbildung 12: Schematische Darstellung des indirekten LFA zum Nachweis von VL-Antikörpern.** (A) Das entwickelte Schnelltestschema für den Nachweis von IgG Anti-*Leishmania* (B) negative Probe und (C) Positive Probe. (generiert von Thu Dinh, BioRender)

### 2.2.12 Entwicklung und Evaluierung eines *Leishmania* Lineblot-Prototyps

Die quantitative immunoenzymatische Bestimmung von *Leishmania*-Antikörpern in Blutseren basiert auf einer Immunoblot-Technik im Lineblot-Format. Die rekombinanten Antigene rKLi8.3, rK39 und rKL08 sowie ein natives *Leishmania*-Antigen wurden mit einem Dispenser (FrontLine HR Mikroliterkontakt; BioDot, Irvine, CA, USA) auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Chicago, USA) gedruckt, zusammen mit einer Kontrolllinie für die Probenbeladung und für die Konjugatfunktion. Nach dem Trocknen

wurden die Membranen in 3 mm breite Streifen geschnitten und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Streifen in 1 ml Probenverdünnungspuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2; NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) äquilibriert. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und die Membranen wurden 1 h lang bei RT sanft geschüttelt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Waschpuffer (0,2 M Phosphat, pH = 7,2; NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) für jeweils 5 min wurden die Membranen mit 1 ml HRP-markiertem Protein A/G-Konjugat (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) bei RT für 30 min sanft schüttelnd inkubiert. Die Streifen wurden dreimal mit 1 ml Waschpuffer für 5 min gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch Inkubation der Membranen mit 1 ml 3,3',5,5'-TMB-Substratlösung (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Deutschland) für 15 min unter leichtem Schütteln bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von mindestens 1 ml destilliertem Wasser gestoppt. Nach Trocknung der Membranen für mindestens 30 min bei RT wurden die Streifen ausgewertet.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Lineblot-Prototyps zum Nachweis von VL Antikörpern.**

(generiert von Thu Dinh, BioRender)



### 2.2.13 Klonierung und Sequenzierung der proteasomalen $\beta$ 4- und $\beta$ 5-Untereinheiten

Die proteasomalen  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-UEs wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Forward und Reverse Primer für die Vervielfältigung können aus Tabelle 21 entnommen werden. Die Reaktion wurde in vier Ansätzen in einem Volumen von je 50  $\mu$ l durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet: Denaturierung bei 98 °C für 30 s, gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung bei 98 °C für 10 s, Annealing bei 68 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 60 s.

**Tabelle 21: Mastermix für den PCR-Ansatz der  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-Untereinheiten**

Mastermix (50 $\mu$ l Ansatz)	
Phusion Polymerase	0,5 $\mu$ l
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
5x Phusion GC-Puffer	10 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5 $\mu$ l
gDNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	26,5 $\mu$ l

Die amplifizierten Produkte zeigten Banden mit einer Größe, die 621 bp- ( $\beta$ 4-UE), beziehungsweise 909 bp-Wiederholungen ( $\beta$ 5-UE) entspricht. Die Amplifikationsprodukte wurden aus dem Gel gereinigt und in einen pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO Vektor kloniert. Kompetente Zellen aus *E. coli* C2992H wurden mit dem rekombinanten Plasmid pCR2.1/ $\beta$ 4- oder  $\beta$ 5-UE transformiert. Die klonierte Sequenz wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und durch Sequenzanalyse der Firma SeqLab bestätigt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über die Programme Reverse Complement und Expsy Translate Tool. Das Ergebnis war die AS-Sequenz der  $\beta$ 4- beziehungsweise der  $\beta$ 5-UEs, die daraufhin per SnapGene miteinander verglichen und dargestellt wurden. Die AS-Sequenzen der beiden UEs von *T. cruzi*, *T. brucei*, der Maus, dem Hund und des Menschen wurden über das Programm NCBI Blast bestimmt.

### 2.2.14 Messung der Proteasomaktivität

Um die Chymotrypsin-ähnliche proteolytische Aktivität des Proteasoms aus Zelllysaten zu messen, wurde die Spaltung eines fluorogenen Substrats (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC)

innerhalb der  $\beta$ 5-UE des Proteasoms detektiert. Zunächst mussten hierfür Lysate der zu untersuchenden Zellen hergestellt werden. Diese wurden für 12 min auf 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und 20 min auf Eis lysiert. Dabei wurde der Ansatz alle 2 min für etwa 20 s gevortext. Abschließend fand eine Zentrifugation für 13 min auf 10 000 x g bei 4 °C statt. Die Messung des Proteingehalts wurde anhand eines BCA-Assay durchgeführt. Die Messung der proteolytischen Aktivität erfolgte in einem Fluorometer unter Verwendung von schwarzen 96-Well-Platten mit einem Endvolumen von 100  $\mu$ l pro Well. Das jeweilige Zell-Lysat wurde hierfür im Proteasomassay-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 1-5 ng verdünnt und mit den verschiedenen Wirkstoffen in unterschiedlichen Endkonzentrationen (0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) für 2 h bei RT vorinkubiert. Daraufhin wurde das Substrat mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M pro Well zugegeben. Die Reaktion erfolgte über eine Dauer von 30 min bei 37 °C, bevor das Lumineszenz-Signal in einem FLUOstar Omega von BMG Labtech ausgewertet wurde (Anregung bei 355 nm / Emission bei 460 nm). Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 9 über die Funktion „Dose – Response – Inhibition; log(Inhibitor) vs. Response – variable slope“ erstellt.

### 2.2.15 Verdünnung der Testsubstanzen

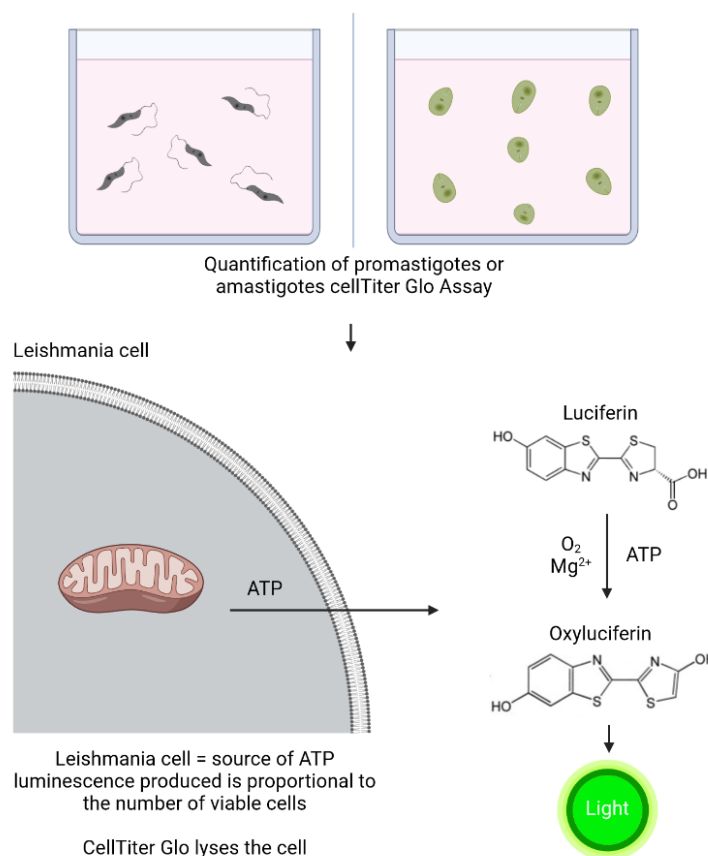
Die Testsubstanzen wurden in DMSO, H<sub>2</sub>O oder Caprisol gelöst und als 10 mM-Stock angesetzt. Für die Verdünnungsreihe (0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) wurde die jeweilige Testsubstanz mit dem Proteasomassaypuffer verdünnt. Die Endkonzentration von DMSO in den Ansätzen betrug  $\leq$  2 % (20  $\mu$ M  $\hat{=}$  2 %, 10  $\mu$ M  $\hat{=}$  1 %, 1  $\mu$ M  $\hat{=}$  0,1 %, 0,1  $\mu$ M  $\hat{=}$  0,01 %, 0,001  $\mu$ M  $\hat{=}$  0,0001 %).

### 2.2.16 Vitalitätsstudien mittels CellTiter Glo-Assay

Der CellTiter Glo-Assay von Promega basiert auf der Messung des intrazellulären ATPs, das als Indiz für metabolisch aktive Zellen dient. Die Zellen wurden hierfür in 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden und Deckel gegeben. Die Zellzahl wurde im Voraus bestimmt und dann auf  $1 \times 10^5$  Promastigote/Well,  $2,5 \times 10^5$  Amastigote/Well oder  $5 \times 10^4$  THP1/Well eingestellt. Die Zellen wurden 24 h lang mit der Verdünnungsreihe der verschiedenen Testsubstanzen vorinkubiert. Das Endvolumen betrug 100  $\mu$ l/Well. Anschließend wurden 50  $\mu$ l (10% v/v) CellTiter Glo zugegeben und die Kulturen wurden auf

einem Orbital-Shaker 2 min sanft geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und direkt im Anschluss vom FLUO-star Omega ausgelesen. Unbehandelte Kulturen und Wells ohne Zellen wurden als Kontrolle beziehungsweise Leerwert verwendet. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Für die Auswertung wurden die Daten in Excel überführt und prozentual umgewandelt, sodass die mit 0.001  $\mu\text{M}$  der Testsubstanz behandelten Kulturen 100 % der Zellvitalität darstellen. Alle Werte, die über 100 % oder unter 0 % betragen, wurden an 100 %, beziehungsweise 0 % angeglichen. Die Datenanalyse (Berechnung des Mittelwerts, des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) und des  $\text{LogIC}_{50}$ ) und die Graphen wurden mit der GraphPad Prism9- Funktion "Dose – Response – Inhibition;  $\log(\text{inhibitor})$  vs. Response – variable slope" durchgeführt. Sofern es sich nicht um einen sigmoidalen Kurvenverlauf handelte, wurden die  $\text{LogIC}_{50}$ -Werte annähernd mit der Excelfunktion „TREND“ berechnet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines CellTiter Glo-Assays.** (generiert von Thu Dinh, BioRender)

### 2.2.17 Parasite-Rescue-Transformation-Assay

Um die Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die Lebensfähigkeit intrazellulärer *L. donovani* zu untersuchen, wurden zwei Methoden, ein Digital-Image-Analysis-Direct-Counting-Assay mit einem mikroskopischen Objektträger aus Glas mit 12 Kammern und ein Parasite-Rescue-Transformation-Assay in einer 96-Well-Platte mit klarem, flachem Boden, durchgeführt.

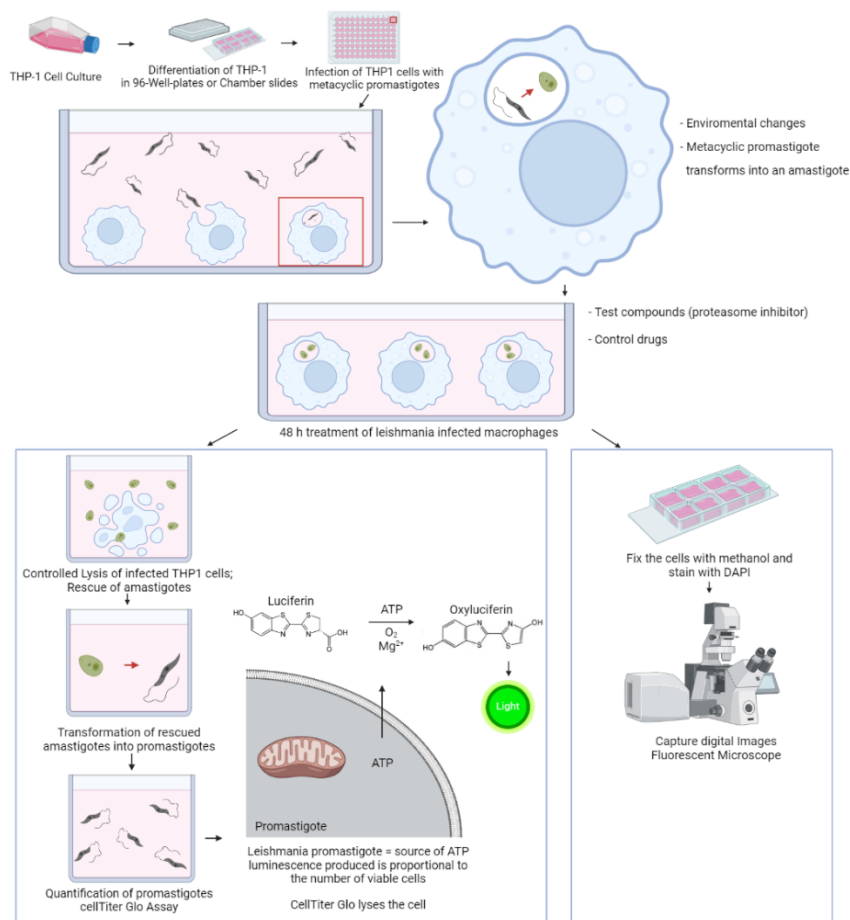
THP1-Zellen mit einer Zellzahl von  $2.5 \times 10^5$  Zellen/ml wurden durch Stimulation mit 25 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) zur Differenzierung angeregt. Von den PMA-behandelten Zellen wurden 200  $\mu$ l (96-Well-Platte) beziehungsweise 400  $\mu$ l (Objektträger) in die Wells pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 72 h, um eine vollständige Differenzierung der Zellen zu ermöglichen. Für die Infektion der Makrophagen wurde eine sieben Tage alte, promastigote Leishmanien-Kultur mit einer Zellzahl von  $2.5 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Die Platte und der Objektträger wurden einmal mit serumfreiem RPMI-1640-Medium gewaschen und anschließend mit 200  $\mu$ l (96-Well-Platte) beziehungsweise 400  $\mu$ l (Objektträger) der Leishmanien-Kultur versetzt. Die Infektion erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach Ablauf dieser Frist wurden die Zellen 5x mit serumfreiem RPMI-1640-Medium gewaschen, um alle extrazellulären Parasiten zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor (GNF-6702, ONX-0914) in fünf verschiedenen Konzentrationen (0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) behandelt. Die Stock-Lösung der Inhibitoren wurde dabei in THP1-Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Das Endvolumen betrug bei 96-Well-Platten 100  $\mu$ l, bei Objektträger mit Kammern 200  $\mu$ l. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 h. Danach wurden die Zellen 3x mit serumfreiem RPMI-1640-Medium gewaschen.

Für den Digital-Image-Analysis-Direct-Counting-Assay wurden die Kunststoffkammern des Objektträgers abgezogen und die Zellen für 30 s mit Methanol fixiert. Nach Trocknung des Objektträgers wurden die Zellen für 15 min im Dunkeln mit Hoechst 33342 gefärbt (5  $\mu$ g/ml in PBS) und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung wurden die Objektträger mit Deckgläsern in Mountingmedia versiegelt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Leica DMI 6000 unter Verwendung des DAPI-Filters mit 40facher Vergrößerung (Emulsionsobjektiv). Digitale Bilder der Zellen wurden aufgenommen und anschließend mit ImageJ, einem Java-Bildverarbeitungsprogramm, ausgewertet. Die Makrophagen- (groß)

und Parasitenkerne (klein mit Kinetoplast) wurden ausgezählt und nach folgender Formel als Anzahl der Amastigote pro 100 transformierte THP1-Zellen angegeben.

$$\text{Amastigote} / 100 \text{ THP1-Zellen} = \frac{\text{Anzahl Amastigotenkerne}}{\text{Anzahl Makrophagenkerne}} * 100$$

Für den Parasite-Rescue-Transformation-Assay wurden die gewaschenen Zellen der 96-Well-Platte mit 20 µl RPMI-1640-Medium, das 0.05% SDS enthielt, lysiert. Hierdurch werden die Makrophagen aufgeschlossen und die darin befindliche Amastigoten befreit. Nach 2 min auf dem Orbitalshaker wurde die Lyse durch Zugabe von 180 µl Promastigotenmedium gestoppt. Die Platte wurde für weitere 48 h bei 27 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um eine Transformation der Leishmanien zu Promastigoten zu initiieren. Nach der Transformation erfolgte die Messung des intrazellulären ATPs mittels des CellTiter Glo-Assays von Promega (100 µl CellTiter Glo auf 200 µl K).



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des Digital-Image-Analysis-Direct-Counting-Assays und des Parasite-Rescue-Transformation-Assays.** (generiert von Thu Dinh, BioRender)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Entwicklung einer hochsensitiven und spezifischen Serodiagnostik für Viszerale Leishmaniose

##### 3.1.1 Variabilität des Kinesins in Leishmanien

Um die Kinesin-Variabilität zwischen unterschiedlichen Leishmanienstämmen zu analysieren und zu prüfen welchen Einfluss die Kinesin-Diversität auf die Antigenität hat, wurden über 53 Kinesin-Konstrukte verschiedener *Leishmania*-Arten und -Stämme aus dem Sudan kloniert, sequenziert und bioinformatisch analysiert.

In Tabelle 22 sind die Kinesin-Polymorphismen zusammengefasst. Es wurden die Abweichungen zwischen den bereits etablierten Kinesinen KE16 (*L. donovani*, Indien), K39 (*L. infantum*, Brasilien) und KLO8 (*L. donovani*, Sudan) mit denen von *L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi* aus dem Sudan verglichen.

Zunächst wurde die nicht-repetitive Sequenz des Prärepeats verglichen (46 AS), die innerhalb verschiedener *Leishmania*-Stämme hoch konserviert ist. Nur bei Position 41 variierte die Sequenz von K39 und KE16 im Vergleich zu den ostafrikanischen Stämmen (Cys→Ser<sup>41</sup>).

Es konnte gezeigt werden, dass ostafrikanische Sequenzen mehrere Abweichungen im Vergleich zu rK39 aufweisen. Die meisten kodierenden Änderungen in der 5'-Hälfte der Wiederholungen waren nicht konserviert, wobei mehrere Substitutionen mit Ladungsänderungen einhergingen, während die AS-Substitutionen in der 3'-Hälfte der Wiederholungen meistens konserviert waren. Beim Vergleich der Kinesin-Wiederholungen (Tandemrepeats) ostafrikanischer Stämme mit der rK39-AS-Sequenz waren die Reste 4, 6, 16 und 18 von Substitutionen betroffen, die auch gleichzeitig mit Ladungsänderungen verbunden waren. Bei allen untersuchten Stämmen aus dem Sudan war die Diversität in der ersten Hälfte der Tandemrepeats (Reste 1-18) besonders bemerkenswert, da sie stets geladene AS enthielten. Es konnte gezeigt werden, dass in der zweiten Hälfte der Tandemrepeats ostafrikanischer Stämme die Sequenzen meist vollständig konserviert waren und hier keine Substitutionen mit Ladungsänderungen vorkamen.

Es wurden von rK39 abweichende Polymorphismen beobachtet, die nur in sudanesischen Isolaten vorkamen. Zum Beispiel Gln→Leu<sup>4</sup>, Gln→Arg<sup>4</sup>, Arg→Leu<sup>6</sup>, Ser→Leu<sup>8</sup>, Ala→Gly<sup>13</sup>, Ala→Lys<sup>16</sup>, Ser→Ala<sup>16</sup>, Gln→Glu<sup>18</sup> und Met→Thr<sup>27</sup>. KE16, rK39 und die ostafrikanischen Kinsesine wiesen eine gewisse Abweichung auf, z. B. bei den Resten 7, 10, 21, 23 und 39.

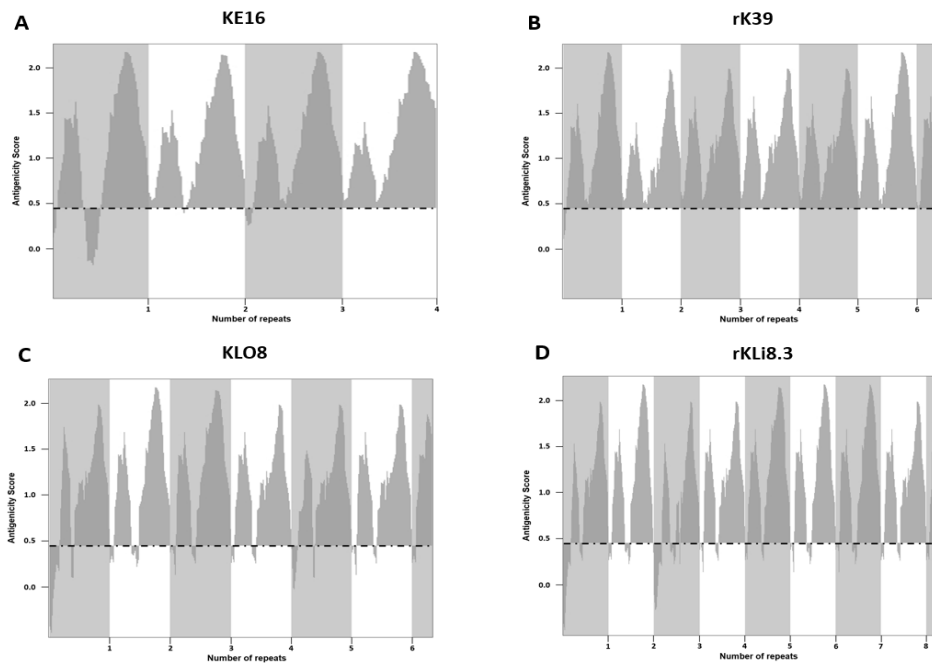
**Tabelle 22: Diversität der Aminosäuren innerhalb der Kinesin-Repeats bei ostafrikanischen *L. donovani*-, *L. archibaldi*- und *L. infantum*-Stämmen im Vergleich zu rK39 *L. chagasi* (Brasilien), KE16 *L. donovani* (Indien) und KLO8 *L. donovani* (Sudan)**

	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
KE16	C	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	M	R	K	L	E	A	T	A	A	A	K	S	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
					R		E		A	H							K	A	Q		S						T													A		
																A	S																									
rK39	C	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	A	T	A	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
							E		A												S		T				S										S				A	
KLO8	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	A	T	A	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
						L	E	L						G							S		T																			A
Sudanese <i>L. archibaldi</i>	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	A	T	A	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
						L	L	E		A				G							K	A	E		S		T														A	
Sudanese <i>L. donovani</i>	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	S	T	T	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
						L	L	E		A				G							K	A	E		A		A														A	
Sudanese <i>L. infantum</i>	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	S	T	T	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T		
						L	L	E		A				G							K	A	E		A		A														A	

P = Prä-Repeat-Region

### 3.1.2 Bioinformatische Vorhersage linearer B-Zell-Epitope

Mit Hilfe von *in silico*-Analysen wurden B-Zell-Epitopvorhersagen durchgeführt. So wurden in der repetitiven Region des Kinesins von *L. infantum* mehrere potenzielle B-Zell-Epitope identifiziert, die auf eine hohe Antigenität aufweisen. Auf der Grundlage dieser Analyse wurden 8,3 genomische Motive (rKLi8.3), die die repetitive Sequenz von 39 AS kodieren, für die rekombinante Expression ausgewählt. Eine BLASTn-Analyse dieser repetitiven Region zeigte, dass sie im Parasiten *T. cruzi*, der eng mit *Leishmania* verwandt ist, nicht vorkommen und auf eine Erreger-spezifische Region hinweisen. Der Einfluss der Kinesin-AS-Sequenz und der Anzahl der TR auf die Antigenität der B-Zellen wurde mit dem Programm zur Vorhersage linearer B-Zell-Epitope (BepiPred 1.0) analysiert; hier wurde KE16, rK39, rKLO8 und rKLi8.3, die jeweils 4; 6,4; 6,3 und 8,3 TR enthielten, miteinander verglichen. Die Analyse ergab, dass rKLi8.3 die höchste Punktzahl für B-Zell-Antigenität aufwies.



**Abbildung 16: Lineare Vorhersage von B-Zell-Epitopen.** Die Vorhersage wurde mittels BepiPred 1.0 mit einem Cut-off von 0,48 durchgeführt. Diagramme der Antigenitätswerte wurden in der programming environment R v. 3.5.2 unter Verwendung des Pakets ggplot2 v. 3.3.2 erstellt. Jedes der grau/weißen Kästchen stellt diesich wiederholenden Motiveinheiten von 39 Aminosäuren dies es Kinesins dar. Die Fläche unter der Kurve betrug bei KE16 117,6, bei rK39 184,5, bei rKLO8 172,3 und bei rKLi8.3 222,2.

### 3.1.3 Identifizierung und Charakterisierung von *KLi8.3*

Die Klonierung von repetitiven DNA-Sequenzen stellt aus verschiedenen Gründen eine Herausforderung dar. Daher wurden systematisch verschiedene Aspekte untersucht, wie die Amplifikation und Transformation von repetitiven DNA Sequenzen optimiert werden konnten. Hierzu wurden folgende Parameter getestet: Verschiedene PCR-Programme, unterschiedliche Annealingszeiten und -temperaturen, verschiedene Denaturierungstemperaturen, Primer mit unterschiedlichen Annealing-Stellen, verschiedene DNA-Konzentrationen und verschiedene kompetente *E-coli*-Zellen.

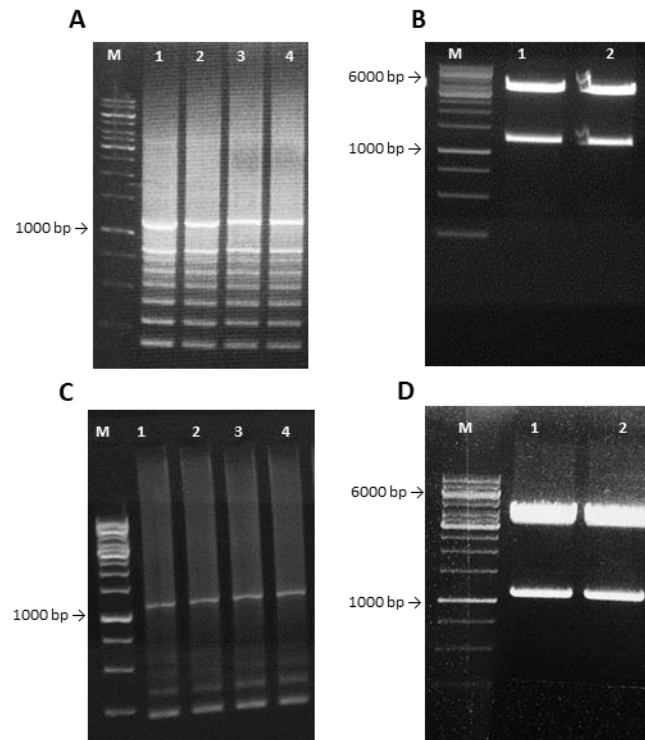
Die vollständige Nukleotidsequenz des *L. infantum* Kinesin-Gens (GenBank: XM\_001464261.2) hat 10830 bp und kodiert ein Protein mit 3609 AS, das in zwei verschiedene Abschnitte unterteilt ist: eine nicht-repetitive AS-Sequenz am Anfang des Proteins und eine repetitive Region, die TRs mit jeweils 39 AS enthält. Das Genfragment *KLi8.3*, das die immundominanten Wiederholungen des *L. infantum*-Stammes (MHOM/SD/82/GILANI) aus dem Sudan kodiert, wurde aus gDNA von Promastigoten amplifiziert und enthält 8,3 TR mit insgesamt 1117 Nukleotiden. Die amplifizierten



Produkte zeigten mehrere Banden mit einer Größe, die ein- bis mehrfachen 117bp-Wiederholung entsprachen. Das größte Amplifikationsprodukt (1117bp) wurde aus dem Gel gereinigt und in einen pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO Vektor kloniert. Zur Expression des rekombinanten Testantigens wurde die für *KLi8.3* kodierende DNA-Sequenz in den his-tag-Vektor pET28a (+) subkloniert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit *NdeI* und *XhoI* Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pET28a (+) kloniert.

Das rKLi8.3 hat einen offenen Leserahmen (ORF) mit 1182 Basenpaaren, die für 393 AS kodieren, was zu einem vorhergesagten Molekulargewicht von 43,2 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 4,30 führt. rKLi8.3-Protein weist 8,3 Einheiten mit 39 AS auf, wobei 83 % der Proteinsequenz aus repetitiven Motiven bestehen, während die restlichen 17 % aus dem Plasmid und einem kleinen Teil (46 AS) des nicht-repetitiven Teils des Kinesins (Prä-Repeat-region) stammen. Die Homologiesuche in der Proteindatenbank zeigte, dass das rKLi8.3-Protein konservierte Domänen hat, die eine signifikante Ähnlichkeit zu Kinesin-Proteinen von anderen Stämmen des *L. donovani*-Komplexes haben.

rKLi8.3 wies 93 % und 89 % AS-Identitäten mit den Kinesin-Proteinen rK39 von *L. infantum* aus Brasilien (GenBank: AAA29254.1) und rKE16 von *L. donovani* aus Indien (GenBank: AAT40474.1) auf. Diese beiden Proteine werden derzeit als kommerzielle diagnostischen Schnelltests für die VL verwendet. Interessanterweise wies rKLi8.3 eine 94 %ige Identität mit dem rKLO8 aus dem Sudan (GenBank: AGL98402.1) auf. Außerdem wurde eine Identität von 78 % mit dem rK28 Fusionsprotein (GenBank: ADR74368.1), einem synthetischen Proteinkonstrukt von *L. donovani* aus dem Sudan, gezeigt.



**Abbildung 17: Amplifikation und Klonierung von KLi8.3.** Das Genfragment KLi8.3 von *L. infantum* wurde amplifiziert und in pcDNA3.1(+) kloniert. (A) PCR-Produkte wurden durch Agarose-Elektrophorese getrennt und zeigten multiple Wiederholungsbanden, die 117 bp ähneln. (B) Plasmide pCR2.1/KLi8.3, geschnitten mit *Bam*HI und *Xho*I. (C) Amplifizierte DNA-Fragmente nach der Subklonierung-PCR. (D) Plasmide pET28a/KLi8.3, geschnitten mit *Xho*I und *Nde*I.

### 3.1.4 Analyse der Tandem-Repeats des Kinesin-Proteins rKLi8.3

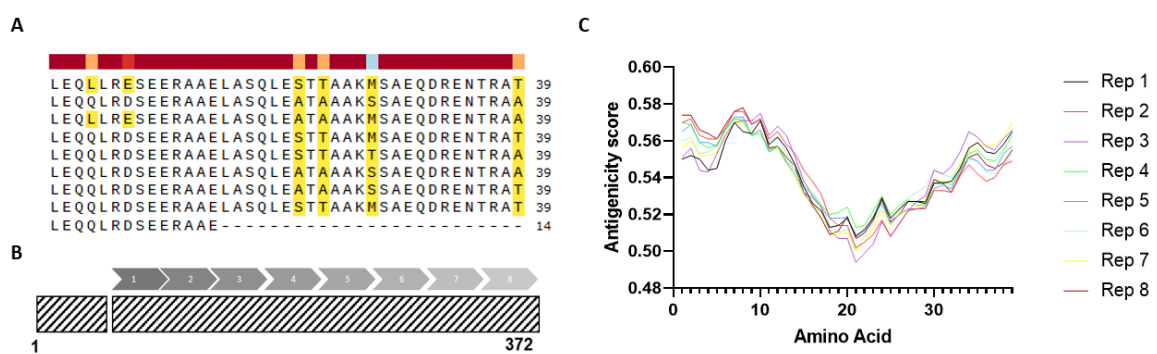
TRs sind hoch konservierte, repetitive Motive, die in Länge und Anzahl variieren. Proteine mit TR sind potenzielle Kandidaten für den Nachweis von Immunreaktionen gegen verschiedene Parasiten, einschließlich Leishmanien (Goto et al. 2007).

Die Sequenz von rKLi8.3 wurde analysiert, um TR mit dem Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) zu lokalisieren und anzuzeigen. Das Programm berechnet einen Alignment Score auf der Grundlage spezifischer Eigenschaften, wie Periodengröße der Wiederholung, Kopienzahl und Prozent der Ähnlichkeiten zwischen den Wiederholungen. Ein hoher TR-Score deutet darauf hin, dass das Gen eine große TR-Sequenz besitzt und dass die Wiederholung unter den Kopien hoch konserviert ist.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Wiederholung von 117 bp in allen VL-Stämmen enthalten ist. Diese 117 bp-Sequenz kodiert für ein Protein mit jeweils 39 AS. Die Kopienzahl der Wiederholungen variierte erheblich zwischen den verschiedenen Stämmen. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass der TR-Score von rKLi8.3 höher (1625) als der von rK39

(1276) und rKE16 (709) war. Die Anzahl der TR sowie hochkonservierte Sequenzen können die Bindung von Antikörpern an TR-Antigene beeinflussen. Aus diesem Grund schneidet rKLi8.3 mit einem höheren Score ab.

Anschließend wurde die Antigenität einzelner Repeats von rKLi8.3 nach der Methode Bepired Linear Epitope Prediction analysiert. Es wurde festgestellt, dass bei jedem Kinesin-Repeat ein identisches Antigenitätsmuster vorliegt. Die höchste Antigenität ist am Anfang und am Ende des Repeats. Betrachtet man dann die gesamte Sequenz, so befanden sich die Epitope für B-Zellen zwischen den Repeats.



**Abbildung 18: Analyse der Tandem-Repeats von rKLi8.3.** (A) Das repetitive Motiv von 39 Aminosäuren des Kinesins (rKLi8.3). (B) Eine schematische Darstellung des rKLi8.3-Proteins in voller Länge. Schraffierte Bereiche zeigen die vorhergesagten Coiled-Coil-Regionen an. Jedes der nummerierten grauen Kästchen (1 bis 8) repräsentiert die repetitiven Einheiten von 39 Aminosäuren dieses Kinesins. (C) Antigenität einzelner Repeats von rKLi8.3. Die höchste Antigenität wurde am Anfang und am Ende jedes Repeats vorhergesagt.

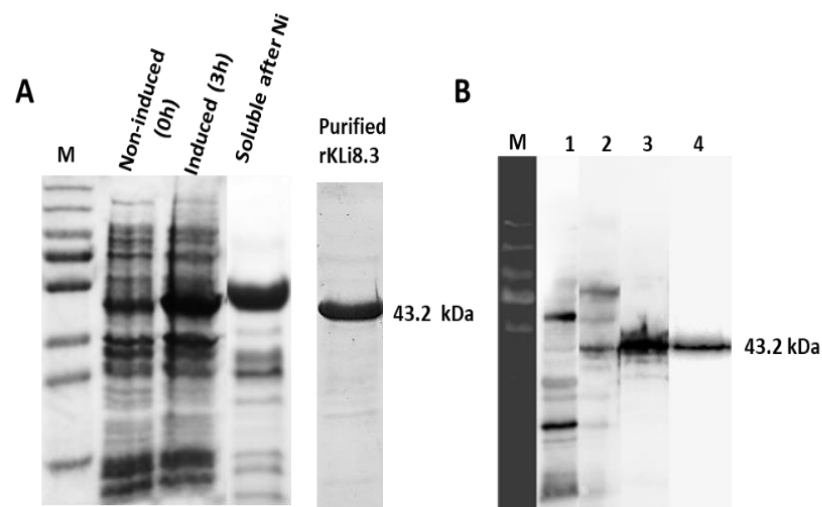
**Tabelle 23: Eigenschaften der Kinesin-Tandem-Repeats von *Leishmania***

Strains	Tandem-Repeats-Characteristics				
	GC (%)	Period Cycle (bp)	Copy no.	Similarity between repeats (%)	Score
<i>L. infantum</i> (rKLi8.3)	67	117	8.3	95	1625
<i>L. donovani</i> LO8 (rKLO8)	66	117	6.3	94	1299
<i>L. donovani</i> 1S	67	117	6.3	91	1213
<i>L. chagasi</i> BA-2 (rK39)	68	117	6.4	96	1276
<i>L. donovani</i> KE16 (rKE16)	68	117	4.0	91	709
			3.2	78	392
<i>L. donovani</i> DD8	66	117	3.1	77	356
		234	1.9	80	523
<i>L. donovani</i> Morena	67	117	3.9	92	798
<i>L. infantum</i> LON 49	68	117	3.0	92	575

### 3.1.5 Expression, Aufreinigung und Reaktivität von rKLi8.3

Das Konstrukt pET28a/rKLi8.3 wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Das rekombinante rKLi8.3-Protein wurde durch IPTG-Induktion exprimiert und wies einen hohen Grad an Solubilität auf. Nach der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie wurde das rKLi8.3-Protein mit einem hohen Reinheitsgrad erhalten. Wie in Abbildung 19 gezeigt, lag das Molekulargewicht des His-markierten Proteins bei 43.2 kDa.

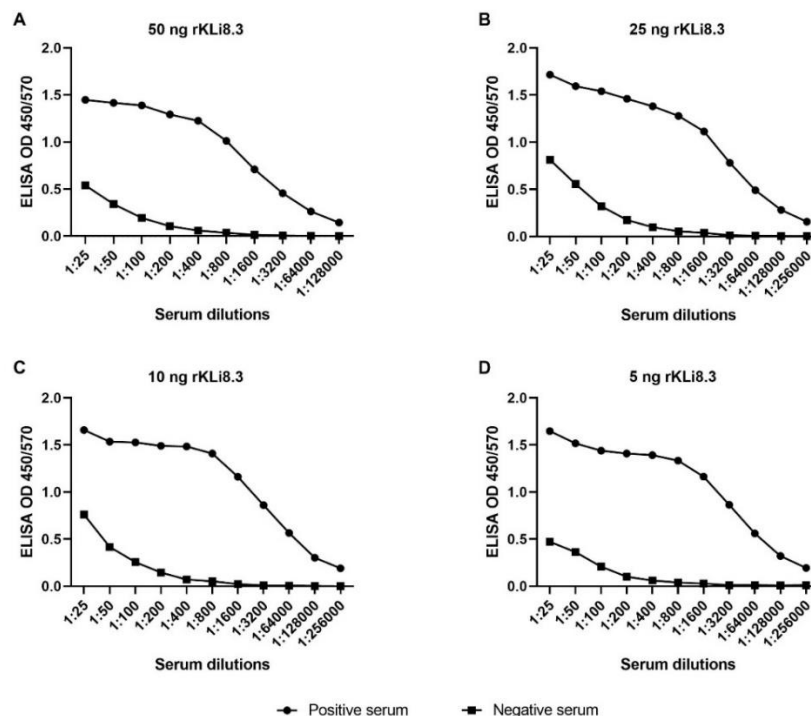
Die Reaktivität des rekombinanten Testantigens rKLi8.3 wurde im Western-Blot mit 10 gepoolten Seren von Patienten mit bestätigter *L. donovani*-Infektion und 10 gepoolten Kontrollseren gesunder Personen aus dem Sudan untersucht. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, wurde das rekombinante Protein von den positiven Seren erkannt (Spur 2 und 3), während die negativen Seren nicht erkannt wurden (Spur 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass das rekombinante Protein rKLi8.3 für den spezifischen Nachweis von VL-Antikörpern geeignet ist.



**Abbildung 19: Expression, Aufreinigung und Western-Blot-Analyse des rekombinanten Proteins rKLi8.3.** (A) Bakterienextrakte, die das Plasmid pET28a/rKLi8.3 enthalten, wurden auf 12%iger SDS-PAGE aufgetrennt und vor (0 h) und nach (3 h) Induktion mit IPTG mit Coomassie Blue gefärbt. rKLi8.3 wurde über eine Nickel-Säule mit anschließender Größenausschlusschromatographie (Äkta) aufgereinigt. (B) rKLi8.3-Reaktivität wurde durch WB-Analyse mit 10 gepoolten VL-Seren bestätigt. Spur 1: Lysate aus IPTG-induzierten Kulturen, geblottet mit negativen Seren; Spur 2: Lysate aus IPTG-induzierten Kulturen, geblottet mit positiven Seren; Spur 3: gereinigtes Protein mit positiven Seren; Spur 4: gereinigtes Protein mit Anti-His-Antikörper.

### 3.1.6 Etablierung des indirekten IgG-ELISA zum Nachweis von VL Antikörpern

Zur Etablierung eines ELISAs wurden Seren von VL-Patienten und Kontrollen zunächst gepoolt und im ELISA verwendet. Gleichzeitig wurde die optimale rKLi8.3 Konzentration zur Beschichtung (coating) der Platten durch Titration ermittelt. Alle Konzentrationen von rKLi8.3 reagierten mit den gepoolten VL-Seren und keine Kreuzreaktionen mit Kontrollseren gesunder Personen wurde beobachtet. Die ODs der VL-Seren waren mindestens 4-fach höher als bei den Kontrollseren. Titrationsanalysen zeigten, dass das Coaten mit 5 ng rKLi8.3/Loch und die Verwendung von 1:800 verdünnten Seren optimal sind. Diese Parameter wurden in den folgenden Experimenten angewandt.



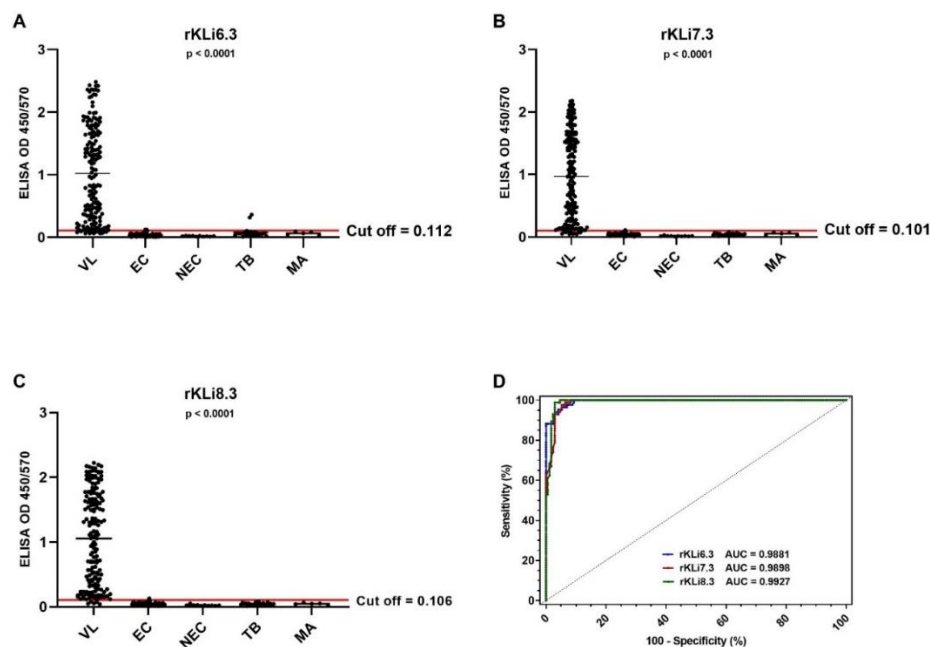
**Abbildung 20: Etablierung des indirekten IgG-ELISAs zum spezifischen Nachweis der Viszeralen Leishmaniose** Zur Bestimmung der optimalen ELISA-Bedingungen wurden 10 gepoolte VL-Seren oder 10 gepoolte gesunde Kontrollseren in serieller Zweifachverdünnung (1:25-1:25600) gegen verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Testantigens rKLi8.3 titriert. A: 50 ng/100  $\mu$ l, B: 25 ng/100  $\mu$ l, C: 10 ng/100  $\mu$ l, D: 5 ng/100  $\mu$ l. Die Seren wurden in Doppelbestimmung getestet und die Mittelwerte wurden berechnet.

### 3.1.7 Analyse der Tandem-Repeats in verschiedenen Leishmania Isolaten

#### 3.1.7.1 Einfluss der Anzahl der Tandem-Repeats auf die diagnostische Leistung

Um den Einfluss der Anzahl der TRs auf die Antigenität eines Kinesin-Proteins zu untersuchen, wurden rekombinante Kinesine aus *L. infantum* (rKLi) mit steigender Anzahl von TR exprimiert, gereinigt und hinsichtlich der Antikörperbindung im ELISA verglichen. Es wurden insgesamt 298 Patientenseren getestet. Davon stammten 10 Seren von freiwilligen Testpersonen aus Deutschland und wurden als NEC-Kontrollgruppe herangezogen. Die MA- und TB-positiven Serumproben wurden als Kontrollgruppe für mögliche Kreuzreaktionen beim diagnostischen Test verwendet.

Mit zunehmender Anzahl der TR (rKLi6.3, rKLi7.3 und rKLi8.3) stiegen Sensitivität und Spezifität von 92,44 % auf 97,10 % bzw. 96,82 % auf 99,20 %. Besonders auffällig war, dass die Zahl der falsch negativen Proben von 13 (rKLi6.3) auf 5 (rKLi8.3) abnahm. Die Analyse der ROC-Kurve bestätigte, dass rKLi8.3 im Vergleich zu rKLi7.3 und rKLi6.3 die beste diagnostische Leistung aufweist. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Anzahl der TR die Affinität zwischen Antigen und Antikörper beeinflusst.



**Abbildung 21: Einfluss von TRs auf die spezifische Antikörperbindung humaner Seren.** VL-Seren aus Ostafrika wurden auf Kinesinantigene mit unterschiedlicher Anzahl von TRs (A) rKLi6.3 (B) rKLi7.3 und (C) rKLi8.3 mittels ELISA getestet. Seren: VL (n = 172); EC (n = 85); NEC (n = 10); MA (n = 5); und TB (n = 26). OD Werte als Dots dargestellt. Der Cut-off Wert wurde aus dem Mittelwert der Absorptionswerte der 85 EC-Seren + drei Standardabweichungen berechnet. (D) ROC-Kurve für rKLi8.3, rKLi7.3, rKLi6.3.

Tabelle 24: Diagnostische Leistung der rKLi6.3-, rKLi7.3- und rKLi8.3-ELISAs für VL-Seren aus Sudan

ELISA Test	Cut-off	AUC	TP	FN	TN	FP	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
rKLi6.3	0.112	0.9881	159	13	122	4	92.44	96.82	97.54	90.37	94.29
rKLi7.3	0.101	0.9898	162	10	124	2	94.18	98.41	98.78	92.54	95.97
rKLi8.3	0.106	0.9927	167	5	125	1	97.10	99.20	99.40	96.15	97.98

### 3.1.7.2 Einfluss von Intra-Repeat-Variationen auf die diagnostische Leistung

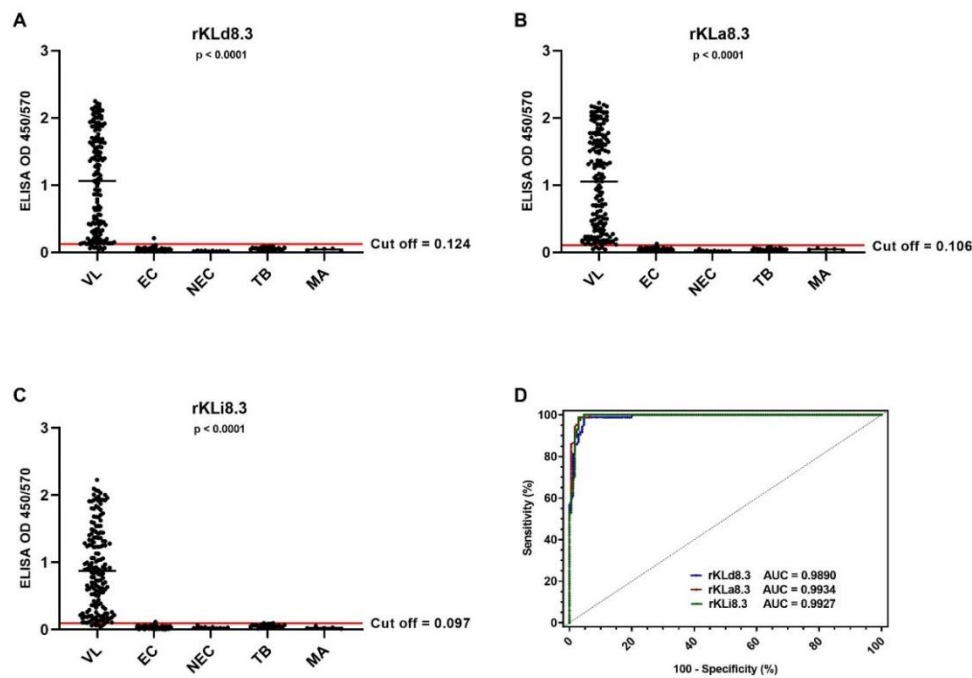
Um den Einfluss von Intra-Repeat-Variationen von Kinesinen auf die diagnostische Leistung der VL zu untersuchen, wurden Seren hinsichtlich der Bindung an rekombinante Kinesine unterschiedlicher *Leishmania*-Stämme aber gleicher Repeatanzahl im ELISA, getestet.

Zunächst wurde der Einfluss der Kinesin-Diversität auf der Sequenzebene untersucht. In Tabelle 25 ist die Diversität der AS innerhalb der Kinesin-TRs (1-39) bei rKLi8.3, rKLi8.3 und rKLa8.3 dargestellt. AS-Variationen innerhalb des TR wurden an bestimmten Positionen festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen die Variabilität der Kinesin TR verschiedener Spezies, die aus dem gleichen Endemiegebiet stammen.

Um diese Intra-Repeat-Variationen zu testen, wurden rekombinante Kinesine aus *L. infantum* (rKLi), *L. donovani* (rKLiD) und *L. archibaldi* (rKLa) mit gleicher Anzahl von TRs (8,3) exprimiert, gereinigt und hinsichtlich der Antikörperbindung im ELISA verglichen. Keines der Proteine zeigte Kreuzreaktionen mit MA- oder TB-Seren. Zur Bestimmung der FP und FN wurde für jedes Protein ein individueller cut-off Wert berechnet. Für den Vergleich der Antigenität wurden die prävalenzabhängigen und -unabhängigen Parameter, wie Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und DEV berechnet. Alle drei Proteine zeigten eine sehr gute diagnostische Leistung. Das Protein rKLi8.3 wies mit einer Sensitivität von 97.10 % und einer DEV von 97.98 % die besten Ergebnisse für die Diagnostik der VL auf.

Tabelle 25: Diversität der Aminosäuren innerhalb der Kinesin-TRs von rKLi8.3, rKLiD8.3 und rKLa8.3

	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
rKLi8.3	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	A	T	A	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T	
					L			E												S		T						S												A	
rKLiD8.3	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	S	T	T	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T	
					L			E		A							K	A	E		A		A					S													A
rKLa8.3	S	L	E	Q	Q	L	R	D	S	E	E	R	A	A	E	L	A	S	Q	L	E	S	T	T	A	A	K	M	S	A	E	Q	D	R	E	N	T	R	A	T	
					L			E														A		A				S													A



**Abbildung 22: Bindung von VL-Seren und Kontrollen (Sudan) mit Kinesinantigenen gleicher TR-Anzahl aber unterschiedlicher *Leishmania*-Stämme.** (A) rKd8.3 (B) rKLa8.3 und (C) rKLi8.3 wurden mittels ELISA getestet. Seren: VL (n = 172); EC (n = 85); NEC (n = 10); MA (n = 5); und TB (n = 26). (D) ROC-Kurve für rKd8.3-, rKLa8.3- und rKLi8.3-ELISA. OD Werte als Dots dargestellt. Der Cut-off Wert wurde aus dem Mittelwert der Absorptionswerte der 85 EC-Seren + drei Standardabweichungen berechnet.

**Tabelle 26: Diagnostisches Potential des rKd8.3-, rKLa8.3- und rKLi8.3-ELISAs für VL im Sudan.**

ELISA Test	Cut-off	AUC	TP	FN	TN	FP	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
rKd8.3	0.124	0.9890	164	8	125	1	95.35	99.20	99.39	93.98	96.97
rKLa8.3	0.097	0.9934	166	6	125	1	96.51	99.20	99.40	95.41	97.65
rKLi8.3	0.106	0.9927	167	5	125	1	97.10	99.20	99.40	96.15	97.98

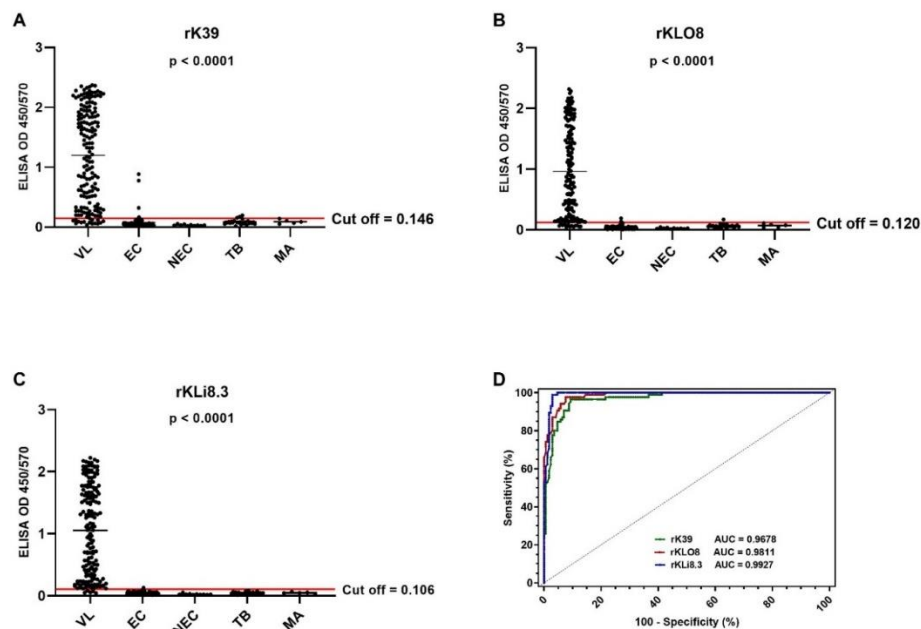
### 3.1.8 Diagnostische Leistung verschiedener Antigene in Sudan und Indien

#### 3.1.8.1 Serodiagnostische Leistung der rKLi8.3, rKLO8- und rK39-ELISAs im Sudan

Die Antikörperreaktionen auf die rekombinanten Proteine rK39, rKLO8 und rKLi8.3 wurden mittels ELISA mit Seren von VL- und Kontrollpatienten (EC, NEC, TB und MA) aus dem Sudan verglichen. Für die getesteten Antigene wurden die Sensitivität, Spezifität, der PPV und der NPV sowie die DEV bestimmt (Tabelle 27). Die Ergebnisse zeigten, dass Anti-*Leishmania*-Antikörper mit allen drei Proteinen nachgewiesen werden konnten, jedoch mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität. Der rK39-ELISA zeigte eine Sensitivität und Spezifität von 91,28 % bzw. 93,65 %. Beim rKLO8-ELISA wurde eine ähnliche Sensitivität



(92,44 %), aber eine höhere Spezifität (97,62 %) festgestellt, während die Sensitivität und Spezifität von rKLi8.3 97,1 % bzw. 99,2 % beträgt. Die Anzahl der FN wurde von 15 (rK39) auf 5 (rKLi8.3) und die Anzahl der FP von 8 (rK39) auf 1 (rKLi8.3) reduziert (Tabelle 27). Im Gegenteil zu rK39 und rKLO8 zeigten keine der Kontrollseren (TB und MA) eine Kreuzreaktion mit rKLi8.3. Die diagnostische Effektivität nimmt somit von rK39 über rKLO8 bis rKLi8.3 (92.28 %, 94.63 % bzw. 97.98 %) zu. Die Analyse der AUC-Werte anhand von ROC-Kurven (Abbildung 23, D) bestätigte die bessere Leistung des rKLi8.3-Antigens (AUC = 0,9927), was darauf hindeutet, dass eine Serodiagnostik mit rKLi8.3 besser VL-Patienten mit niedrigen Antikörpertitern erkennt und zwischen VL und anderen Infektionen unterscheidet.



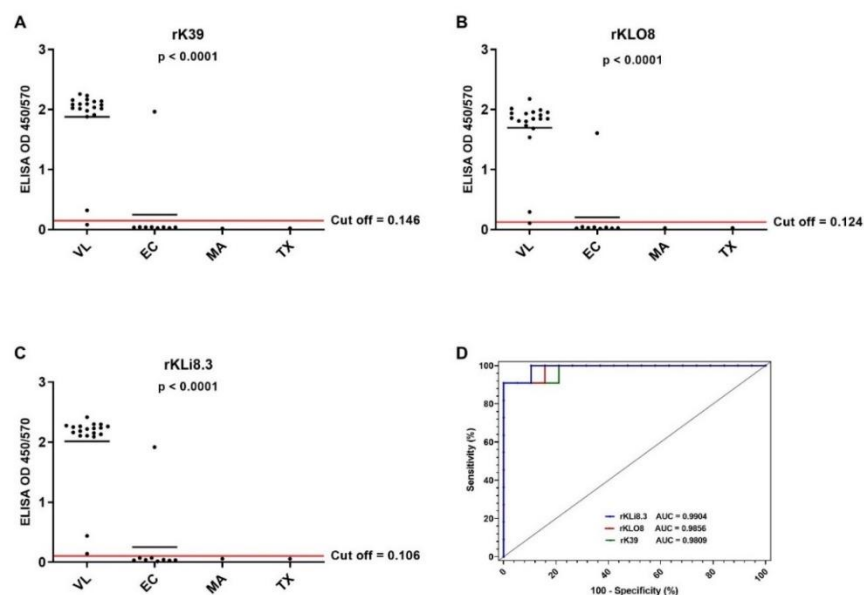
**Abbildung 23: Antikörperreaktion humaner Seren (Sudan) mit unterschiedlichen Kinesinantigenen.** Antikörperantworten von VL-Seren aus Ostafrika auf (A) rK39 (B) rKLO8 und (C) rKLi8.3 wurden mittels ELISA getestet. Seren: VL (n = 172); EC (n = 85); NEC (n = 10); MA (n = 5); und TB (n = 26). (D) ROC-Kurve für rK39-, rKLi8.3-, und rKLO8- ELISA. Der Cut-off Wert wurde aus dem Mittelwert der Absorptionswerte der 85 EC-Seren + drei Standardabweichungen berechnet.

**Tabelle 27: Diagnostisches Potential des rK39-, rKLO8- und rKLi8.3-ELISAs für VL im Sudan**

ELISA Test	Cut-off	AUC	TP	FN	TN	FP	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
rK39	0.146	0.9678	157	15	118	8	91.28	93.65	95.15	88.72	92.28
rKLO8	0.124	0.9811	159	13	123	3	92.44	97.62	98.15	90.44	94.63
rKLi8.3	0.106	0.9927	167	5	125	1	97.10	99.20	99.40	96.15	97.98

### 3.1.8.2 Serodiagnostische Leistung der rKLi8.3, rKLO8- und rK39-ELISAs in Indien

Analog zu den Patientenproben aus dem Sudan, wurden auch Patientenserum aus Indien getestet. Die Antikörperreaktionen wurden anhand von VL- und Kontrollpatienten (EC, TX und MA) verglichen. Die Werte der Sensitivität, Spezifität, der PPV und NPV sowie die DEV sind der Tabelle 28 zu entnehmen. Trotz der begrenzten Anzahl von Seren wurde eine ähnliche Spezifität für alle drei Antigene festgestellt. Die Sensitivität erhöhte sich jedoch von 94,73 % (rK39; rKLO8) auf 100 % bei rKLi8.3. Alle drei Antigene reagierten stark positiv mit einem Kontrollserum, was darauf hindeutet, dass dieser Patient falsch klassifiziert wurde. Der Vergleich der ROC-Kurven lässt diese Ergebnisse ebenfalls erkennen, da sie sich recht ähnlich sind. Am besten schnitt jedoch rKLi8.3 mit einem AUC-Wert von 0.9904 ab.



**Abbildung 24: Antikörperreaktion humaner Seren (Indien) mit unterschiedlichen Kinesinantigenen.** Antikörperreaktion von VL-Seren mit (A) rK39 (B) rKLO8 und (C) rKLi8.3 wurden mittels ELISA getestet. Seren: VL-Patienten (n = 19), HC-Spendern (n = 11, inkl. EC-Gruppe (n = 9), MA-Patienten (n = 1) und TX-Patienten (n = 1). (D) ROC-Kurve für rKLi8.3-, rK39-, rKLO8- ELISA.

**Tabelle 28: Diagnostisches Potential der rK39-, rKLO8- und rKLi8.3-ELISAs für VL in Indien**

ELISA Test	Cut-off	AUC	TP	FN	TN	FP	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
rK39	0.146	0.9809	18	1	10	1	94.73	90.91	94.73	90.91	93.33
rKLO8	0.124	0.9856	18	1	10	1	94.73	90.91	94.73	90.91	93.33
rKLi8.3	0.106	0.9904	19	0	10	1	100	90.91	95	100	96.66

### 3.1.9 Vergleich kommerzieller ELISAs mit dem rKLi8.3-Prototyp-ELISA

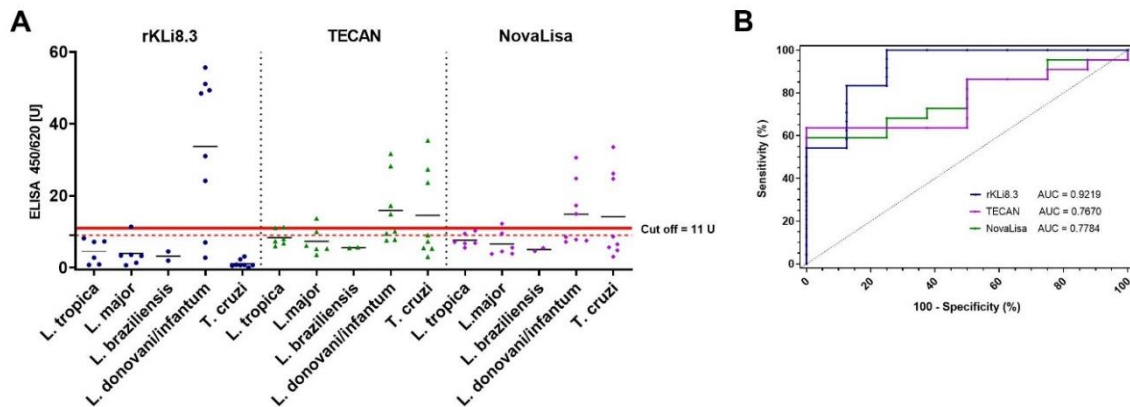
Die Leistung des rKLi8.3-Prototyp-ELISAs (Novatech) wurde mit kommerziellen ELISA-Kits (TECAN/NovaLisa) mittels eines Panels von 30 Seren von Patienten mit KL, Chagas- und VL-Infektionen verglichen. Alle Testverfahren wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die Ergebnisse wurden anhand der von den Herstellern empfohlenen Cut-off-Werte für den Antikörpernachweis ausgewertet. Daten innerhalb der Grenzzone wurden als negativ bewertet.

Von 14 KL-Seren wurde eine Probe (7 %) sowohl mit rKLi8.3 als auch mit NovaLisa als falsch positiv erkannt, während zwei KL-Seren (14 %) mit TECAN falsch positiv reagierten. Von den VL positiven Seren reagierten zwei (25 %) nicht mit rKLi8.3 und vier (50 %) nicht mit TECAN und NovaLisa, d.h. sie waren falsch negativ. Die Seren von *T. cruzi* Patienten zeigten keinerlei Kreuzreaktion mit rKLi8.3 (0 %), während dies bei TECAN und NovaLisa in drei Fällen (38 %) auftrat. Insgesamt lagen die Sensitivität und Spezifität von TECAN/NovaLisa und rKLi8.3 zwischen 50 % und 75 % bzw. zwischen 72,72 % und 95,45 %. Die höchsten Werte wurden mit dem rKLi8.3-Prototyp-ELISA erzielt, womit eine DEV von 90 % erreicht wurde. Beim Vergleich der ROC-Kurven zeigte der rKLi8.3-Prototyp-ELISA eine höhere analytische Leistung als TECAN und NovaLisa.

Zusätzlich wurde der rKLi8.3-Prototyp-ELISA auch gegen eine Gruppe von 39 Patientenseren getestet, die mit *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* und *Echinococcus multilocularis* infiziert waren. Mit keinem dieser Seren wurde eine Kreuzreaktivität festgestellt, was die hohe Spezifität von rKLi8.3 bestätigt.

**Tabelle 29: Diagnostisches Potential des TECAN-, NovaLisa- und des rKLi8.3-Prototyp-ELISA**

ELISA Test	Cut-off	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
TECAN	11 U	0.7670	50.0	81.81	50.0	81.81	73.33
NovaLisa	11 U	0.7784	50.0	72.72	40.0	80.0	66.66
rKLi8.3	11 U	0.9219	75.0	95.45	85.71	91.30	90.0



**Abbildung 25: Diagnostische Leistung kommerzieller ELISA-Kits (TECAN, NovaLisa) und des rKLi8.3-Prototyp-ELISAs.** (A) Antikörperantworten wurden gegen Serumproben von *L. donovani/L. infantum* (n = 8), *L. tropica* (n = 6), *L. major* (n = 6), *L. braziliensis* (n = 2), *T. cruzi*-Patienten (n = 8) getestet. Der vom Hersteller definierte Grenzbereich ist durch rote Linien gekennzeichnet; Daten innerhalb dieses Bereichs wurden als negativ betrachtet. (B) ROC-Kurvenanalyse von TECAN, NovaLisa und rKLi8.3 Prototyp-ELISA.

### 3.1.10 Evaluierung des rKLi8.3-basierten Lateral Flow Test

Gereinigtes rKLi8.3 wurde dem Hersteller, Eurofins Ingensa S.A, zur Entwicklung des Lateral Flow Tests (LFT) zur Verfügung gestellt. Das Schnelltestformat verwendet rKLi8.3 kolloidales Gold-Konjugat zum Nachweis der VL und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Kommerziell verfügbare rK39-Schnelltests (IT LEISH, BIO-RAD) wurden als Referenz verwendet. Der Prototyp rKLi8.3-LFT und IT LEISH wurden an Seren mit bestätigter VL, MA, TB und negativen Kontrollen getestet. Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit wurden für beide Tests bestimmt (Tabelle 30). Die Daten zeigen, dass der rKLi8.3-LFT im Vergleich zum IT LEISH eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweist (86,96 % bis 95,65 % bzw. 84,62 % bis 97,44 %). Im Gegensatz zum IT LEISH zeigte keines der Kontrollseren (TB und MA) eine Kreuzreaktion mit dem rKLi8.3-LFT.

**Tabelle 30: Diagnostische Performance der Lateral Flow Tests**

LFT	Hersteller	Antigen	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
IT Leish	BIO-RAD Laboratories, Inc	rK39	86.96	84.62	76.92	91.67	85.48
rKLi8.3	EUROFINS INGENASA S.A.	rKLi8.3	95.65	97.44	95.65	97.44	96.77

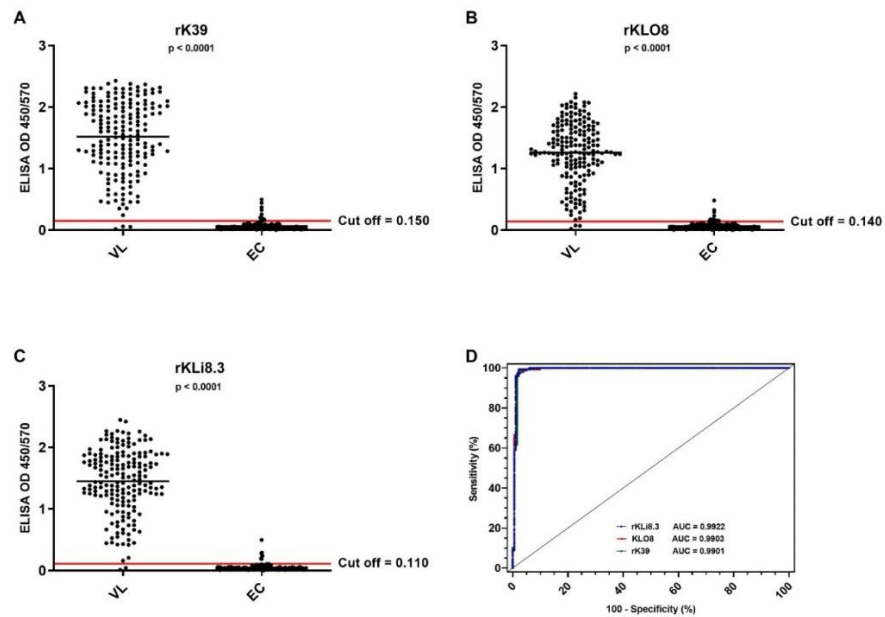
### 3.2 Diagnostik der Viszeralen Leishmaniose bei Hunden

Auch für die serologische Diagnostik der viszeralen Leishmaniose beim Hund (CVL) wurde das rKLi8.3 Antigen im ELISA getestet. Die Performance von rKLi8.3 wurde im ELISA vergleichend mit rK39-ELISA verglichen, da der rK39-ELISA eine ausgezeichnete Performance bei der Serodiagnostik der CVL aufweist. Die Leistung wurde zudem mit rKLO8 verglichen. Zur Bestimmung der Eignung und Effizienz des rKLi8.3 für den Nachweis von *Leishmania*-Antikörpern bei Hunden wurden 183 Seren aus Kroatien analysiert. Darüber hinaus wurden 149 Seren nicht infizierter, gesunder Hunde getestet, um den Cut-off-Wert zu bestimmen, der bei 0,11 für rKLi8.3 lag. Auch hier wurde analog zu den Humanproben, die ELISA-Platten mit 5ng/Loch ge-coated und die Seren 1:800 verdünnt. Unter diesen Bedingungen waren die Unterschiede zwischen positiven und negativen Seren optimal. Wie in Tabelle 31 gezeigt, wiesen rKLi8.3, rK39 und rKLO8 eine hohe Sensitivität bei positiven Seren (98 %) auf. Die Daten zeigen, dass rKLi8.3 im Vergleich zu rK39 und rKLO8 eine höhere Spezifität aufwies (91,3 %, 90,6 % bis 96 %). In Bezug auf die Zuverlässigkeit der Tests (Tabelle 31) zeigte der rKLi8.3-ELISA die höchste DEV (97,59%), gefolgt vom rK39- (95,18%) und dem rKLO8-ELISA (94,87%). Diese Ergebnisse zeigen, dass rKLi8.3 zum Nachweis von *Leishmania*-spezifischen Antikörpern auch bei Hunden sehr gut geeignet ist.

**Tabelle 31: Diagnostische Leistung des ELISAs von rK39-, KLO8- und rKLi8.3-Antigenen bei Hunden mit Viszeraler Leishmaniose**

ELISA Test	Cut-off	AUC	TP	FN	TN	FP	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	DEV (%)
rK39	0.15	0.9901	180	3	136	13	98.3	91.3	93.26	97.84	95.18
rKLO8	0.14	0.9903	180	3	135	14	98.3	90.6	92.78	97.82	94.87
rKLi8.3	0.11	0.9922	181	2	143	6	98.9	96	96.79	98.62	97.59

Die Spezifität wurde mit 149 VL-negativen und die Sensitivität wurde mit 183 VL-positiven Seren berechnet. Werte für Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und DEV wurden mit einem Konfidenzintervall von 95 % berechnet. Der Cut-off-Wert wurde als mittlerer Absorptionswert der endemischen Kontrollseren + 3 Standardabweichungen festgelegt. Abkürzungen: CVL, Canine Viszerale Leishmaniose; EC, endemische Kontrollen; AUC = Fläche unter der Kurve; TP = korrekt positive; FN = falsch negative; TN = korrekt negativ; FP = falsch positiv; PPV = positive Vorhersage; NPV = negative Vorhersage; DEV = diagnostische Effizienz.

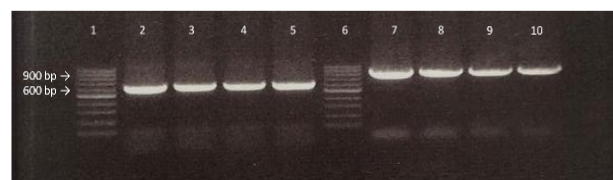


**Abbildung 26: Antikörperreaktion von CVL-Hundeseren mit verschiedenen Antigenen.** (A) rK39-, (B) rKLO8- und (C) rKLi8.3-ELISA mit CVL Hunde- und Kontrollseren (Kroatien). Die Reaktivität wurde mit Seren von CVL-Hunden (VL, n=183) oder Gesunden (EC, n=149) überprüft. (D) ROC-Kurve für rKLi8.3-, rK39-, rKLO8-ELISA.

### 3.3 Untersuchung eines neuen Proteasom-Inhibitors zur Behandlung der viszeralen Leishmaniose

#### 3.3.1 Sequenzanalyse des Proteasoms

Die beiden DNA-Fragmente, die proteasomalen  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-UEs, wurden mittels PCR aus verschiedenen Leishmanien-Stämmen amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden mit der DNA-Gelelektrophorese hinsichtlich der zu erwartenden Größen überprüft. Erwartet wurden bei der  $\beta$ 4-UE ein Fragment von 621 bp und bei der  $\beta$ 5-UE ein Fragment mit 909 bp. Weiterhin wurden die PCR-Amplifikate sequenziert und mittels bioinformatischer Sequenzanalysen einer distinkten proteasomalen UE zugeordnet.



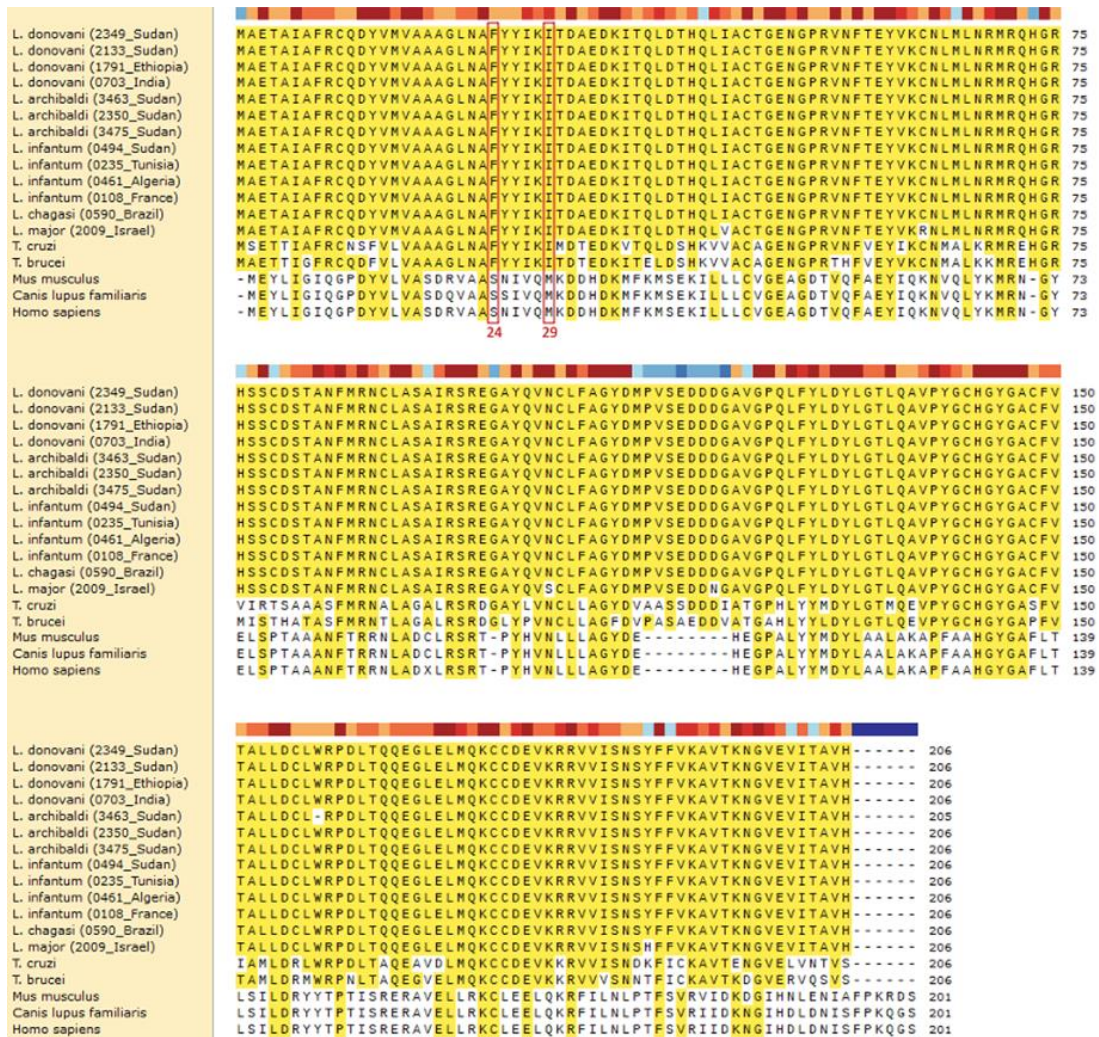
**Abbildung 27:  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-Amplifikate von *Leishmania infantum*.** Gelelektrophorese der  $\beta$ 4- (Lane 2-5) und  $\beta$ 5-PCR Amplifikate (Lane 7-10) von *L. infantum* (LEM0461). Eine 100 bp-DNA-Leiter (Lane 1 und 6) dient als Größenstandard. Die Banden der  $\beta$ 4-Untereinheit befanden sich etwa auf der Höhe des 600 bp-Markers. Die Banden der  $\beta$ 5-Untereinheit befanden sich etwa auf der Höhe des 900 bp-Markers.

### 3.3.2 Sequenzalignment der $\beta$ 4-Untereinheiten

Die AS-Sequenzen der  $\beta$ 4-UEs wurden mit denen von *T. cruzi*, *T. brucei*, der Maus, dem Hund und dem Menschen verglichen und in Abbildung 28 verglichen (alignement) dargestellt. In Gelb sind AS markiert, die zwischen den unterschiedlichen Organismen übereinstimmen. Rot umrandete Bereiche zeigen die AS, die für die Bindung des Inhibitors GNF-6702 von entscheidender Bedeutung sind. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die kritischen AS bei Leishmanien und Trypanosomen in Positionen Phe24 und Ile29 durchgehend konserviert sind. Interessanterweise unterscheiden sich die AS in diesen Positionen bei Menschen, Maus und Hund, wo sich an Position 24 und 29 Serin bzw. Methionin befindet.

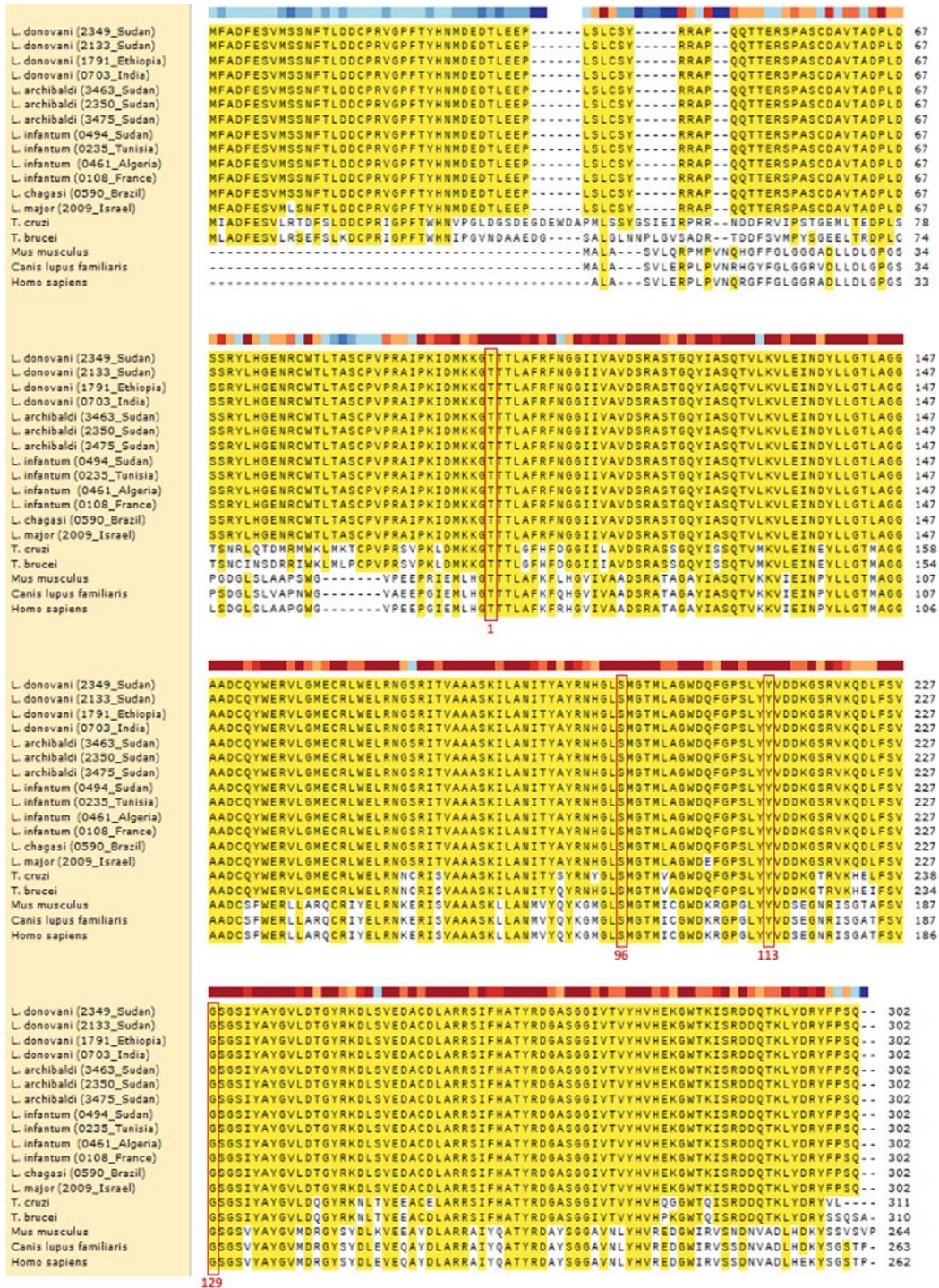
### 3.3.3 Sequenzalignment der $\beta$ 5-Untereinheiten

Weiterhin wurden die  $\beta$ 5-UEs der verschiedenen Organismen (s. oben) verglichen. Abbildung 29 zeigt das AS-Sequenzalignment der  $\beta$ 5-UE. Analog zu der  $\beta$ 4-UE wurden in Gelb die konservierten AS hervorgehoben, die bei den untersuchten Organismen übereinstimmten und in Rot wurde der Bereich hervorgehoben, der für die Bindung des Inhibitors GNF-6702 von entscheidender Bedeutung ist. Im Falle der  $\beta$ 5-UE handelt es sich bei den kritischen AS um Serin an der Stelle 96, Tyrosin an der Position 113 und Glycin an der Stelle 129. Gezählt wird dabei ab dem katalytisch aktiven Threoninrest, der ebenfalls mit einer roten Umrandung markiert wurde. An den kritischen Bindungsstellen sind alle Organismen identisch, d.h. hier sind die Sequenzen vollständig konserviert.



**Abbildung 28: Alignment der Aminosäuresequenzen der proteasomalen  $\beta 4$  UE.** AS-Sequenzen der  $\beta 4$  UE von 13 Leishmanienstämmen, *T. cruzi* und *T. brucei*, Maus (*Mus musculus*), Hund (*Canis lupus familiaris*) und Mensch (*Homo sapiens*). In Klammern sind die jeweiligen LEM-Nummern und das Land, aus dem die Isolate stammen. Gelb: konservierte Aminosäuren; rote Kästchen zeigen die kritischen Aminosäuren für die Inhibitorbindung.



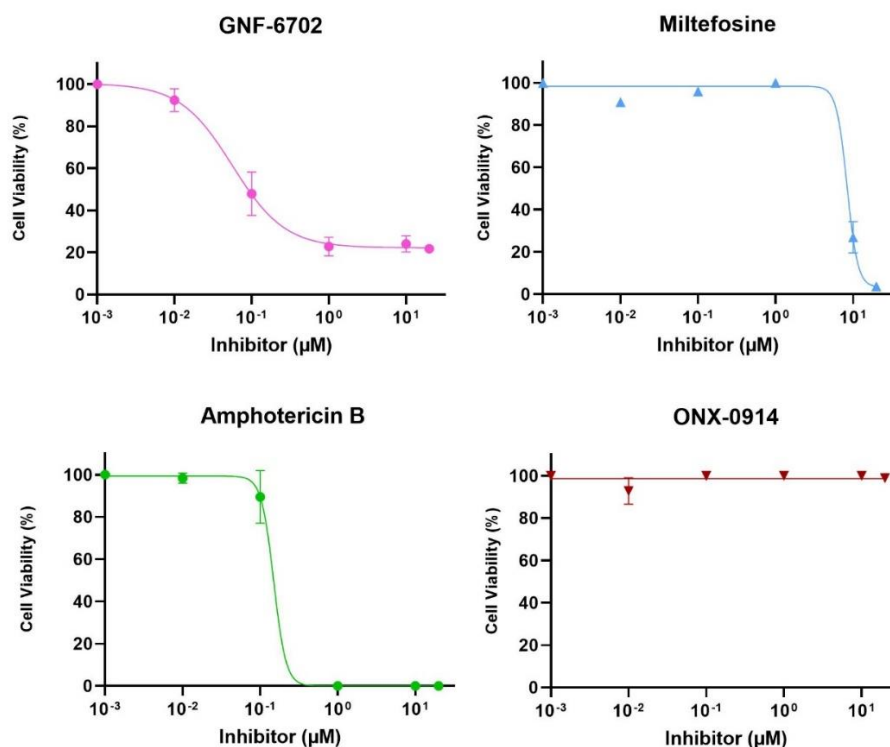


**Abbildung 29: Alignment der Aminosäuresequenzen der proteasomalen  $\beta 5$  UE.** AS-Sequenzen der  $\beta 5$  UE von 13 Leishmanienstämmen, *T. cruzi* und *T. brucei*, Maus (*Mus musculus*), Hund (*Canis lupus familiaris*) und Mensch (*Homo sapiens*). In Klammern sind die jeweiligen LEM-Nummern und das Land, aus dem die Isolate stammen. Gelb: konservierte Aminosäuren; rote Kästchen zeigen die kritischen Aminosäuren für die Inhibitorbindung.

### 3.3.4 Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf die Lebensfähigkeit von Promastigoten

Untersucht wurde zunächst die Vitalität promastigoter Leishmanien-Stämme nach der Behandlung mit GNF-6702, Miltefosine, Amp B und ONX-0914 in unterschiedlichen Konzentrationen (0.001  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ). Die Abbildung 30 zeigt stellvertretend die Befunde, die mit dem Stamm *L. donovani* (weitere Stämme im Anhang) erhoben wurden. Der Einfluss der höchsten Wirkstoffkonzentration (20  $\mu\text{M}$ ) auf die Lebensfähigkeit (%) und die LogIC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 32 dargestellt.

Die Testsubstanzen GNF-6702, Amp B und Miltefosine bewirkten bei den getesteten Promastigoten eine sigmoidale Abnahme der Vitalität. Der LogIC<sub>50</sub>-Wert belief sich bei GNF-6702 auf -1,3, während er bei Amp B bei -0,81 und für Miltefosine bei 0,92 lag. Interessanterweise zeigte der proteasomeninhibitor ONX-0914 keinen erkennbaren Effekt auf die promastigoten Leishmanien.



**Abbildung 30: Einfluß von Wirkstoffen auf die Vitalität promastigoter *L. donovani*.** Vitalitätsbestimmung promastigoter *L. donovani* (LEM0703) nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Miltefosine (blau), Amphotericin B (grün) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

Tabelle 32: Inhibition der Vitalität promastigoter Leishmanien bei 20  $\mu$ M Wirkstoffkonz. und LogIC<sub>50</sub>

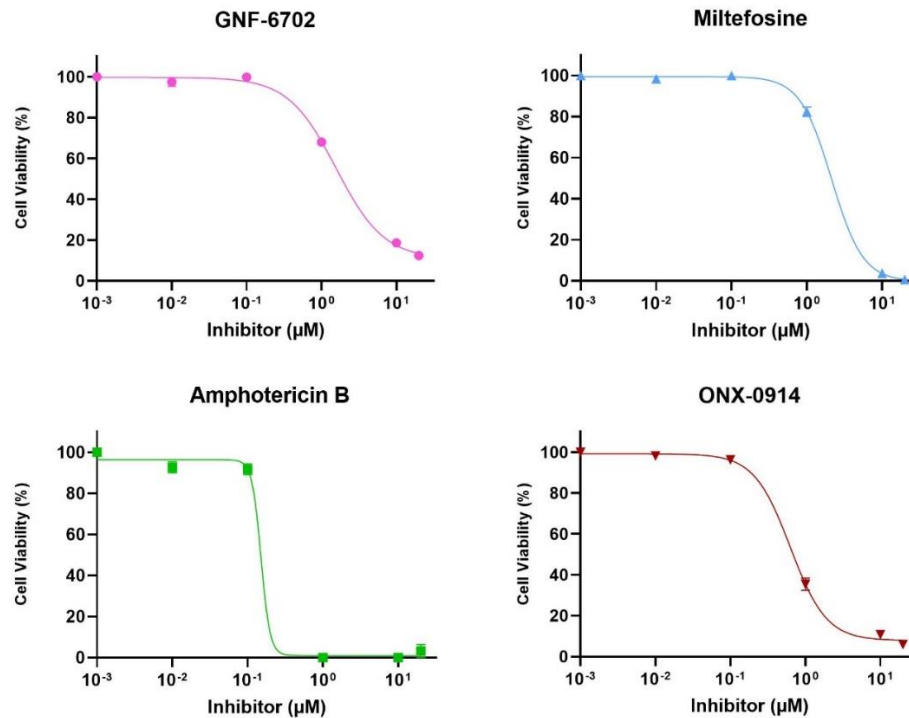
Inhibitor	Inhibition bei 20 $\mu$ M (%)	LogIC <sub>50</sub>
GNF-6702	78	-1,30
Amphotericin B	100	-0,81
Miltefosine	96	0,92
ONX-0914	1	---

Prozentuale Inhibition der Vitalität promastigoter *L. donovani* bei 20  $\mu$ M GNF-6702, Amphotericin B, Miltefosine und ONX-0914.

### 3.3.5 Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf amastigote Leishmanien

Die amastigoten Parasiten sind für die klinische Manifestation der Krankheit verantwortlich. Deswegen ist es entscheidend zu untersuchen, ob eine Testsubstanz ebenfalls auf dieses Stadium antiparasitäre Effekte ausübt. So wurden neben den promastigoten - auch amastigote Formen des *L. donovani*-Stammes (weitere Stämme im Anhang) getestet. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Angaben bezüglich der Vitalität amastigoter Parasiten nach Behandlung mit der höchsten Wirkstoffkonzentration (20  $\mu$ M), sind in Tabelle 33 dargestellt.

Eine interessante Beobachtung war, dass alle anti-Leishmania Wirkstoffe bei den Amastigoten eine höhere Wirksamkeit zeigte, als bei Promastigoten. Die Vitalitätskurven zeigten bei amastigoten *L. donovani* stets einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Der LogIC<sub>50</sub>-Wert lag für GNF-6702 und Miltefosine im positiven, für Amp B und ONX-0914 im negativen Bereich. Mit GNF-6702 wurde eine Reduktion der Lebensfähigkeit um 88 % erreicht, während Amp B und Miltefosine zu einer nahezu vollständigen Elimination der Parasiten führten. Einen überraschenden Effekt konnten wir mit ONX-0914 beobachten: Während dieser Inhibitor keine Wirkung bei promastigoten Leishmanien zeigte, hemmte der Immunoproteasom-Inhibitor die amastigote Form von Leishmanien vollständig.



**Abbildung 31: Wirkung verschiedener Testsubstanzen auf die Vitalität amastigoter *L. donovani*.** Vitalitätsbestimmung von amastigoten *L. donovani* (LEM0703) in Gegenwart von GNF-6702 (rosa), Miltefosine (blau), Amphotericin B (grün) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

**Tabelle 33: Inhibition der Vitalität Amastigoter Leishmanien bei 20  $\mu$ M Wirkstoffkonz. und LogIC<sub>50</sub> Werte**

Inhibitor	Inhibition bei 20 $\mu$ M (%)	LogIC <sub>50</sub>
GNF-6702	88	0,20
Amphotericin B	97	-0,82
Miltefosine	99	0,33
ONX-0914	94	-0,20

Prozentuale Inhibition der Vitalität promastigoter *L. donovani* bei 20  $\mu$ M GNF-6702, Amphotericin B, Miltefosine und ONX-0914.

### 3.3.6 Toxizität des Inhibitors auf humane Wirtszellen (THP-1)

Die menschliche Leukämie-Monozyten-Zelllinie THP-1 wird häufig als Wirtszelle für *Leishmania*-Infektionen verwendet und ist auch für das Wirkstoff-Screening geeignet (Gebre-Hiwot et al. 1992).

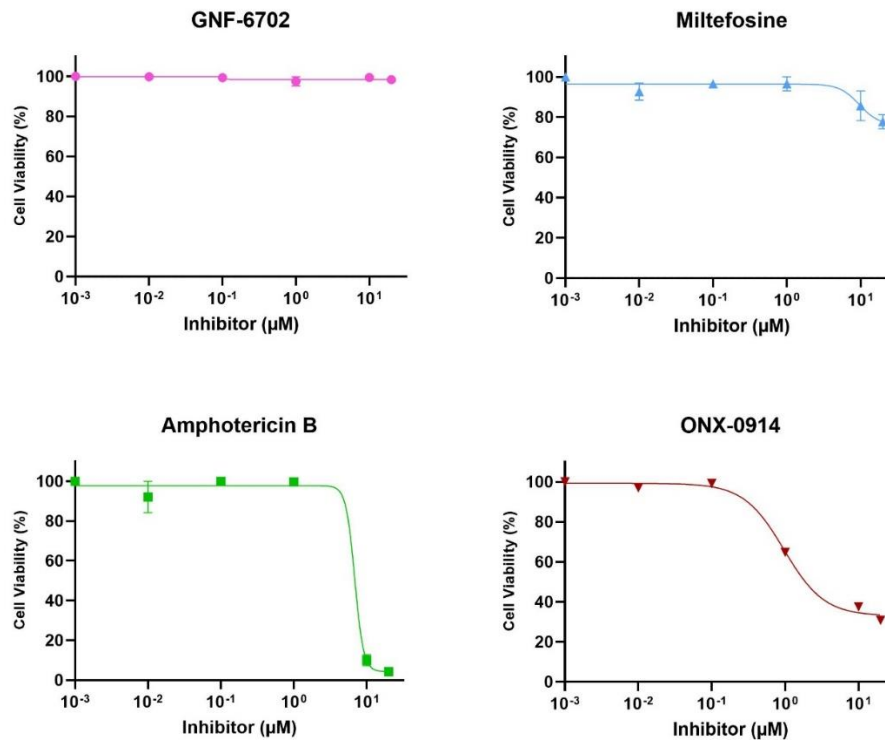
Um die Toxizität des Inhibitors auf die Lebensfähigkeit von THP1 zu untersuchen, wurden intrazelluläres ATP gemessen. Hierzu wurden THP1-Zellen zunächst zu Makrophagen differenziert und dann für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-3}$   $\mu\text{M}$  bis  $10^{1,301}$   $\mu\text{M}$ ) der jeweiligen Testsubstanzen (GNF-6702, Amp B, Miltefosine, ONX-0914) inkubiert. Daraufhin wurde der ATP-Gehalt der Zellen analog zu den Leishmanien mit Hilfe des CellTiter Glo-Kits gemessen. Bei den Versuchen wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

GNF-6702 zeigte keinen Effekt bei PMA-stimulierten THP1-Zellen. Dahingegen führten Amp B und ONX-0914 jeweils zu einer deutlichen Reduktion der Vitalität, im Falle von Amp B zu einem nahezu vollständigen Zelltod, während die ONX-0914 Behandlung die Vitalität der THP-1 Zellen um 70 % reduzierte. Miltefosine hatte den geringsten toxische Wirkung auf die Wirtszelle und zeigte bei 10  $\mu\text{M}$  nur 22 % reduzierte Vitalität. Der  $\text{LogIC}_{50}$  von Amp B lag bei 0,84 und bei Miltefosine 0,70.  $\text{LogIC}_{50}$  von ONX-0914 lag bei -0,20.

**Tabelle 34: Inhibition der Vitalität THP1 bei 20  $\mu\text{M}$  Wirkstoffkonz. und  $\text{LogIC}_{50}$  Werte**

Inhibitor	Inhibition bei 20 $\mu\text{M}$ (%)	$\text{LogIC}_{50}$
GNF-6702	2	---
Amphotericin B	96	0,84
Miltefosine	22	0,70
ONX-0914	70	-0,02

Prozentuale Inhibition der Vitalität promastigoter *L. donovani* bei 20  $\mu\text{M}$  GNF-6702, Amphotericin B, Miltefosine und ONX-0914.

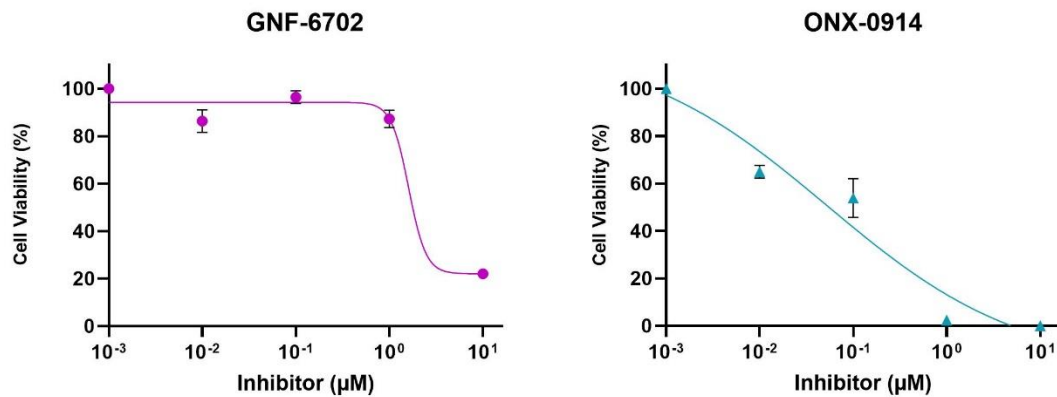


**Abbildung 32: Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität von THP1 Zellen.** Vitalitätsbestimmung von THP1 in Gegenwart von GNF-6702 (rosa), Miltefosine (blau), Amphotericin B (grün) und ONX-0914 (rot) für 24 h in aufsteigender Konzentration. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

### 3.3.7 Parasite-Rescue-Transformation-Assay

Die Analyse des intrazellulären Parasitenwachstums in THP-1 Wirtszellen erfordert eine robuste Methode, mit der der Einfluß eines Wirkstoffes auf das intrazelluläre Überleben eines Parasiten in der Wirtszelle genau ermittelt werden kann. Auch hier wurde nach der Behandlung mit Inhibitoren intrazellulären ATP der Parasiten gemessen. Damit jedoch zwischen dem ATP-Gehalt der Wirtszelle und dem Parasiten unterschieden werden kann, wurde nach der Inhibitorbehandlung der infizierten Makrophagen diese lysiert, wodurch amastigote Leishmanien freigesetzt wurden, die dann in Promastigote transformiert wurden.

Die Titration von GNF-6702 zeigte einen typisch sigmoidalen Verlauf der Vitalität. Der  $\text{LogIC}_{50}$  lag bei 0,21 und die Vitalität der Parasiten wurde final um 78 % reduziert. Der Immunoproteasom-Inhibitor ONX-0914 führte hingegen in der höchsten Konzentration zu einer kompletten Abtötung der Parasiten. Der Verlauf ist konstant abfallend mit einem  $\text{LogIC}_{50}$  von -0,92.

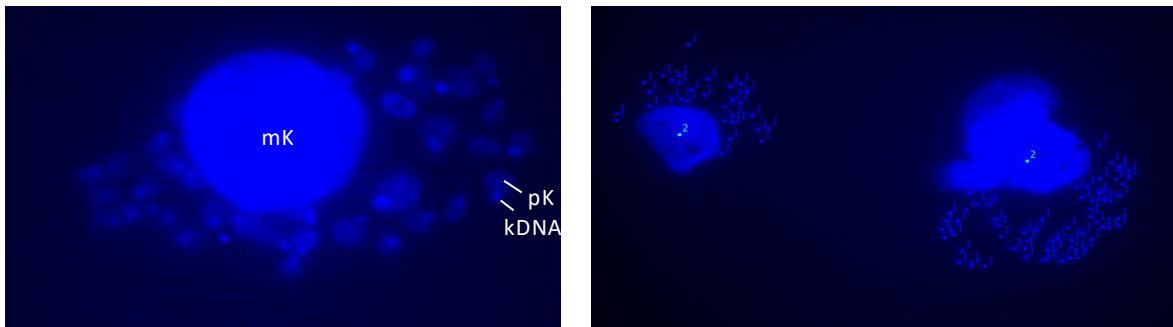


**Abbildung 33: Vitalitätsbestimmung nach GNF und ONX-Behandlung durch Transformation amastigoter in promastigote Leishmanien.** Mit *L. donovani* infizierte Makrophagen wurden für 48h mit GNF-6702 und ONX-0914 behandelt. Nach Freisetzung der Amastigoten und anschließender Transformation in Promastigote wurde die Zahl überlebenden Promastigoten in Abhängigkeit der GNF-6702 bzw. ONX-0914 Konzentration ermittelt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

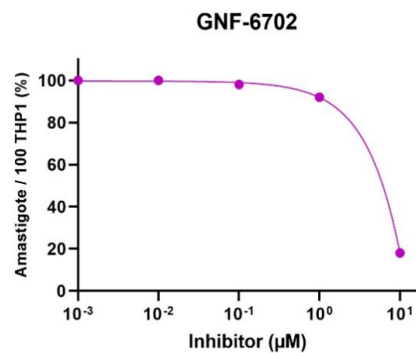
### 3.3.7.1 Digitale Bildanalyse von *L. donovani* infizierten THP1-Zellen

Als Vergleich zum Parasite-Rescue-Transformation-Assay wurde ebenfalls eine digitale Bildanalyse durchgeführt. Hierbei wurden infizierte Makrophagen mit GNF-6702 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und anschließend die Nukleinsäuren in den Wells mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Amastigote, die sich in den differenzierten THP1-Zellen befanden, ausgezählt.

Die Nuklei der Makrophagen und die der Parasiten konnten durch die Größe gut unterschieden werden. Zudem befinden sich die Nuklei in der Nähe der charakteristischen kinetoplastiden DNA. Die Kerne wurden mithilfe der Analysesoftware ImageJ ausgezählt und als Amastigote pro 100 THP1 angegeben (Abbildung 34 und 35). Durch die Behandlung mit GNF-6702 konnte ein klarer Rückgang der Parasitenanzahl erreicht werden. Die höchste Konzentration führte zu einer 82 %igen Reduktion. Der LogIC<sub>50</sub> lag in diesem Fall bei 0,32.



**Abbildung 34: Fluoreszenzanalyse von *L. donovani* infizierten THP1-Zellen nach Anfärbung mit Hoechst-Farbstoff.** Die charakteristische kinetoplastide DNA (kDNA) ist mit jedem Parasitenkern (pK) zu sehen. Die Parasitenkerne (pK) (1) und die Makrophagenkerne (mK) (2) können differenziert markiert und mit der Analysesoftware ImageJ gezählt werden, um die Infektion quantitativ zu bewerten. Die Quantifizierung erfolgte als Anzahl der Amastigote pro 100 THP1-Zellen. (Abb. mit Genehmigung von Sandra Witt verwendet)



**Abbildung 35: Bestimmung der Vitalität amastigoter Leishmanien durch Fluoreszenzanalyse.** *L. donovani* infizierte Makrophagen wurden mit GNF-6702 behandelt und die DNA von Wirtszelle und Parasit wurde mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Ausgewertet wurden die Anzahl fluoreszierender Amastigote/ 100 THP1 Zellen. (Abb. mit Genehmigung von Sandra Witt verwendet)



## 4 Diskussion

### 4.1 Diagnostik der viszeralen Leishmaniose

Die zuverlässige Diagnose von infizierten Patienten und tierischen Reservoiren ist entscheidend für die Kontrolle der Ausbreitung der Leishmaniose. Die aktuelle Serodiagnose für die Leishmaniose, die auf rK39 basiert, weist eine hohe Sensitivität und Spezifität in Brasilien und Indien auf, kann aber auch zu falsch-negativen Ergebnissen und Kreuzreaktionen mit verwandten parasitären Infektionen führen. Trotz seiner Zuverlässigkeit in Brasilien und Indien zeigt der rK39-Test in Ostafrika eine geringere Sensitivität. Der Grund für diese unterschiedliche Reaktion könnte in der molekularen Vielfalt der homologen rK39-Sequenzen zwischen ostafrikanischen *L. donovani*-Stämmen oder in der Verwendung nicht optimaler Kinesin-Antigene (strukturbezogen) liegen.

Auf Grund dieser geringen Sensitivität in ostafrikanischen Ländern, werden in diesen Regionen dringend zuverlässige Point of Care (POC)-Diagnostiktests benötigt. Um solch einen zuverlässigen und verbesserten POC-Test für alle endemischen Gebiete zu entwickeln, wurden in dieser Arbeit die Kinesin-Antigene verschiedener Leishmanien-Isolate in Hinblick auf den Einfluss der Anzahl der TR sowie der Sequenzvariationen auf eine starke und spezifische Antikörperbindung analysiert. Das dabei entwickelte rekombinante Antigen rKLi8.3 stellt ein Kinesin-Protein von *L. infantum* (Sudan) dar und umfasst insgesamt 8,3 Kopien einer repetitiven Sequenz von 39 AS. Die Leistung dieses neuen Antigens wurde mit zwei anderen rekombinanten Kinesin-Antigenen, rK39 und rKLO8 verglichen, die eine geringere Anzahl von repetitiven Motiven (6,4 bzw. 6,3 Kopien) aufweisen.

#### 4.1.1 Einfluss der Tandem-Repeat-Anzahl und der Sequenzvariationen des Kinesins auf die Antigenität

B-Zell-Epitope sind antigene Determinanten, die von löslichen oder membrangebundenen Antikörpern auf der Oberfläche von B-Lymphozyten erkannt und gebunden werden. Die Erkennung und Charakterisierung von B-Zell-Epitopen spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von immundiagnostischen Tests und der Antikörperproduktion (Jespersen et al. 2019).

Mehrere Studien zeigten bereits, dass verschiedene repetitive Proteine von Parasiten häufig Ziele der B-Zell-Antwort des Wirts sind. Dabei stellte man fest, dass TR-Proteine immundominanter sind als Nicht-TR-Proteine, was die Effizienz der Tests zur Diagnose dieser Parasitenerkrankungen erhöhen kann. Eine Studie ergab, dass einer der Gründe für die höhere Antigenität in den zahlreichen identischen Epitopen liegen könnte. Darüber hinaus bilden die repetitiven Regionen im Allgemeinen große Teile der gesamten Proteine, deren Zugänglichkeit auf der Oberfläche für den Nachweis durch Antikörper eine wichtige Rolle spielen (Bhatia et al. 1999; Burns et al. 1993; Coppel et al. 1984).

Für den Einsatz in der Serodiagnostik der VL wurden bereits mehrere *Leishmania*-Antigene charakterisiert, die auf repetitiven Kinesin-Proteinen basieren. Sie sind für die VL-Diagnostik geeignet, da sie eine hoch immunogene, aus 39 AS bestehende, TR-Region aufweisen, gegen die VL-Patienten eine starke Antikörperantwort entwickeln. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die verstärkte Expression eines Kinesin TR-Proteins im Parasiten die Antigenität beeinflussen kann. Zudem wurde die hohe Prävalenz von Antikörpern gegen TRs bei VL-Patienten durch ELISA-Tests unter Verwendung rekombinanter Kinesin-Proteine bestätigt (Berzofsky 1985; Goto et al. 2006).

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kinesin-TR-Proteine aus verschiedenen Stämmen von viszerale Leishmanien molekular und bioinformatisch charakterisiert, um ein neues, effizienteres Kinesin-Antigen zu entwickeln. Es wurden dabei verschiedene Einflüsse auf die Antigenität dieser Proteine analysiert. Einer dieser Faktoren ist die Tendenz der TR zu hydrophilen AS und der andere die Anzahl der sich wiederholenden Sequenz.

Beim Vergleich der Kinesin-Sequenzen konnte eine große genetische Diversität zwischen den Stämmen aus und innerhalb von Ostafrika, Südasien und Brasilien festgestellt werden. Die Heterogenität der Kinesin-Antigene erklärt, warum rK39 (Brasilien) und rKE16 (Indien) in Afrika eine geringe Leistung zeigen.

Bei Kinesin TR-Proteinen wurde eine hohe Prävalenz geladener AS (D, E, K und R) mit Schwerpunkt auf sauren AS beobachtet und diese AS waren in den Wiederholungsdomänen stärker konserviert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die B-Zell-Epitope hauptsächlich in der zweiten Hälfte der Kinesin-Wiederholung liegen, da es hier keine Ladungsänderungen gibt und Sequenzabschnitte (AS 28 - 34) gibt, die in allen Isolaten vollständig konserviert sind. Die Anzahl der TR und die Ladung der AS (Hydrophilie), scheinen somit entscheidend für die Antigenität der Kinesin TR zu sein. Geladene

(hydrophile) Proteine sind wahrscheinlich wirksamer als B-Zell-Antigene im Vergleich zu hydrophobe Proteine. TR-Domänen scheinen zum sauren oder basischen Charakter der Proteine beizutragen, da stark geladene AS in den TR-Domänen häufiger als in den Nicht-TR-Domänen vorkommen.

Zusätzlich wurde *in-silico* die potentielle B-Zell-Epitope im neuen Antigen, rKLi8.3, analysiert. Die Analyse ergab eine hohe Anzahl potentieller B-Zell-Epitope. Diese *in-silico* Analysen deuten darauf hin, dass diese Epitope beim serologischen Nachweis von Antikörpern, im Vergleich zu Proteinen mit weniger Wiederholungen, besser geeignet sind. Zudem zeigten Sequenzanalysen, dass die TR von rKLi8.3 zwischen *L. infantum* und *L. donovani* hoch konserviert sind, was darauf hindeutet, dass beide Proteine zur Diagnose der VL in verschiedenen Endemiegebieten verwendet werden können. Als Letztes wurden rekombinante Kinesin-Proteine, die aus einer zunehmenden Anzahl von TRs bestanden hergestellt und getestet. Die Reaktivität dieser Proteine wurde mit Seren von VL Patienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der TR die Bindungsaffinität zwischen Antigenen und Antikörpern aufgrund der thermodynamischen Bindungskinetik beeinflusst.

### 4.1.2 Amplifikation und Expression von Tandem-Repeat-Sequenzen

Wiederholte DNA-Sequenzen sind wichtige Bestandteile des Genoms und hochdynamisch. Die Arbeit mit repetitiver DNA ist mit vielen Herausforderungen verbunden. Von der Klonierung bis zur Expression in Bakterien können diese Abschnitte häufig rekombiniert oder eliminiert werden. Repetitive Bereiche mit starker Ähnlichkeit, hohem GC-Anteil, erschweren die Amplifikation aber auch die Transformationen in Bakterien. Erhöhte Stacking-Interaktion, die Umlagerungen und Eliminierungen von Repeats erschwert oft die PCR-Amplifikation und kann zu einer vermehrten Rekombination oder Chimärenbildung führen. Molekulare Mechanismen, die zur Erzeugung solcher Rekombinationen führen, sind meist unbekannt oder unklar (Hommelsheim et al. 2014).

Daher wurden in dieser Arbeit systematisch verschiedene Aspekte untersucht, wie solche unerwünschten Rekombinationen entstehen und wie sie beseitigt werden können. Dies wurde durch Erhöhung der Schmelztemperatur, Anpassung der Magnesiumkonzentration und Erhöhung der Denaturierungszeit für die PCR gelöst. Da das Binden des Primers an die DNA nicht notwendigerweise am 3'-Ende beginnt, sondern über die gesamte Länge des

Strangs erfolgen kann, konnte durch das Verlängern des nicht-repetitiven Prä-Repeats ein Position-definiertes Annealing der Primer erreicht werden.

Aufgrund von Umlagerungen oder Deletionen durch DNA-Reparatursysteme, wie beispielsweise Rec A, sind repetitive Sequenzen in *E. coli* häufig problematisch und führen oft zur Deletion oder Duplikation von Genen, die von direkten Sequenzwiederholungen flankiert sind. Damit kann sich die Anzahl der sich wiederholenden Elemente ändern (Bzymek and Lovett 2001).

Aus diesem Grund wurden spezielle Bakterienstämme verwendet, die zur Transformation der instabilen, repetitiven DNA geeignet sind. Diese Stämme tragen Mutation in ihren Rekombinasen-Genen (z.B., recA1, recB, recA13). Sie können die Rekombination klonierter DNA reduzieren und sind deshalb zur Transformation repetitiver Kinesin-Sequenzen geeignet.

### 4.1.3 Leistung von serodiagnostischen Tests im Sudan und Indien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen Kinesin-Antigene aus unterschiedlichen *Leishmania*-Stämmen und mit unterschiedlicher TR-Länge mittels des serologischen Testverfahrens ELISA mit Serumproben aus zwei unterschiedlichen endemischen Regionen (Sudan und Indien) miteinander verglichen und bewertet. Es konnte gezeigt werden, dass mit Erhöhung der TR-Anzahl die Kinesinantigene stärker mit den Antikörpern von VL Patienten reagieren. Mit steigender Repeatanzahl, erhöhte sich zugleich die Sensitivität und Spezifität. Der rKLi8.3-ELISA zeigte in verschiedenen VL-Endemiegebieten eine höhere Sensitivität und Spezifität als der rK39- und der rKLO8-ELISA. Bei einem Panel von 172 VL-positiven und 116 VL-negativen ostafrikanischen Serumproben konnte durch die rKLi8.3-Serodiagnose die Zahl der FN und FP von fünfzehn auf fünf bzw. von acht auf eins reduziert werden. Ein idealer diagnostischer Test sollte alle positiven Seren ohne Kreuzreaktion mit negativen Seren identifizieren. Es ist zu berücksichtigen, dass kürzlich infizierte Personen eine erhöhte IgM-Antwort, aber noch keine IgG-Antwort zeigen. Die Seren solcher Patienten würden bei einem ELISA, der auf dem Nachweis von IgG-Antikörpern basiert, falsch negative Ergebnisse liefern. Dies könnte die Ergebnisse der fünf Patienten erklären, die im rKLi8.3-ELISA negativ getestet wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei indischen VL-Patienten erzielt, obwohl die Zahl der Seren begrenzt war.

Kinesinantigene mit niedriger Repeatanzahl von 6.3 und 6.4 (rK39, KLO8 und rKLi6.3) zeigten in den Endemiegebieten des Sudan alle Kreuzreaktionen mit Seren von TB-Patienten. Ab einer Repeatanzahl von 7.3 konnten keine Kreuzreaktionen festgestellt werden. Mit MA-positiven Seren reagierte keines der Proteine. In den Endemiegebieten Indiens zeigte keines der Proteine eine Kreuzreaktion mit den MA- oder TX-positiven Seren. Mit steigender Repeatanzahl sank auch die Rate der falsch-positiven und falsch-negativen Resultate der humanen Seren aus dem Sudan. Interessanterweise ist die Rate von falsch-positiven Humansenen aus Indien, die mit den Antigenen rK39, KLO8 und rKLi8.3 getestet wurden gleich, jedoch sank die Zahl der falsch-negativen Seren bei rKLi8.3 auf null. Es ist anzumerken, dass im Vergleich zum Sudan nur eine geringe Anzahl an indischen Seren zur Verfügung standen, was die Differenzierung der diagnostischen Leistung der Proteine in den jeweiligen Ländern erschwerte. Dennoch konnte das Protein rKLi8.3 eine bessere diagnostische Leistung als die Vergleichsproteine rK39 und KLO8 aufzeigen.

Auch im direkten Vergleich der Kinesinantigene mit gleicher TR-Länge (8.3), jedoch unterschiedlicher Leishmanien-Stämme, zeigte das rKLi8.3 Protein aus *L. infantum* gegenüber *L. donovani* und *L. archibaldi* eine bessere diagnostische Leistung auf. Das deutet darauf hin, dass die konservierten und geladenen AS innerhalb der TR von rKLi8.3 eine wesentliche Rolle für die Antigenität spielt.

#### **4.1.4 Einfluss von Koinfektionen auf die diagnostische Leistung kommerzieller ELISA-Kits im Vergleich zu dem rKLi8.3-Prototyp-ELISA**

Da VL-Patienten häufig an Koinfektionen leiden, sind zuverlässige, spezifische und sensitive diagnostische Testsysteme eine Voraussetzung für die Kontrolle und Eliminierung dieser Krankheit. Kreuzreaktionen erschweren die spezifische VL-Diagnose insbesondere in Regionen, in denen mehrere parasitäre Krankheiten endemisch sind. Die Spezifität kann aufgrund von Kreuzreaktivitäten mit anderen Infektionen, wie beispielsweise KL, Chagas, MA und TX beeinträchtigt werden, zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die nahe phylogenetische Verwandtschaft dieser Protozoen lässt vermuten, dass die Kreuzreaktivitäten auf gemeinsame Antigen determinanten zurückzuführen sind (Vexenat et al. 1996).

In den ostafrikanischen Endemiegebieten teilen VL und MA die gleiche geografische Verbreitung. Daher sind Koinfektionen mit VL und MA in mehreren Ländern, darunter auch

im Sudan, häufig. Es wurde gezeigt, dass Koinfektionen z.B. mit Malaria die Immunreaktionen verändern bzw. schwächen. Neben anderen Faktoren wie HIV oder dem Ernährungszustand der Patienten könnten niedrige Antikörpertiter bei einigen VL-Patienten zu aberranten Immunreaktionen des Wirts aufgrund von Polyparasitiden zurückzuführen sein (Abass et al. 2015).

Eine Malariainfektion ist als eine Hauptursache für die Kreuzreaktivität auf rK39 beobachtet worden, obwohl gemeinsame Antigene zwischen Plasmodien und Leishmanien sind bisher nicht bekannt sind. Bei akuter VL findet jedoch eine starke Erhöhung der spezifischen und unspezifischen Immunglobuline G (IgG), IgM und IgA statt, die auf eine polyklonale Aktivierung der B-Zellen zurückzuführen ist. Die z. Teil unspezifische Erhöhung der Immunglobuline ist mögliche Erklärung für die Kreuzreaktivität ist sowohl bei der VL als auch bei MA (Sivakumar et al. 2008).

Serologische Tests, in denen ganze Lysate von *L. infantum* verwendet werden, weisen oft eine Kreuzreaktivität mit *T. cruzi* auf. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass eine Vielzahl von Proteinen zwischen den verwandten kinetoplastiden *T. cruzi* und *Leishmania*-Parasiten konserviert ist.

Patienten mit KL zeigen in der Regel keine starke humorale Immunantwort auf den Parasiten, während Patienten mit VL eine pathologische Hypergammaglobulinämie gegen eine Vielzahl von Parasitenantigenen (wie z. B. K39-Kinesin) aufweisen. Als Ursache hierfür wird angenommen, dass *L. major* im Vergleich zu *L. infantum* und *L. donovani* während der Infektion des Menschen keine signifikanten Mengen des Kinesin-Proteins exprimiert (Bhatia et al. 1999).

Die Auswertung der DEV des rKLi8.3-Prototyps und der kommerziellen ELISA-Kits ergab, dass rKLi8.3 ein besseres Unterscheidungspotenzial zwischen KL und VL und keine Kreuzreaktivität mit anderen parasitären Infektionen, z. B. der Chagas-Krankheit, aufweist, während bei TECAN und NovaLisa in drei Fällen eine Kreuzreaktion auftrat. Damit übertraf der rKLi8.3-Prototyp-ELISA den TECAN/NovaLisa-Test in Bezug auf Sensitivität und Spezifität. Weitere Tests zeigten, dass rKLi8.3 keine Kreuzreaktivität mit Seren von Tuberkulose-, Malaria, Trypanosomiasis-, Schistosomiasis-, Toxoplasmosis-, Amöbiasis-, Echinokokkose- und Trichinose- Patienten hat. Die hohe Spezifität von rKLi8.3 ist vermutlich auf die Kombination einer konservierten Kinesin-Sequenz mit hoher Antigenität in Verbindung mit einer erhöhten Anzahl von TR zurückzuführen.

### 4.1.5 Eignung des rKLi8.3-ELISA für die Serodiagnose von VL bei Hunden (CVL)

Hunde spielen eine wesentliche Rolle im Übertragungszyklus der VL (Ashford 1996). Daher sollte eine wirksame Strategie zur Bekämpfung der Krankheit beim Menschen auch auf der Kontrolle der CVL beruhen. Die CVL, die durch *L. infantum* verursacht wird, ist eine weit verbreitete endemische Krankheit in Südwesteuropa (Bourdeau et al. 2014). Die Krankheit scheint sich auch vom Mittelmeerraum nach Nordeuropa auszubreiten. Diese Ausbreitung nach Norden wird auf den Klimawandel, die Globalisierung und den Transport und Import von Hunden aus mediterranen Ländern zurückgeführt.

Die Hundeseren aus Kroatien wurden mit dem rekombinanten Protein rKLi8.3 (*L. infantum*, 8.3 Repeats) gegen rKLO8 (*L. donovani*, 6.3 Repeats) und rK39 (*L. infantum*, 6.4 Repeats) als Vergleich getestet. Bei Hundeseren zeigte der rKLi8.3-ELISA eine höhere Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum rK39 und rKLO8-ELISA. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anzahl der TR die Affinität zwischen Antigen und den Antikörpern des Hundes beeinflusst. Mit steigender Repeatanzahl stieg die Antikörperspezifität der Hundeseren, wobei sich die Rate von falsch-positiven Ergebnissen deutlich verringerte. Somit verstärkt eine höhere Repeatanzahl die diagnostische Leistung der Proteine auch bei der CVL. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der rKLi8.3 ELISA als auch der LFT eine präzise Diagnose von Hunden mit CVL ermöglicht und somit als zuverlässige POC-Diagnostik zur Verbesserung der Tiergesundheit als auch der Vermeidung der Infektionsübertragung von Hunden auf den Menschen dient. Von großem Vorteil ist hier, dass da rKLi8.3-Antigen für die Serodiagnose von Mensch und Tier gleichermaßen geeignet ist und somit die Gesamtdiagnostik vereinfacht.

### 4.2 Untersuchung zur Eignung eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung der Viszeralen Leishmaniose

Die Chagas-Krankheit, die Leishmaniose und die Schlafkrankheit betreffen weltweit 20 Millionen Menschen und führen jährlich zu mehr als 50 000 Todesfällen. Die Krankheiten werden durch eine Infektion mit den kinetoplastiden Parasiten *T. cruzi*, *Leishmania spp.* bzw. *T. brucei spp.* verursacht. Diese Parasiten haben eine ähnliche Biologie und Genomsequenz, was darauf hindeutet, dass alle drei Krankheiten mit Medikamenten behandelt werden könnten, die die Aktivität eines konservierten Parasiten-Targets

modulieren (Bibo-Verdugo et al. 2017). Aufgrund der Nebenwirkungen der derzeitigen Therapien und dem Auftreten von Arzneimittelresistenzen besteht ein dringender Bedarf an Medikamentenentwicklungen zur Bekämpfung dieser Krankheiten. Das Proteasom wurde als therapeutisches Target für *Trypanosoma* und *Leishmania* vorgeschlagen, da die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren Veränderungen im Zellwachstum und Entwicklung gezeigt hat. Kürzlich wurde ein selektiver Proteasom inhibitor (GNF-6702) für Parasiten der Kinetoplastida (*T. brucei*, *T. cruzi* und *L. donovani*) beschrieben und erfolgreich im Tiermodell getestet (Khare et al. 2016). In dieser Arbeit wurde der Inhibitor GNF-6702 auf seine Selektivität gegenüber dem viszeralen Leishmanienproteasom untersucht.

### 4.2.1 Sequenzanalyse des Proteasomaler Untereinheiten

GNF-6702 blockiert die Chymotrypsin-Aktivität, die von der  $\beta$ 5-UE vermittelt wird. Der Inhibitor bindet an die benachbarte  $\beta$ 4-UE an der Schnittstelle zwischen den  $\beta$ 4- und den  $\beta$ 5-UEs. Mutationen an bestimmten Stellen in der  $\beta$ 4-UE, die in direktem physischen Kontakt mit der  $\beta$ 5-UE steht, führen zu einer Resistenz gegen diese Hemmung. Daher wurde untersucht, ob die Bindungsstellen des Inhibitors GNF-6702 im Proteasom über verschiedene Stämme des *L. donovani*-Komplexes konserviert sind. Basierend auf dieser Information soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob der Inhibitor für die Behandlung der VL in unterschiedlichen endemischen Regionen eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden die  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-UEs der unterschiedlichen Leishmanienisolate aus verschiedenen Regionen sequenziert und die AS-Sequenzen einem Sequenzalignment unterzogen. Die AS-Positionen 24 und 29 der  $\beta$ 4-UE und 96, 113 und 129 in der  $\beta$ 5-UE sind für die Bindung des Inhibitors entscheidend. Verglichen wurden die Leishmanienisolate mit Proteasomen von Trypanosomen und Säugetieren (Maus, Hund, Mensch). Es ist zu erkennen, dass die für die Inhibitorbindung entscheidenden AS - Phe24 und Ile29 in der  $\beta$ 4-UE und Ser96, Tyr113 und Gly129 in der  $\beta$ 5-UE - in allen Parasiten, sowohl in den 13 sequenzierten *Leishmania*-Stämmen als auch in den Trypanosomen, konserviert sind, während bei Mensch, Hund und Maus ein Serin und ein Methionin an den Stellen 24 bzw. 29 der  $\beta$ 4-UE enthalten. Da verschiedene Stämme aus sieben Ländern und vier Kontinenten untersucht wurden (Afrika, Asien, Europa, Südamerika), kann davon ausgegangen werden, dass die kritischen Bindungsstellen in allen Vertretern des *L. donovani*-Komplexes konserviert sind. Dies bedeutet, dass der Inhibitor GNF-6702 zur Behandlung von VL sowohl



in der Alten als auch in der Neuen Welt unabhängig des *Leishmania*-Stammes eingesetzt werden kann. Ein großer Vorteil ist, dass der Inhibitor auch zur Behandlung weiterer parasitärer Erkrankungen geeignet zu sein scheint. Der Sequenzvergleich zeigte, dass auch *L. major*, *T. cruzi* und *T. brucei* konservierte Bindungsstellen für den Inhibitor innerhalb des Proteasoms aufweisen. Daher könnte GNF-6702 nicht nur zur Behandlung von VL, sondern auch von KL, Chagas-Krankheit und Schlafkrankheit eingesetzt werden. Die  $\beta$ 4-UE der Säugetiere unterscheidet sich in den beiden kritischen AS von denen der Kinetoplastia-Sequenz. Aufgrund dieses strukturellen Unterschieds, ist es unwahrscheinlich, dass GNF-6702 das humane Proteasom bindet und hier zu einer Inhibition führt. Um dies jedoch weiter zu untersuchen, wurde der Einfluß von Proteasomeninhibitoren auf humane Zellen getestet.

### 4.2.2 Untersuchungen zum Einfluss von Inhibitoren auf eine humane Zelllinie

Für das Screening von Wirkstoffen gegen die Leishmaniose in infizierten Wirtszellen wurden bisher mehrere Methoden etabliert. Untersuchungen können mit verschiedenen Wirtszellen durchgeführt werden, wie zum Beispiel Peritoneal-Exsudat-Zellen, Monozyten aus dem peripheren Blut oder Makrophagen aus dem Knochenmark, oder mit monozytären Zelllinien aus der Maus (J774 und RAW264.7) oder humanen monozytären Zelllinien (THP1, U937, HL-60). Bei Experimenten, die mit teilungsaktiven Zellen durchgeführt werden, muss sichergestellt werden, dass bei der Aktivität der Inhibitoren sowohl auf die Anzahl der Parasiten als auch die der Wirtszellen berücksichtigt wird. Die differenzierte, sich nicht mehr teilende humane monozytische Zelllinie (THP1), die von einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie stammt, stellt eine attraktive Alternative zu isolierten primären Makrophagen dar.

Um die Toxizität der Inhibitoren zu prüfen, wurden die gleichen Substanzen, die zuvor an den Leishmanien getestet wurden, auch an PMA-differenzierten THP1-Zellen getestet. Eine DMSO-Kontrolle diente als Negativkontrolle, da es als Lösungsmittel der Testsubstanzen diente. Als Positivkontrolle wurde Proteasomeninhibitor ONX-0914 eingesetzt. Die derzeit gängigen Medikamente Amp B und Miltefosine wurden im Vergleich zu GNF-6702 getestet. ONX-0914 zeigte eine mit der Konzentration zunehmende Inhibition (sigmoidale Kurve) mit einem  $\text{LogIC}_{50}$  im negativen Bereich (-0,02). ONX-0914 reduzierte die Vitalität der THP1-

Zellen bis zu 70 %. Die DMSO-Kontrolle zeigte einen nur marginalen Effekt auf die Lebensfähigkeit der humanen Zelllinie.

Bei Amp B wurde eine starke Abnahme der Vitalität im hohen Konzentrationsbereich beobachtet. Die Vitalitätskurve zeigte einen sigmoidalen Verlauf mit einem  $\text{LogIC}_{50}$ -Wert von 0,84. Um zur Anwendung beim Menschen geeignet zu sein, sollte ein Medikament im Idealfall keine Toxizität auf humane Zelllinien zeigen. Kommt dies wie bei Amp B trotzdem vor, so kann diese Substanz nur in einem Konzentrationsbereich verwendet werden, der einen toxischen Effekt auf den Erreger aber nicht beim Menschen zeigt. Darum lässt sich anhand dieser Daten noch keine abschließende Aussage über die Eignung des Medikaments treffen.

Miltefosine ließ bis in den hochmolekularen Bereich nahezu keine Aktivität in den THP1-Zellen erkennen. Lediglich in den höchsten, getesteten Konzentrationen zeigten sich leichte Beeinträchtigungen (höchste Inhibition 22 %). Dieser relativ geringe toxische Effekt war selbst bei hohen Konzentrationen zu beobachten, weshalb dieses Medikament bereits zur Behandlung von VL-Patienten geeignet ist.

Der Proteasominhibitor GNF-6702 zeigte bis in den hochmolekularen Bereich keine Toxizität in den humanen THP1 Zellen. Die ausbleibende Toxizität ist damit zu erklären, dass die Sequenz des humanen Proteasoms, da es an den kritischen Bindungsstellen des Inhibitors von denen der Leishmanien abweicht.

### **4.2.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Vitalität intrazellulärer Leishmanien**

Die Aktivität potenzieller Therapeutika wurde an axenischen Promastigoten, axenischen Amastigoten und intrazellulären Amastigoten getestet.

Der Promastigot ist die Form, die im Darm einer Sandmücke überlebt und sich leicht *in vitro* kultivieren lässt. Die Vitalität der Promastigoten wurde durch Messung des intrazellulären ATPs bestimmt. Axenisch promastigote Parasiten, die sich durch Veränderung der äußeren Konditionen (Temperaturanstieg, pH-Wert) in Amastigote umgewandelt haben, sind nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren auf ihre Vitalität untersucht worden.

Der Assay mit axenischen Amastigoten kann jedoch nur für die Bewertung von Inhibitoren, die direkt auf den Parasiten wirken, aber er gibt keine Aussage über die Wirkung auf Parasiten im intrazellulären Stadium, d. h. Amastigote, die sich im Phagosom der Wirtszelle

befinden. Weiterhin können die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit sowie die Zugänglichkeit des Targets nicht untersucht werden.

Das intrazelluläre Amastigotenstadium ist somit ein relevantes Testsystem für das Screening von anti-Leishmania Wirkstoffen. Um diesen intrazellulären *Leishmania*-Assay zu etablieren, wurden alle Faktoren, die die Infektion und Wirksamkeit von Medikamenten beeinflussen, wie Parasitenspezies, Parasiten-Lebensstadium, die Multiplizität der Infektion (MOI) sowie die Verwendung von verschiedene Medien systematisch überprüft.

Der intrazelluläre *Leishmania*-Assay wurde durch die Visualisierung von Wirtszellkernen und dem Parasiten-Kinetoplasten unter Verwendung des DNA-Markers Hoechst 33342 ermöglicht. Der sehr deutliche Unterschied in der Größe dieser beiden Organellen ermöglicht die Differenzierung zwischen Wirtszellen und Parasiten und damit die genaue Zählung. Ist die Anzahl der Kinetoplasten verringert, so ist ein Hinweis auf die Hemmung des Parasitenwachstums, während eine Verringerung der Fluoreszenzintensität bei den Wirtszellkernen ein Hinweis auf die toxische Nebenwirkung des Wirkstoffs hindeutet. Daher ermöglicht dieser Fluoreszenz Digital-Image-Analyse die Identifizierung von leishmanioziden und leishmaniostatischen Substanzen.

Um herauszufinden, welche unterschiedliche Wirkung die Substanzen auf extrazelluläre bzw. intrazelluläre Leishmanien zeigen, wurden die unterschiedlichen Wirkstoffe sowohl auf extrazelluläre promastigote als auch amastigote *L. donovani* getestet. Im Falle des Inhibitors GNF-6702 erfolgte zudem eine Analyse der Wirkung auf intrazelluläre Amastigote, das mit den bereits zugelassenen Medikamenten Amp B und Miltefosine verglichen wurde. Als Kontrollsubstanz wurde der Proteasomeninhibitor ONX-0914 mitgeführt, der als Epoxyketon ein selektiver Inhibitor der  $\beta 5i$ -UE des Immunoproteasoms ist. Das Immunoproteasom ist eine Isoform des konstitutiven Proteasoms und wird von vielen Zelltypen nach INF- $\gamma$ - oder TNF- $\alpha$ -Stimulation exprimiert. In Immunoproteasomen werden die katalytisch aktiven  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - und  $\beta 5$ -UEs durch die induzierbaren Isoformen  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  ersetzt. (Cao et al. 2020) Interessanterweise zeigte der Immunoproteasom-Inhibitor keine Wirkung bei promastigoten Leishmanien, während er unerwarteterweise die Vitalität amastigoter Leishmanien signifikant beeinträchtigte. Dies deutet auf eine strukturelle Veränderung des Proteasoms beim Übergang vom promastigoten zum amastigoten Stadium hin, was bisher noch nie beschrieben wurde. Ob amastigote Leishmanien, analog zu Ihren Wirtszellen Immunoproteasomen exprimieren, ist unklar,

jedoch scheint dies bei Promastigoten nicht der Fall zu sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass amastigote Leishmanien unter Stress (pH- und Temperaturänderungen) Immunproteasomen oder eine ähnliche Isoform, die von GNF-6702 inhibiert wird, exprimieren. Eine genaue Analyse der proteasomalen Untereinheiten von amastigoten Leishmanien ist deshalb äußerst interessant, konnte aber innerhalb dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Weitere Experimente in diese Richtung könnten ein neues Drug Target im amastigoten Proteasom freilegen.

Amp B zeigte in allen getesteten Kulturen (sowohl Promastigote als auch Amastigote) eine sehr starke Abnahme der Vitalität. Es handelt sich um eine normale Dosis-Wirkungsreaktion mit sigmoidalen Kurvenverlauf und negativem  $\text{LogIC}_{50}$ -Werten (Promastigot -0,81; Amastigot -0,82). In den höheren Konzentrationen wurden die Parasiten vollständig abgetötet. Ein solcher Verlauf ist bei der Entwicklung eines Medikaments sehr erstrebenswert, da der Einsatz geringer Wirkstoffkonzentrationen die Wahrscheinlichkeit von Off-Target-Effekten beim Wirt verringert. Außerdem wird durch eine schnelle und vollständige Abtötung der Parasiten die Entwicklung von Resistenzen verhindert. (Moore and Lockwood 2010) Da der  $\text{LogIC}_{50}$ -Wert von Amp B bei THP1 (0,84) um etwa einer Zehnerpotenz höher lag als bei den Leishmanien, kann das Medikament in niedrigen Dosierungen als Behandlung der VL eingesetzt werden ohne die Wirtszellen zu schädigen. Da das therapeutische Fenster jedoch nur relativ schmal ist, besteht die Gefahr von patientenabhängigen Schwankungen in der Verteilung und Wirkung des Medikaments und damit auch seiner toxischen Wirkung.

Das Medikament Miltefosine zeigte in den promastigoten und amastigoten Parasiten ebenfalls eine sigmoidal abfallende Vitalität, die jedoch erst bei höheren Konzentrationen im Vergleich zu Amp B abnahm. Die  $\text{LogIC}_{50}$ -Werte lagen im positiven Bereich (Promastigot 0,92; Amastigot 0,33). Die höchste Reduktion der Lebensfähigkeit war 95 %, das heißt der Parasit wurde nahezu vollständig abgetötet. Durch den erhöhten  $\text{LogIC}_{50}$ -Wert wirkt das Medikament Miltefosine etwas geringer als Amp B, es müssen höhere Konzentrationen für eine effektive Behandlung eingesetzt werden. Dies ist jedoch noch vertretbar, da Miltefosine in der humanen Zelllinie nur im hochmolekularen Bereich eine relativ geringe Toxizität auf die humanen THP1 Wirtszellen hat.

GNF-6702 zeigte ebenfalls eine starke Verringerung der parasitären Lebensfähigkeit. Im Vergleich zur promastigoten Form, war diese in der amastigoten Form verstärkt

(Promastigot 78%; Amastigot 88%). Der  $\text{LogIC}_{50}$  von 0,2 bedeutet, dass im Falle der amastigoten Leishmanien höhere Konzentrationen des Inhibitors benötigt werden.

Um die intrazelluläre Effekte der anti-Leishmania Wirkstoffe weiterhin zu überprüfen wurden sogenannte Parasiten-Rescue-Transformation-Assay mit differenzierten THP1-Zellen durchgeführt, die *in vitro* mit *L. donovani* infiziert wurden. Bei diesem Ansatz werden im Gegensatz zu den Promastigoten- oder Amastigoten-Assays wirtszellvermittelte Effekte berücksichtigt. In Übereinstimmung mit dem der digitalen Bildanalyse fluoreszierender Kerne und Kinetoplasten zeigte der Parasiten-Rescue-Transformation-Assay vergleichbare Ergebnisse. GNF-6702 zeigte eine spezifische Hemmung auch bei der intrazellulären Amastigoten ( $\text{LogIC}_{50}$  0,21; höchste Vitalitätsreduktion 78 %).

Da die Toxizität von GNF-6702 in der humanen Zelllinie sehr gering ist, stellt GNF-6702 auch mit einem positiven  $\text{LogIC}_{50}$ -Wert einen sehr interessanten Kandidaten für die Entwicklung eines neuen leishmaniziden Medikaments dar. Die spezifische Bindung an das Kinetoplastenproteasom scheint ursächlich für die sehr geringe Toxizität in Säugerzellen zu sein. Der Inhibitor vereint relativ geringe  $\text{LogIC}_{50}$ -Werte mit einer einfachen oralen Applikation. Dies ist eine sehr gute Voraussetzung für die Etablierung des Proteasominhibitors GNF-6702 als potentiell Therapeutikum.

### 5 Zusammenfassung

Die zuverlässige VL Diagnose ist für eine wirksame Krankheitsbekämpfung unerlässlich. Die derzeitigen Diagnosemethoden haben jedoch ihre Grenzen, da sie nicht ausreichend sensitiv und/oder spezifisch sind und möglicherweise nicht alle Fälle der VL in verschiedenen endemischen Gebieten identifizieren können oder Kreuzreaktionen mit anderen Infektionen aufweisen. Ziel dieser Studie war es, ein Antigen zu entwickeln, das für eine hochsensitive und/oder spezifische, stammunabhängige VL-Serodiagnose geeignet ist.

Die Kinesinproteine der Leishmanien sind dominante B-Zell-Antigene bei Patienten mit VL, d.h. infizierte Personen bilden IgG-Antikörper gegen das Kinesin. Die Sequenz und Struktur von Kinesinen (Anzahl der repeats) variiert jedoch stark zwischen unterschiedlichen Isolaten. Dies erklärt, warum die serologische Schnelldiagnose der VL unzuverlässig ist, da die kommerziell verfügbaren Tests auf rK39 (*L. infantum*-Brazil, 6.4 repeats) und rK16 (*L. donovani*-India, 4.0 repeats) basieren. In dieser Arbeit wurden rekombinante Kinesin-Proteine verschiedener VL Stämme hergestellt, die aus einer zunehmenden Anzahl von Repeats bestanden. Die Reaktivität dieser Proteine wurde mit Seren von VL-Patienten untersucht und gezeigt, dass die Anzahl der TR die Bindungsaffinität zwischen Antigenen und Antikörpern aufgrund der thermodynamischen Bindungskinetik beeinflusst.

Das rekombinante Protein, rKLi8.3, aus *L. infantum* wurde hergestellt und seine Leistungsfähigkeit mit anderen Kinesin-Antigenen (rK39 und rKLO8) verglichen. Das rKLi8.3-Antigen wurde für die Produktion eines ELISA und eines Lateral-Flow-POC-Geräts verwendet, die anschließend an einer Reihe von Seren aus Ostafrika, Indien und Südamerika getestet wurden. Darüber hinaus wurde rKLi8.3 an Leishmaniose erkrankten Hunden (CVL) getestet. Es zeigte sich, dass rKLi8.3 auch für die CVL-Diagnostik bestens eingesetzt werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der POC-Test auf der Grundlage von rKLi8.3 eine zuverlässige und verbesserte diagnostische Leistung aufweist, die in allen endemischen Gebieten gleich gut funktioniert.

Derzeit verfügbare Behandlungen für VL beschränken sich auf fünfwertige Antimonmittel, Amp B, Paromomycin und Miltefosine. Die Behandlung mit diesen Medikamenten ist langwierig, schlecht verträglich und zeigt z. T. starke Nebenwirkungen. Daher sind wirksame, sichere und leicht verabreichbare Arzneimittel für die VL erforderlich. Kürzlich

wurde ein selektiver Proteasomeninhibitor (GNF-6702) für Parasiten der Kinetoplastida (*T. brucei*, *T. cruzi* und *L. donovani*) beschrieben und erfolgreich im Tiermodell getestet. In dieser Arbeit wurde der Inhibitor GNF-6702 auf seine Wirksamkeit gegen verschiedene Erregerstämme der VL getestet. Im Vorfeld durchgeführte sequenzielle Untersuchungen der proteasomalen  $\beta$ 4- und  $\beta$ 5-UEs deuteten darauf hin, dass der Inhibitor ebenfalls gegen die kinetoplastiden Erreger der KL, der Schlafkrankheit und der Chagas-Krankheit wirksam sein könnte. Die Daten lieferten eine genetische und biochemische Validierung für den potentiellen Einsatz des Proteasomeninhibitors GNF-6702 bei VL, er ist sowohl bei der promastigoten als auch für amastigoten Form wirksam. Gleichzeitig zeigte er nur minimale Effekte bei den Wirtszellen der Leishmanien. Damit ist der Inhibitor GNF-6702 ein vielversprechender pharmakologischer Kandidat zur Behandlung der VL. Interessanterweise zeigte der Immunoproteasom-Inhibitor ONX-0914 keine Wirkung bei promastigoten Leishmanien, während er die Vitalität amastigoter Leishmanien signifikant reduzierte. Dieser Befund deutet auf eine strukturelle Veränderung des Proteasoms beim Übergang vom promastigoten zum amastigoten Stadium hin, was bisher noch nie beschrieben wurde.

## 6 Summary

A reliable VL diagnosis is essential for effective disease control. However, current diagnostic methods have limitations because they are not sufficiently sensitive and/or specific and may not identify all cases of VL from different endemic areas or may cross-react with other infections. The aim of this study was to develop a kinesin-based antigen suitable for highly sensitive and/or specific strain-independent VL serodiagnosis.

The kinesin proteins of *Leishmania* are dominant B-cell antigens in patients with VL, i.e. infected individuals form IgG antibodies against the kinesin. However, the sequence and structure of kinesins (number of repeats) varies greatly between different isolates. This explains why rapid serological diagnosis of VL is unreliable, as commercially available tests are based on rK39 (*L. infantum*, Brazil, 6.4 repeats) and rK16 (*L. donovani*, India, 4.0 repeats). In this work, the recombinant kinesin proteins of different VL strains were generated, which consisted of an increasing number of repeats. The reactivity of these proteins was studied using sera from VL patients and it was shown that the number of TR affects the binding affinity between antigens and antibodies due to the thermodynamic binding kinetics.

The recombinant protein, rKLi8.3, from *L. infantum* was produced and its performance was compared with other kinesin-derived antigens (rK39 and rKLO8). The rKLi8.3 antigen was used for the production of an ELISA and lateral flow POC device that were subsequently tested on a panel of sera from East-Africa, India and South America. In addition, rKLi8.3 was tested on dogs suffering from leishmaniasis and showed that rKLi8.3 can also be best used for CVL diagnostics. In conclusion, the POC test based on rKLi8.3 has a reliable and improved diagnostic performance that performed equally well in all endemic areas.

Currently available treatments for VL are limited to pentavalent antimony agents, Amp B, paromomycin, and miltefosine. Treatment with these drugs is lengthy, poorly tolerated, and sometimes has severe side effects. Therefore, effective, safe, and easily administered drugs are needed for VL. Recently, a selective proteasome inhibitor (GNF-6702) for parasites of the Kinetoplastida (*T. brucei*, *T. cruzi*, and *L. donovani*) was described and successfully tested in animal models.



Additionally, the inhibitor GNF-6702 was tested for its efficacy against different pathogen strains of VL. Sequential studies of the proteasomal  $\beta$ 4- and  $\beta$ 5-subunits performed in advance indicated that the inhibitor might also be effective against the kinetoplastid pathogens of KL, sleeping sickness, and Chagas disease. The data provided genetic and biochemical validation of the effectiveness of the inhibitor on the visceral leishmanial proteasome, regardless of their morphological form (promastigote, axenic, or intracellular amastigote). At the same time, it showed minimal effects in human cells. Thus, the inhibitor GNF-6702 is a promising pharmacological candidate for the treatment of VL. Interestingly, the immunoproteasome inhibitor ONX-0914 showed no effect in promastigote *Leishmania*, while it was able to significantly affect the viability of amastigote *Leishmania*. This suggests a structural alteration of the proteasome during the transition from promastigote to amastigote stage, which has never been described before. Further studies in this direction may uncover a new drug target in the amastigote proteasome.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, Lohoff M, Steinhoff U (2013) rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2322. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322>
- Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semião-Santos SJ, Sundar S, Walden P, Piarroux R, El Harith A, Lohoff M, Steinhoff U (2015) Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One* 10:e0116408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116408>
- Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J (2012) Leishmaniasis direct agglutination test: Using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1946. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001946>
- Addy M, Nandy A (1992) Ten years of kala-azar in west Bengal, Part I. Did post-kala-azar dermal leishmaniasis initiate the outbreak in 24-Parganas? *Bull World Health Organ* 70:341–346
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine Leishmaniasis. In: *Advances in Parasitology* Volume 57, vol 57. Elsevier, pp 1–88
- Alvar J, Yactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22:552–557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Ashford RW (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14:523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081x\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081x(96)00041-7)

- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends Parasitol* 24:324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F (2007) *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In: *Advances in Parasitology Volume 64*, vol 64. Elsevier, pp 1–458
- Bates PA (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37:1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates PA (2018) Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nat Microbiol* 3:529–530. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV (2009) Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* 386:814–827. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.081>
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E (1998) The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 92:367–380. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80929-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80929-0)
- Beer P de, el Harith A, Deng LL, Semiao-Santos SJ, Chantal B, van Grootheest M (1991) A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 44:283–289. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.283>
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UCM, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth T-J, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DMA, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream M-A, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CMR, Tait A, Tivey AR, van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu

- E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309:416–422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>
- Berzofsky JA (1985) Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 229:932–940. <https://doi.org/10.1126/science.2410982>
- Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YAW (1999) Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: Two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102:249–261. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)00098-5](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00098-5)
- Bibo-Verdugo B, Jiang Z, Caffrey CR, O'Donoghue AJ (2017) Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease. *FEBS J* 284:1503–1517. <https://doi.org/10.1111/febs.14029>
- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, Bourdoiseau G (2001) Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J* 162:108–120. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0556>
- Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, van Damme W, Le Ray D, van der Stuyft P (2000) Visceral leishmaniasis control: A public health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94:465–471. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90055-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90055-5)
- Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, Rijal S (2014) Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD009135. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009135.pub2>
- Bourdeau P, Saridomichelakis MN, Oliveira A, Oliva G, Kotnik T, Gálvez R, Foglia Manzillo V, Koutinas AF, Pereira da Fonseca I, Miró G (2014) Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: A questionnaire-based multinational survey. *Parasit Vectors* 7:110. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-110>
- Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M (2017) Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol* 429:3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>
- Burge RJ, Damianou A, Wilkinson AJ, Rodenko B, Mottram JC (2020) *Leishmania* differentiation requires ubiquitin conjugation mediated by a UBC2-UEV1 E2 complex. *PLoS Pathog* 16:e1008784. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008784>

- Burns JM, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, Reed SG (1992) Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1239–1243. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1239>
- Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:775–779. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.775>
- Bzymek M, Lovett ST (2001) Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8319–8325. <https://doi.org/10.1073/pnas.111008398>
- Calvopina M, Guevara AG, Armijos RX, Hashiguchi Y, Davidson RN, Cooper PJ (2004) Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 43:659–663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02183.x>
- Cao Y, Zhu H, He R, Kong L, Shao J, Zhuang R, Xi J, Zhang J (2020) Proteasome, a Promising Therapeutic Target for Multiple Diseases Beyond Cancer. *Drug Des Devel Ther* 14:4327–4342. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265793>
- Casalle N, Barros Pinto Grifoni L de, Bosco Mendes AC, Delort S, Massucato EMS (2020) Mucocutaneous Leishmaniasis with Rare Manifestation in the Nasal Mucosa and Cartilage Bone Septal. *Case Rep Infect Dis* 2020:8876020. <https://doi.org/10.1155/2020/8876020>
- Cavalcanti ATdAe, Medeiros Z, Lopes F, Andrade LDd, Ferreira VdM, Magalhães V, Miranda-Filho DdB (2012) Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: A case series study in Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54:43–47. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000100008>
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5:873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chawla B, Madhubala R (2010) Drug targets in *Leishmania*. *J Parasit Dis* 34:1–13. <https://doi.org/10.1007/s12639-010-0006-3>
- Collins GA, Goldberg AL (2017) The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169:792–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>

- Coppel RL, Cowman AF, Anders RF, Bianco AE, Saint RB, Lingelbach KR, Kemp DJ, Brown GV (1984) Immune sera recognize on erythrocytes Plasmodium falciparum antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 310:789–792. <https://doi.org/10.1038/310789a0>
- Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH (1987) The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology* 36:2633–2636. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90543-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90543-0)
- Dagenbach EM, Endow SA (2004) A new kinesin tree. *J Cell Sci* 117:3–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.00875>
- Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149:139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>
- David CV, Craft N (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22:491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- Delucchi M, Schaper E, Sachenkova O, Elofsson A, Anisimova M (2020) A New Census of Protein Tandem Repeats and Their Relationship with Intrinsic Disorder. *Genes (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/genes11040407>
- Ejazi SA, Ali N (2013) Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:79–98. <https://doi.org/10.1586/eri.12.148>
- Fernández-Arévalo A, El Baidouri F, Ravel C, Ballart C, Abras A, Lachaud L, Tebar S, Lami P, Pratlong F, Gállego M, Muñoz C (2020) The *Leishmania donovani* species complex: A new insight into taxonomy☆. *Int J Parasitol* 50:1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.013>
- Franssen SU, Durrant C, Stark O, Moser B, Downing T, Imamura H, Dujardin J-C, Sanders MJ, Mauricio I, Miles MA, Schnur LF, Jaffe CL, Nasereddin A, Schallig H, Yeo M, Bhattacharyya T, Alam MZ, Berriman M, Wirth T, Schönian G, Cotton JA (2020) Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *Elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51243>
- Fujisawa K, Silcott-Niles C, Simonson P, Lamattina D, Humeres CA, Bhattacharyya T, Mertens P, Thunissen C, O'Rourke V, Pańczuk M, Whitworth JA, Salomón OD, Miles MA (2021) Emergent canine visceral leishmaniasis in Argentina: Comparative diagnostics

- and relevance to proliferation of human disease. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009552. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009552>
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D (1992) An in vitro model for screening antileishmanial drugs: The human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Tropica* 51:237–245. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90042-v](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90042-v)
- Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN (2015) Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med* 3:43–50. <https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0002>
- Gerald NJ, Coppens I, Dwyer DM (2007) Molecular dissection and expression of the LdK39 kinesin in the human pathogen, *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol* 63:962–979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05487.x>
- Ghosh M, Roy K, Roy S (2013) Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *J Antimicrob Chemother* 68:2834–2838. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt262>
- Goto Y, Coler RN, Guderian J, Mohamath R, Reed SG (2006) Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. *Infect Immun* 74:3939–3945. <https://doi.org/10.1128/IAI.00101-06>
- Goto Y, Coler RN, Reed SG (2007) Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. *Infect Immun* 75:846–851. <https://doi.org/10.1128/IAI.01205-06>
- Goto Y, Carter D, Reed SG (2008) Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect Immun* 76:3967–3974. <https://doi.org/10.1128/IAI.00604-08>
- Handman E (1999) Cell Biology of *Leishmania*. In: *Advances in Parasitology* Volume 44, vol 44. Elsevier, pp 1–39
- Hommelsheim CM, Frantzeskakis L, Huang M, Ülker B (2014) PCR amplification of repetitive DNA: A limitation to genome editing technologies and many other applications. *Sci Rep* 4:5052. <https://doi.org/10.1038/srep05052>
- Inceboz T (2019) Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. In: J. Rodriguez-Morales A (ed) *Current Topics in Neglected Tropical Diseases*. IntechOpen
- Iwai S, Ishiji A, Mabuchi I, Sutoh K (2004) A novel actin-bundling kinesin-related protein from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 279:4696–4704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308022200>

- J B, M BM, Chanda K (2021) An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Front Chem* 9:622286. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>.
- Jespersen MC, Mahajan S, Peters B, Nielsen M, Marcatili P (2019) Antibody Specific B-Cell Epitope Predictions: Leveraging Information From Antibody-Antigen Protein Complexes. *Front Immunol* 10:298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00298>
- Kane MM, Mosser DM (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 166:1141–1147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1141>
- Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9:604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>
- Khare S, Nagle AS, Biggart A, Lai YH, Liang F, Davis LC, Barnes SW, Mathison CJN, Myburgh E, Gao M-Y, Gillespie JR, Liu X, Tan JL, Stinson M, Rivera IC, Ballard J, Yeh V, Groessl T, Federe G, Koh HXY, Venable JD, Bursulaya B, Shapiro M, Mishra PK, Spraggon G, Brock A, Mottram JC, Buckner FS, Rao SPS, Wen BG, Walker JR, Tuntland T, Molteni V, Glynn RJ, Supek F (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature* 537:229–233. <https://doi.org/10.1038/nature19339>
- Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K (2015) New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* 2015:541984. <https://doi.org/10.1155/2015/541984>
- Kopp P, Lammers R, Aepfelbacher M, Woehlke G, Rudel T, Machuy N, Steffen W, Linder S (2006) The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell* 17:2811–2823. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-11-1010>
- Krüger E, Kloetzel P-M, Enenkel C (2001) 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 83:289–293. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01241-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01241-x)
- Kumar R, Nylén S (2012) Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol* 3:251. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>
- Kumar A (2013) *Leishmania and Leishmaniasis*, vol 3. Springer New York, New York, NY
- Larsen JEP, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2:2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>



- Leister H, Krause FF, Mahdavi R, Steinhoff U, Visekruna A (2022) The Role of Immunoproteasomes in Tumor-Immune Cell Interactions in Melanoma and Colon Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 70:5. <https://doi.org/10.1007/s00005-022-00644-x>
- Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A (2006) Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8:1922–1931. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x>
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA (2007) Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9375–9380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>
- Maarouf M, Lawrence F, Brown S, Robert-Gero M (1997) Biochemical alterations in paromomycin-treated Leishmania donovani promastigotes. *Parasitol Res* 83:198–202. <https://doi.org/10.1007/s004360050232>
- Mandal G, Wyllie S, Singh N, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M (2007) Increased levels of thiols protect antimony unresponsive Leishmania donovani field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology* 134:1679–1687. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003150>
- Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H (2013) Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep* 7:31–41. <https://doi.org/10.3315/jdcr.2013.1135>
- Matos APS, Viçosa AL, Ré MI, Ricci-Júnior E, Holandino C (2020) A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 57:101664. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101664>
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA (2000) The Strange Case of Leishmania chagasi. *Parasitology Today* 16:188–189. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01637-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01637-9)
- Mehlhorn H (2012) *Die Parasiten des Menschen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Méndez-Vilas A (ed) (2013) Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. Microbiology book series, vol 4. Formatex Research Center, Badajoz
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43:5515–5519. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005>
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005) Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15:467–476. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.006>
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM (2005) A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. *J Exp Med* 201:747–754. <https://doi.org/10.1084/jem.20041470>
- Mondal S, Bhattacharya P, Ali N (2010) Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:919–944. <https://doi.org/10.1586/eri.10.78>
- Moore EM, Lockwood DN (2010) Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2:151–158. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62883>
- Muñoz C, San Francisco J, Gutiérrez B, González J (2015) Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. *Biomed Res Int* 2015:141526. <https://doi.org/10.1155/2015/141526>
- Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM, Kager PA (1997) Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 35:2454–2457. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.10.2454-2457.1997>
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O (2004) Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 42:2769–2770. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2769-2770.2004>
- Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O (2001) Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 65:510–517. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.510>

- Park J, Cho J, Song EJ (2020) Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharm Res* 43:1144–1161. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01281-8>
- Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, Colombara D, Abdoon AO, Mukhtar MM, Mondal D, Esfandiari J, Kumar S, Chun P, Reed SG, Bhatia A (2010) Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>
- Qu J-Q, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Abdur-Rab M, Aksu HSZ, Reed SG, Chang K-P, Gilman-Sachs A (1994) Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a Leishmania kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:543–545. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90154-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90154-6)
- Quinnell RJ, Courtenay O (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136:1915–1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Ready PD (2014) Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 6:147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
- Reguera RM, Pérez-Pertejo Y, Gutiérrez-Corbo C, Domínguez-Asenjo B, Ordóñez C, García-Estrada C, Martínez-Valladares M, Balaña-Fouce R (2019) Current and promising novel drug candidates against visceral leishmaniasis. *Pure and Applied Chemistry* 91:1385–1404. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1102>
- Reithinger R, Brooker S, Kolaczinski JH (2007) Visceral leishmaniasis in eastern Africa--current status. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:1169–1170. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.06.001>
- Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M (2004) Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: Value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:899–904. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1249-7>
- RUDZINSKA MA, D ALESANDRO PA, TRAGER W (1964) THE FINE STRUCTURE OF LEISHMANIA DONOVANI AND THE ROLE OF THE KINETOPLAST IN THE LEISHMANI-

- LEPTOMONAD TRANSFORMATION. J Protozool 11:166–191.  
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1964.tb01739.x>
- Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S (2016) Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis* 53:8–16
- Scott Weese (2018) Canine Leishmania map.  
<https://www.wormsandgermsblog.com/2018/07/articles/animals/dogs/canine-leishmania-map/>
- Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: Formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol* 42:928–938. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.928>
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D (2001) Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 276:3971–3976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005423200>
- Singh S, Dey A, Sivakumar R (2005) Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* 5:251–265. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.251>
- Sivakumar R, Sharma P, Chang K-P, Singh S (2006) Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein Expr Purif* 46:156–165. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.027>
- Sivakumar R, Dey A, Sharma P, Singh S (2008) Expression and characterization of a recombinant kinesin antigen from an old Indian strain (DD8) of *Leishmania donovani* and comparing it with a commercially available antigen from a newly isolated (KE16) strain of *L. donovani*. *Infect Genet Evol* 8:313–322. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.02.004>
- Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S (2011a) Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One* 6:e19304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019304>
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S (2011b) Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>
- Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF (2020) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

- Sunter J, Gull K (2017) Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Thakur S, Joshi J, Kaur S (2020) Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* 44:253–272. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S (2008) Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci* 97:2405–2425. <https://doi.org/10.1002/jps.21179>
- Vale RD (2003) The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell* 112:467–480. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00111-9)
- van den Bogaart E, Berkhout MMZ, Adams ER, Mens PF, Sentongo E, Mbulamberi DB, Straetemans M, Schallig HDFH, Chappuis F (2012) Prevalence, features and risk factors for malaria co-infections amongst visceral leishmaniasis patients from Amudat Hospital, Uganda. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1617. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001617>
- Verma NK, Dey CS (2004) Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3010–3015. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004>
- Vexenat AdC, Santana JM, Teixeira AR (1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38:177–185. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651996000300003>
- Walochnik Julia AH (2010) Sandmücken, Leishmanien und Leishmaniosen – neue Dimensionen alter Krankheiten. *Denisia* 2010:673–694
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH (2007) Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 135:195–201. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006881>
- WHO (2021a) Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2020. [https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis\\_cl\\_2020.png?sfvrsn=81df4387\\_5](https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_cl_2020.png?sfvrsn=81df4387_5)

- WHO (2021b) Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020. [https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis\\_vl\\_2020.png?sfvrsn=66521bbf\\_5](https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2020.png?sfvrsn=66521bbf_5)
- WHO (2022) Leishmaniasis. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Wortmann G, Hochberg L, Houg H-H, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF (2005) Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 73:999–1004
- Xie SC, Dick LR, Gould A, Brand S, Tilley L (2019) The proteasome as a target for protozoan parasites. *Expert Opin Ther Targets* 23:903–914. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1685981>
- Zijlstra EE, Am Musa, Khalil EAG, Im El Hassan, Am El-Hassan (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 3:87–98. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00517-6)

## 8 Anhang

### 8.1 Kinesin Sequenzen

#### 8.1.1 DNA-Sequenz von *KLi8.3 (L. infantum)*

GAGCTCGCAACCGAGTGGGAGGACGCACTCCGCGAGCGTGGCGCTTGCAGAGCGTGACGAAGCCGCTGCAGCCG  
 AACTTGATGCCGAGCCTCTACTTCCAAAAACGCACGTGAAAGCGCTCCGAGCGGCTAACCAGCCTTGAGCA  
 GCTGCTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCGAAGATG  
 TCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTG  
 CGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTCGTGCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAG  
 GGCCGCGTTGGAGCAGCTGCTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACT  
 GCTGCTGCGAAGATGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGCAGCAGCTTCGTGACT  
 CCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCGAAGATGTCGGCGGAGCAGGA  
 CCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGT  
 CAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCGAAGACGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGC  
 AGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTC  
 GTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCT  
 GCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTCGTGCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGA  
 GGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCAC  
 TACTGCTGCGAAGATGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACT  
 TCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGC

#### 8.1.2 Basensequenzen von rekombinantem 6xhis-KLi8.3 (*L. infantum*)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGAGCTCGCAA  
 CCGAGTGGGAGGACGCACTCCGCGAGCGTGGCGCTTGCAGAGCGTGACGAAGCCGCTGCAGCCGAACCTTGATGC  
 CGCAGCCTCTACTTCCAAAAACGCACGTGAAAGCGCTCCGAGCGGCTAACCAGCCTTGAGCAGCTGCTTCGC  
 GAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCGAAGATGTCGGCGGAGC  
 AGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGC  
 GAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTCGTGCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTG  
 GAGCAGCTGCTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGA  
 AGATGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCG  
 CGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCGAAGATGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAAC  
 ACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGT  
 CCACTACTGCTGCGAAGACGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGCAGCAGCTTCG  
 TACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTCGTGCGGCGGAG  
 CAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCGCGTTGGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGG  
 CGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTGCGAAGTCGTGCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCT  
 AGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGTCAGCTGGAGTCCACTACTGCTGCG  
 AAGATGTCGGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCTTCGTGACTCCGAGGAGC  
 GCGCTGCGGAGTAA

#### 8.1.3 Aminosäuren-Sequenz von rekombinantem 6xhis-rKLi8.3 (*L. infantum*)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESASERLTSLEQLLR  
 ESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTAAL  
 EQLLRESEERAAELASQLEATAAAKMSAEQDRENTAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDREN  
 TRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAE  
 QDRENTAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAA  
 KMSAEQDRENTATLEQQLRDSEERAAE

#### 8.1.4 Aminosäuren-Sequenz von rekombinantem 6xhis-rKLi6.3 (*L. infantum*)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESASERLTSLEQLLR  
 ESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTAAL  
 EQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDREN  
 TRAALEQQLLESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAE  
 QDRENTAALEQQLRDSEERAAE

### 8.1.5 Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKLi7.3 (*L. infantum*)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESASERLTSLEQLLR  
ESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATL  
EQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDREN  
TRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAE  
QDRENTTRAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAE

### 8.1.6 Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKld8.3 (*L. donovani*)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESASERLTSLEQLLR  
ESEERAAELKAELEATAAAKSSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATL  
EQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRAALEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDREN  
TRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAE  
QDRENTTRAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAA  
KSSAEQDRENTTRAALEQQLRDSEERAAE

### 8.1.7 Aminosäuren-Sequenz von rekombinatem 6xhis-rKld8.3 (*L. archibaldi*)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESASERLTSLEQLLR  
DSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRAALEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTTRATL  
EQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKMSAEQDRENTTRAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDREN  
TRAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAE  
QDRENTTRAALEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAA  
KMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEERAAE

## 8.2 Sequenzen proteasomaler $\beta 4$ und $\beta 5$ -Untereinheiten von Leishmanien

### 8.2.1 Basensequenzen der $\beta 4$ -Untereinheiten

#### 8.2.1.1 *Leishmania donovani* LEM2349

CTAGTGCACCGCCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
ACGACGCGGGCCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATACGGCACAGCCTGCAG  
GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTCGTATCCTCGGAAACCGGCATGTGCG  
TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
TGAAGTTGCGCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTTCTGCCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
GTAATCTTGTCTCCGCGTTCGGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
AGTCCTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

#### 8.2.1.2 *Leishmania donovani* LEM2133

AGGCGGAGACTGCGATTGCGTTCCGCTGCCAGGACTACGTATGGTTCGCTGCGGCCGGCCTCAACGCCTTCTA  
CTACATCAAGATAACCGACGCGGAGGACAAGATTACGCAGCTTGACACACATCAGCTGATCGCGTGCCTGGC  
GAGAATGGCCCTCGCGTGAACCTTACCGAATACGTAAAGTGCAACCTCATGCTCAACCGCATGCGCCAGCACG  
GGCGCCACAGCAGCTGCGATTCAACGGCGAACTTTCATGCGCAACTGCCTCGCCAGTGCATCCGCAGTGC  
GGGGGCTTACCAGGTGAACCTGCCTCTTTGCCGGCTACGACATGCCGGTTTCCGAGGATGACGACGGTGC  
GGACCGCAGCTGTTTTACTTGGACTACCTCGGCACCTGCAGGCTGTGCCGTATGGTTGCCATGGCTACGGAG  
CTTGCTTTGTGACTGCTCTGCTAGATTGCCCTCGCGTCTGATTTGACCCAACAGGAGGGCCTTGAGCTCAT  
GCAGAAGTGTGCGATGAGGTGAAGCGCCGCGTTCATCAGCAACTCATACTTCTTTGTGAAGGCGGTGACG  
AAGAACGGAGTAGAGGTATCACGGCGGTGCACTAG

#### 8.2.1.3 *Leishmania donovani* LEM1791

ATGGCGGAGACTGCGATTGCGTTCCGCTGCCAGGACTACGTATGGTTCGCTGCGGCCGGCCTCAACGCCTTCT  
ACTACATCAAGATAACCGACGCGGAGGACAAGATTACGCAGCTTGACACACATCAGCTGATCGCGTGCCTGG  
CGAGAATGGCCCTCGCGTGAACCTTACCGAATACGTAAAGTGCAACCTCATGCTCAACCGCATGCGCCAGCAC  
GGGCGCCACAGCAGCTGCGATTCAACGGCGAACTTTCATGCGCAACTGCCTCGCCAGTGCATCCGCAGTGC  
AGGGGGCTTACCAGGTGAACCTGCCTCTTTGCCGGCTACGACATGCCGGTTTCCGAGGATGACGACGGTGC  
GGGACCGCAGCTGTTTTACTTGGACTACCTCGGCACCTGCAGGCTGTGCCGTATGGTTGCCATGGCTACGGAG



GCTTGCTTTGTGACTGCTCTGCTAGATTGCCTCTGGCGTCTCTGATTTGACCCAACAGGAGGGCCTTGAGCTCA  
TGCAGAAGTGCTGCGATGAGGTGAAGCGCCGCTGCTCATCAGCAACTCATACTTCTTTGTGAAGGCGGTGAC  
GAAGAACGGAGTAGAGGTCATCACGGCGGTGCACTAG

#### 8.2.1.4 *Leishmania donovani* LEM0703

ATGGCGGAGACTGCGATTGCGTTCCGCTGCCAGGACTACGTTCATGGTCGCTGCGGCGGGCCTCAACGCCTTCT  
ACTACATCAAGATAACCGACGCGGAGGACAAGATTACGCAGCTTGACACACATCAGCTGATCGCGTGCCTGG  
CGAGAATGGCCCTCGCGTGAACCTCACCGAATACGTAAAGTGCAACCTCATGCTCAACCGCATGCGCCAGCAC  
GGGCGCCACAGCAGCTGCGATTCAACGGCGAACTTCATGCGCAACTGCCCTGCCAGTGCGATCCGCAGTCGCG  
AGGGGGCTTACCAGGTGAACCTGCTCTTTGCGCGGTACGACATGCCGGTTTCCGAGGATGACGACGGTGCGGT  
GGGACCGCAGCTGTTTTACTTGACTACCTCGGCACCTGCAGGCTGTGCCGTATGGTTGCCATGGCTACGGA  
GCTTGCTTTGTGACTGCTCTGCTAGATTGCCCTGCGCGTCTGATTTGACCCAACAGGAGGGCCTTGAGCTCA  
TGCAGAAGTGCTGCGATGAGGTGAAGCGCCGCTGCTCATCAGCAACTCATACTTCTTTGTGAAGGCGGTGAC  
GAAGAACGGAGTAGAGGTCATCACGGCGGTGCACTAG

#### 8.2.1.5 *Leishmania archibaldi* LEM3463

ATTCCGCTAGTGACCCGCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTG  
CTGATGACGACGCGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAAT  
CAGGACGTCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGC  
CTGCAGGGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTTCGTCATCCTCGGAAACCGGC  
ATGTCGTAGCCGGCAAAGAGGCAGTTACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGT  
TGCGCATGAAGTTGCGCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTT  
GCACTTTACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCGCGCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCA  
AGCTGCGTAATCTTGTCTCCGCGTCCGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCA  
TGACGTAGTCTTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

#### 8.2.1.6 *Leishmania archibaldi* LEM2350

CTAGTGACCCGCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGCCTGCAG  
GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTTCGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCG  
TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
TGAAGTTGCGCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCGCGCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
GTAATCTTGTCTCCGCGTCCGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
AGTCTTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

#### 8.2.1.7 *Leishmania archibaldi* LEM3475

CTAGTGACCCGCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGCCTGCAG  
GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTTCGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCG  
TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
TGAAGTTGCGCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCGCGCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
GTAATCTTGTCTCCGCGTCCGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
AGTCTTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

#### 8.2.1.8 *Leishmania infantum* LEM0949

CTAGTGACCCGCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGCCTGCAG  
GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTTCGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCG  
TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
TGAAGTTGCGCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCGCGCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
GTAATCTTGTCTCCGCGTCCGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
AGTCTTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

**8.2.1.9 *Leishmania infantum* LEM0235**

CTAGTGCACCGCCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
 ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
 GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGCCTGCAG  
 GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTCGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCTG  
 TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTCACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
 TGAAGTTCGCCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
 TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCTCGCCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
 GTAATCTTGTCTCCGCGTCGGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
 AGTCCTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

**8.2.1.10 *Leishmania infantum* LEM0461**

ATGGCGGAGACTGCGATTGCGTTCGCTGCCAGGACTACGTTCATGGTCGCTGCGGCCGGCCCTCAACGCCTTCT  
 ACTACATCAAGATAACCGACGCGGAGGACAAGATTACGCAGCTTGACACACATCAGCTGATCGCGTGCCTGG  
 CGAGAATGGCCCTCGCGTGAACCTTACCCGAATACGTAAAGTGCAACCTCATGCTCAACCGCATGCGCCAGCAC  
 GGGCGCCACAGCAGCTGCGATTCAACGGCGAACTTCATGCGCAACTGCCCTCGCCAGTGCATCCGCAGTCGCG  
 AGGGGGCTTACCAGGTGAACCTGCTCTTTGCCGGCTACGACATGCCGGTTTCCGAGGATGACGACGGTGCAGT  
 GGGACCGCAGCTGTTTTACTTGGACTACCTCGGCACCCGTCAGGCTGTGCCGTATGGTTGCCATGGCTACGGA  
 GCTTGCTTTGTGACTGCTCTGCTAGATTGCCTCTGGCGTCTGATTTGACCCAACAGGAGGGCCTTGAGCTCA  
 TGCAGAAGTGTGCTGCGATGAGGTGAAGCGCCGCGTCTCATCAGCAACTCATACTTCTTTGTGAAGCGGTTGAC  
 GAAGAACCGGAGTAGAGGTCATCACGGCGGTGCACTAG

**8.2.1.11 *Leishmania infantum* LEM0108**

CTAGTGCACCGCCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTATGAGTTGCTGATG  
 ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
 GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCTCCGTAGCCATGGCAACCATAACGGCACAGCCTGCAG  
 GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCGTCGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCTG  
 TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTCACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
 TGAAGTTCGCCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGGCGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCACTT  
 TACGTATTCGGTGAAGTTCACGCGAGGGCCATTCTCGCCAGTGCACGCGATCAGCTGATGTGTGTCAAGCTGC  
 GTAATCTTGTCTCCGCGTCGGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
 AGTCCTGGCAGCGGAACGCAATCGCAGTCTCCGCCAT

**8.2.1.12 *Leishmania chagasi* LEM0590**

ATGGCGGAGACTGCGATTGCGTTCGCTGCCAGGACTACGTTCATGGTCGCTGCGGCCGGCCCTCAACGCCTTCT  
 ACTACATCAAGATAACCGACGCGGAGGACAAGATTACGCAGCTTGACACACATCAGCTGATCGCGTGCCTGG  
 CGAGAATGGCCCTCGCGTGAACCTTACCCGAATACGTAAAGTGCAACCTCATGCTCAACCGCATGCGCCAGCAC  
 GGGCGCCACAGCAGCTGCGATTCAACGGCGAACTTCATGCGCAACTGCCCTCGCCAGTGCATCCGCAGTCGCG  
 AGGGGGCTTACCAGGTGAACCTGCTCTTTGCCGGCTACGACATGCCGGTTTCCGAGGATGACGACGGTGCAGT  
 GGGACCGCAGCTGTTTTACTTGGACTACCTCGGCACCCGTCAGGCTGTGCCGTATGGTTGCCATGGCTACGGA  
 GCTTGCTTTGTGACTGCTCTGCTAGATTGCCTCTGGCGTCTGATTTGACCCAACAGGAGGGCCTTGAGCTCA  
 TGCAGAAGTGTGCTGCGATGAGGTGAAGCGCCGCGTCTCATCAGCAACTCATACTTCTTTGTGAAGCGGTTGAC  
 GAAGAACCGGAGTAGAGGTCATCACGGCGGTGCACTAG

**8.2.1.13 *Leishmania major* LEM2009**

CTAGTGCACCGCCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTGTGAGTTGCTGATG  
 ACGACGCGGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
 GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCGCCGTAGCCGTGGCAACCATAACGGTACAGCCTGCAG  
 GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAAAACAGCTGCGGTCCCACCGCACCATTTGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCTG  
 TAGCCGGCAAAGAGGCAGTTCACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
 TGAAGTTCGCCGTTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGACGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCGCTT  
 GACGTATTCAGTGAAGTTCACGCGAGGGCCGTTCTCGCCAGTGCACGCGACCAACTGATGTGTGTCAAGCTGC  
 GTAATCTTGTCTCCGCGTCGGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
 AGTCCTGGCAGCGGAACGCAATTCGAGTCTCCGCCAT

## 8.2.2 Basensequenzen der $\beta$ 5-Untereinheiten

### 8.2.2.1 *Leishmania donovani* LEM2349

CTACTGGGACGGAAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACTACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTTCGCCA  
GAATCTTGCTCGCCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAAACGGAAGGCGAGGGTTCGTCTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTTCGGTGGTTTGTCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.2 *Leishmania donovani* LEM2133

CTACTGGGACGGAAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACTACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTTCGCCA  
GAATCTTGCTCGCCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAAACGGAAGGCGAGGGTTCGTCTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTTCGGTGGTTTGTCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.3 *Leishmania donovani* LEM1791

CTACTGGGACGGAAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACTACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTTCGCCA  
GAATCTTGCTCGCCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAAACGGAAGGCGAGGGTTCGTCTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTTCGGTGGTTTGTCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.4 *Leishmania donovani* LEM0703

ATGTTTCGCTGATTTTCGAGTCCGTCATGTCGTCCAACCTTCAGGTTGGACGACTGCCCGAGGGTGGGCCCCCTTTA  
CGTACCACAACATGGATGAGGACACGCTGGAGGAACCGCTGTCACTGTGCTCCTACAGACGCGCTCCACAGCA  
AACCACCGAAAAGATCGCCGGCTTCTTGCAGATGCTGTGACGGCCGACCCGCTCGACTCCAGCCGCTACCTCCAC  
GGCGAGAACCCTTGGTGGACGCTGACGGCGTTCGTGCCAGTGGCGGAGCAATCCCAAAGATTGACATGAAGA  
AGGGTACGACGACCCTTCGCTTCCGTTTCAACGGCGGCATCATCGTTGCCGTGACTCGCGTGCCTGACGGG  
GCAGTACATCGCATCACAGACGGTGTGAAGGTCTGGAGATCAACGACTACCTACTGGGTACGCTTGTGGT  
GGTGCAGCCGATTGCCAATACTGGGAGCGCGTGTGGTATGGAGTGGCCCTGTGGGAGTTGCGCAACGGCA  
GCCGCATACCGTTCGCGGCGGCGAGCAAGATTTCTGGCGAACATCACGTACGCCCTACCGCAACCAGGACTTTTC  
GATGGGCACGATGCTGGCCGGCTGGGATCAGTTTGGCCCTTCGCTCTACTACGTGGACGACAAGGGCTCTCGC  
GTGAAAACAGGACCTTTCAGTGTGCGCTCCGGTCCATTTACGCTTACGGTGTGCTTGACACGGGCTACCGCA

AGGACCTCTCTGTGCGAGGATGCGTGTGACCTGGCGCGCCGCTCCATCTTCCACGCGACGTACCGCGATGGCGC  
CTCTGGCGGTATCGTGACAGTGTACCACGTGCACGAGAAGGGCTGGACCAAGATCTCGCGCGATGACCAGACG  
AAGTCTACGACCGCTACTTTCCGTCCCAGTAG

### 8.2.2.5 *Leishmania archibaldi* LEM3463

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACACTGTACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCCTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCGACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCCTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCCGTGGTTTGTCTGTGGAGCGCGTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAGGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.6 *Leishmania archibaldi* LEM2350

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACACTGTACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCCTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCGACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCCTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCCGTGGTTTGTCTGTGGAGCGCGTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAGGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.7 *Leishmania archibaldi* LEM3475

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACACTGTACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCCTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCGACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCCTGGGCA  
CGACGCCGTACGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTTCGAGCGGGTTCGGCCGTACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCCGTGGTTTGTCTGTGGAGCGCGTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAGGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.8 *Leishmania infantum* LEM0949

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTACACTGTACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGAAGATGGAGCGGGCGCG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCCCTTGCAGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCCTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCGACGCGAGTTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCCTGGGCA

CGACGCCGTCAGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTCGAGCGGGTCGGCCGTCACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCGGTGGTTTGCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.9 *Leishmania infantum* LEM0235

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTAAACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGGAAAGATGGAGCGGGCGG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCTTTCGGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTCGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTCAGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTCGAGCGGGTCGGCCGTCACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCGGTGGTTTGCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.10 *Leishmania infantum* LEM0461

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTAAACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGGAAAGATGGAGCGGGCGG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCTTTCGGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTCGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTCAGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTCGAGCGGGTCGGCCGTCACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCGGTGGTTTGCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.11 *Leishmania infantum* LEM0108

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGCGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTAAACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGGAAAGATGGAGCGGGCGG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCTTTCGGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG  
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTGACGCACGCGAGTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
CGTTGAAACGGAAAGGCGAGGGTCGTTCGTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
CGACGCCGTCAGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTCGAGCGGGTCGGCCGTCACA  
GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCGGTGGTTTGCTGTGGAGCGGCTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAAGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.12 *Leishmania chagasi* LEM0590

CTACTGGGACGGAAAGTAGCGGTCGTAGAGCTTCGTCTGGTCATCGCGAGAGATCTTGGTCCAGCCCTTCTCG  
TGCACGTGGTAAACTGTCACGATACCGCCAGAGGCGCCATCGCGGTACGTTCGCGTGGAAAGATGGAGCGGGCGG  
CCAGGTTCGACGCATCCTCGACAGAGAGGTCTTTCGGGTAGCCCGTGTCAAGCACACCGTAAGCGTAAATGGA  
GCCGGAGCCGACACTGAAGAGGTCTGTTTCACGCGAGAGCCCTTGTCTCCACGTAGTAGAGCGAAGGGCCA  
AACTGATCCCAGCCGGCCAGCATCGTGCCCATCGAAAGTCCGTGGTTGCGGTAGGCGTACGTGATGTTCCGCA  
GAATCTTGCTCGCCGCCGCGACGGTGATGCGGCTGCCGTTGCGCAACTCCCACAGGCGGCACTCCATAACCAAG  
CACGCGCTCCCAGTATTGGCAATCGGCTGCACCACCAGCAAGCGTACCCAGTAGGTAGTCGTTGATCTCCAGG

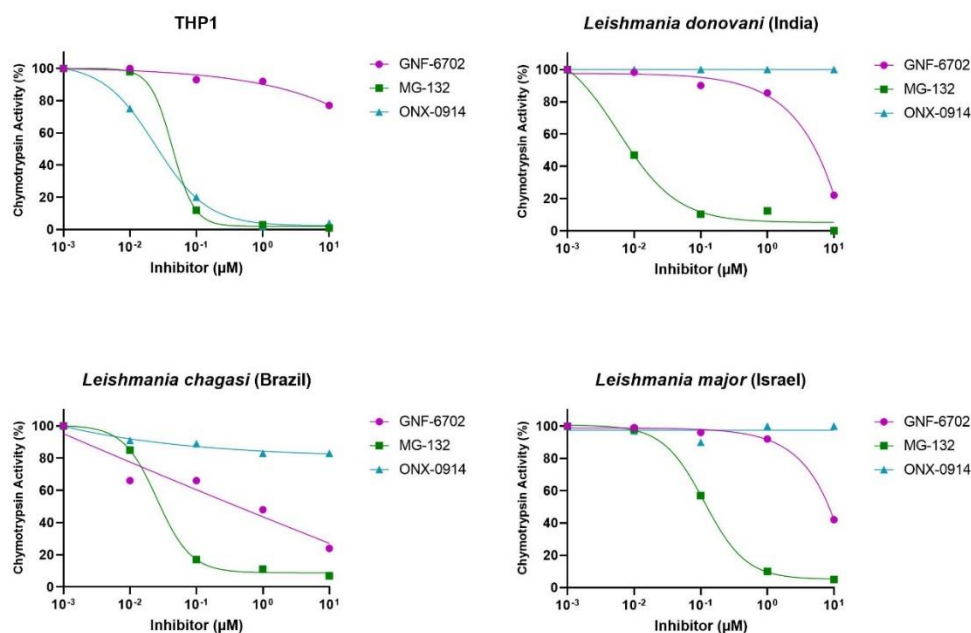
ACCTTCAGCACCGTCTGTGATGCGATGTACTGCCCCGTCGACGCACGCGAGTCGACGGCAACGATGATGCCGC  
 CGTTGAAACGGAAGGCGAGGGTCGTCTACCCCTTCTTCATGTCAATCTTTGGGATTGCTCGCGGCACTGGGCA  
 CGACGCCGTCAGCGTCCAGCAACGGTTCTCGCCGTGGAGGTAGCGGCTGGAGTCGAGCGGGTCGGCCGTCACA  
 GCATCGCAGGAAGCCGGCGATCTTTCGGTGGTTTGTGTGGAGCGCGTCTGTAGGAGCACAGTGACAGCGGTT  
 CCTCCAGCGTGTCTCATCCATGTTGTGGTACGTAAGGGGCCACCCCTCGGGCAGTCGTCCAACGTGAAGTT  
 GGACGACATGACGGACTCGAAATCAGCGAACAT

### 8.2.2.13 *Leishmania major* LEM2009

CTAGTGACCCGCGTGATGACCTCTACTCCGTTCTTCGTCACCGCCTTCACAAAGAAGTGTGAGTTGCTGATG  
 ACGACGCGGCGCTTACCTCATCGCAGCACTTCTGCATGAGCTCAAGGCCCTCCTGTTGGGTCAAATCAGGAC  
 GCCAGAGGCAATCTAGCAGAGCAGTCACAAAGCAAGCGCCGTAGCCGTGGCAACCATAACGGTACAGCCTGCAG  
 GGTGCCGAGGTAGTCCAAGTAAACAGCTGCGGTCCACCGCACCATTGTCATCCTCGGAAACCGGCATGTCTG  
 TAGCCGGCAAAGAGGCAGCTCACCTGGTAAGCCCCCTCGCGACTGCGGATCGCACTGGCGAGGCAGTTGCGCA  
 TGAAGTTCCCGTGAATCGCAGCTGCTGTGGCGCCCGTGTGACGCATGCGGTTGAGCATGAGGTTGCGCTT  
 GACGTATTCAGTGAAGTTCACGCGAGGGCCGTTCTCGCCAGTGCACGCGACCAACTGATGTGTGTCAAGCTGC  
 GTAATCTTGTCTCCGCGTCGGTTATCTTGATGTAGTAGAAGGCGTTGAGGCCGGCCGACGCGACCATGACGT  
 AGTCTTGGCAGCGGAACGCAATTGCAGTCTCCGCCAT

## 8.3 Proteasomale Aktivität nach Inhibitorbehandlung

### 8.3.1 Abbildungen des Proteasomaktivitäts-Assays

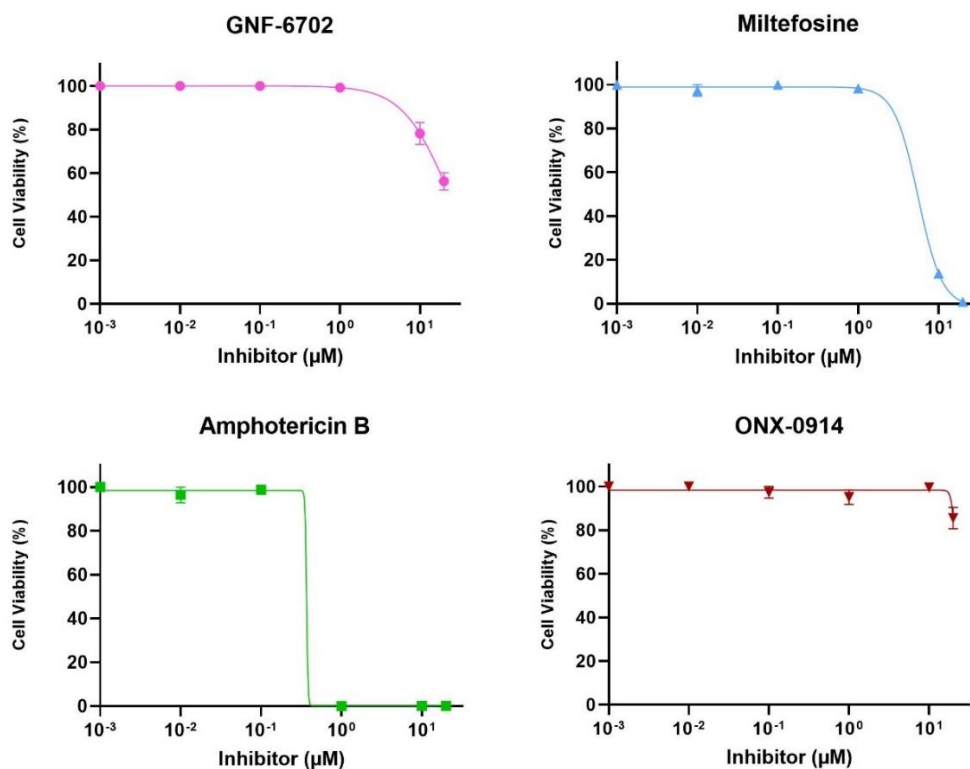


**Abbildung 36: Einfluss von Inhibitoren auf die chymotrypsinähnliche Proteasomaktivität.** Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms im Lysat von *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. major* und THP1 und unter dem Einfluss der Inhibitoren GNF-6702 (pink), MG-132 (grün) und ONX-0914 (blau). Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Einfachbestimmungen.

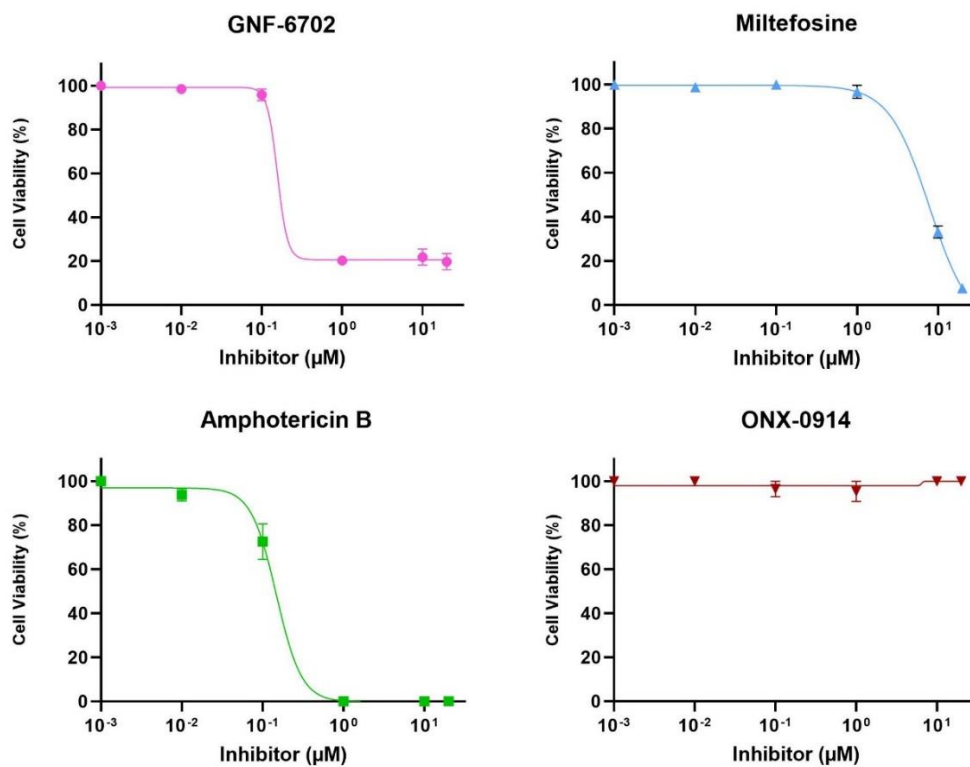
## 8.4 Einfluss von leishmaniziden Wirkstoffen auf promastigote Erreger

### 8.4.1 Zusätzliche Abbildungen des CellTiter Glo-Assays

#### 8.4.1.1 *L. chagasi*

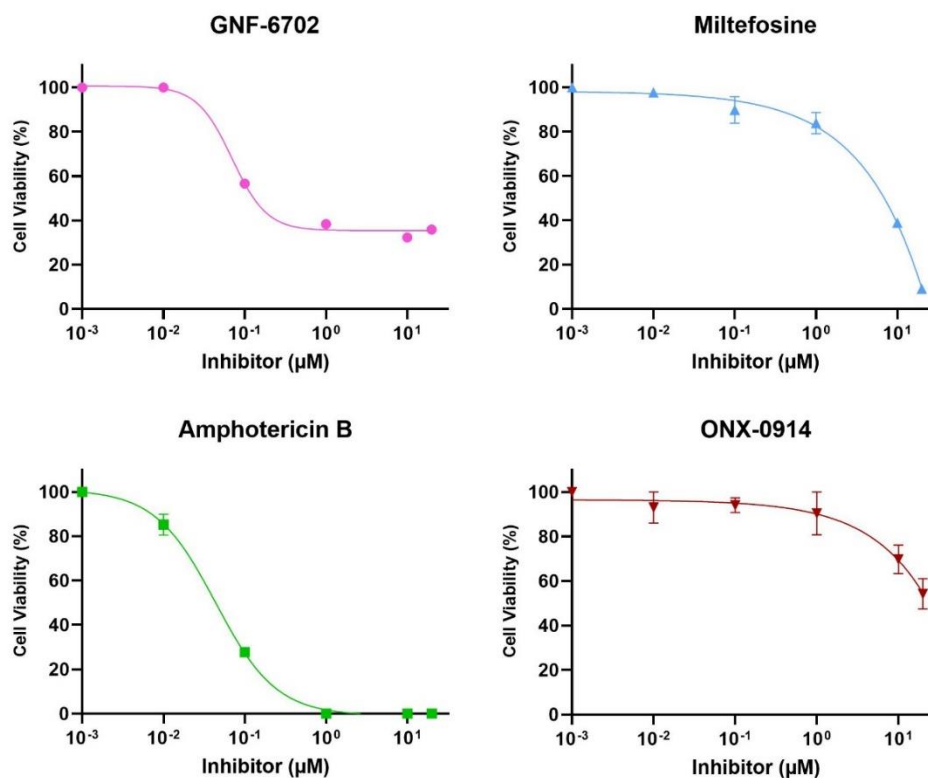


**Abbildung 37: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität promastigoter *L. chagasi*.** Vitalitätsbestimmung von promastigoten *L. chagasi* (LEM0590) nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

8.4.1.2 *L. infantum*

**Abbildung 38: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität promastigoter *L. major*.** Vitalitätsbestimmung von promastigoten *L. infantum* (LEM0461) nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.



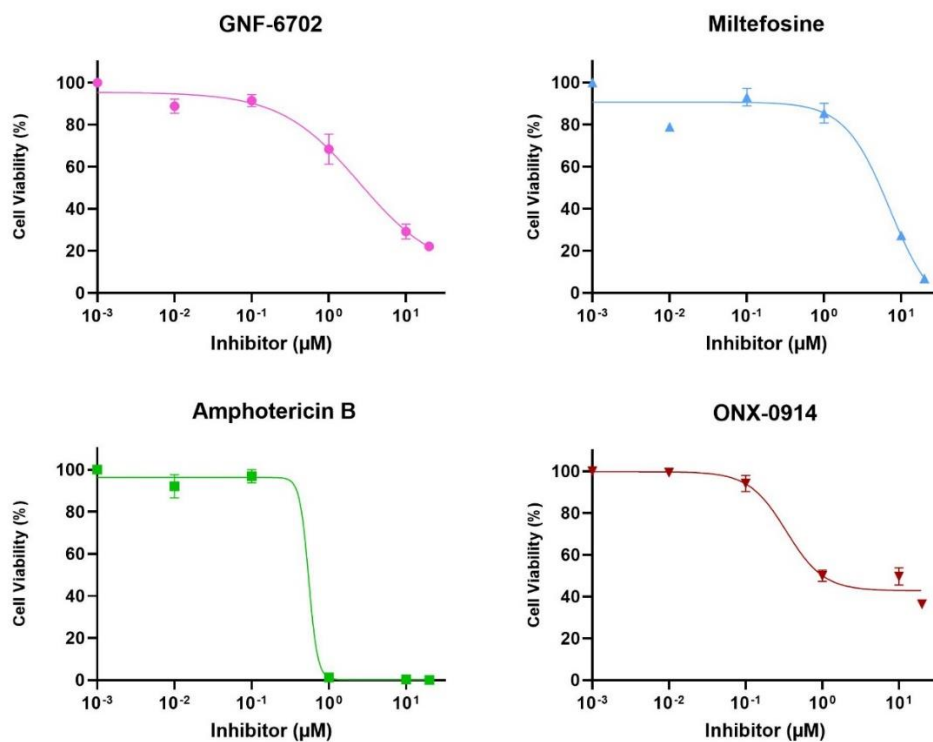
8.4.1.3 *L. major*

**Abbildung 39: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von promastigoten *L. major*.** Vitalitätsbestimmung von promastigoten *L. major* nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

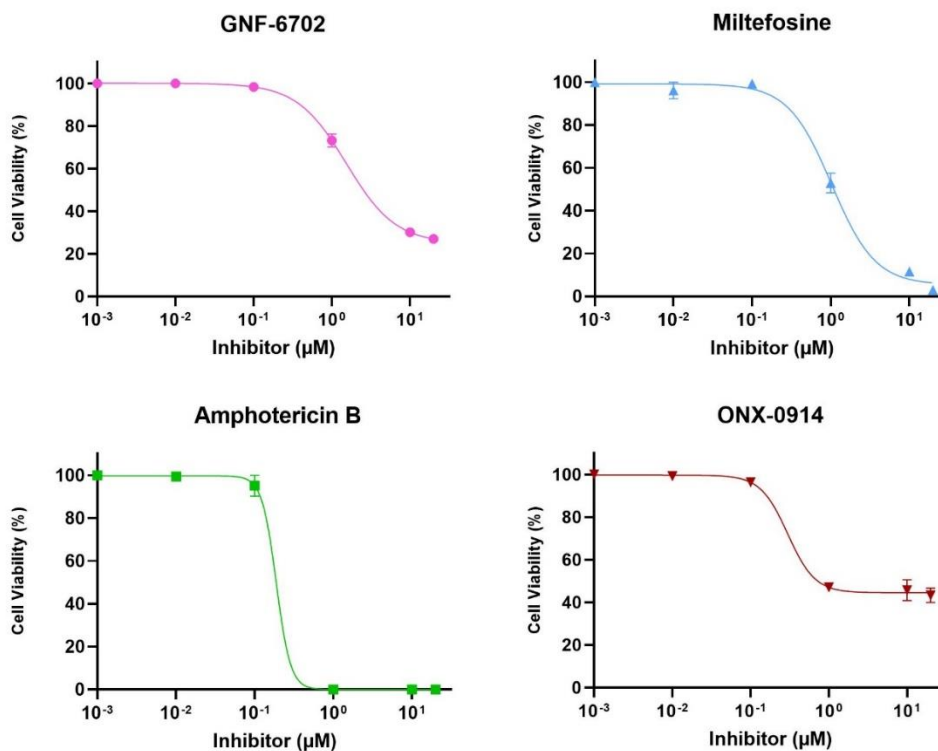
## 8.5 Einfluss von leishmaniziden Wirkstoffen auf amastigote Leishmanien

### 8.5.1 Zusätzliche Abbildungen des CellTiter Glo-Assays

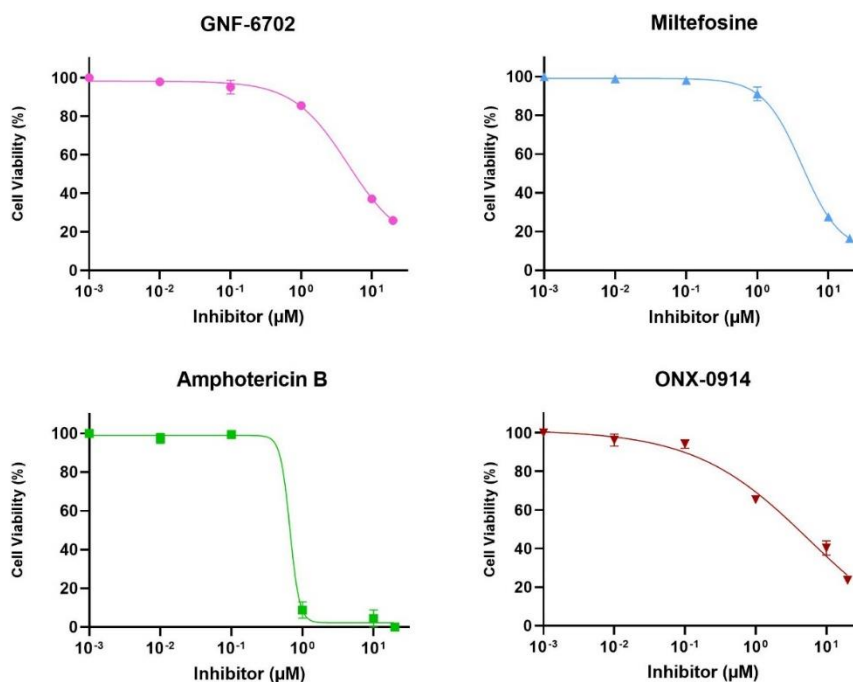
#### 8.5.1.1 *L. chagasi*



**Abbildung 40: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten *L. chagasi*.** Vitalitätsbestimmung von amastigoten *L. chagasi* (LEM0590) nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte ± SEM von Triplikaten dar.

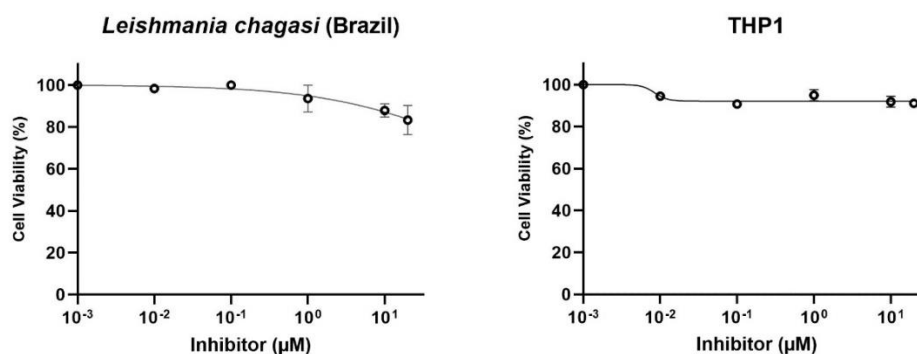
8.5.1.2 *L. infantum*

**Abbildung 41: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten *L. infantum*.** Vitalitätsbestimmung von amastigoten *L. infantum* (LEM0461) nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar.

8.5.1.3 *L. major*

**Abbildung 42: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Vitalität von amastigoten *L. major*.** Vitalitätsbestimmung von amastigoten *L. major* nach Behandlung mit GNF-6702 (rosa), Amphotericin B (grün), Miltefosine (blau) und ONX-0914 (rot) in aufsteigender Konzentration für 24 h. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten dar

## 8.6 Einfluss von DMSO auf Leishmanien und THP1



**Abbildung 43: Einfluss von DMSO auf die Vitalität von Leishmanien und THP1.**

## 8.7 Eigene Publikationen

- [1] **Mahdavi R**, Shams-Eldin H, Witt S, Latz A, Heinz D, Taboada A.F, Aira C, Hübner M.P, Sukyte D, Visekruna A, Teixeira H, Abass E and Steinhoff U. Development of a novel ELISA and lateral flow test system for improved serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in different endemic areas. *Microbiology Spectrum* 2023.
- [2] Röttgerding F, Njeru J, Schlüfter E, Latz A, **Mahdavi R**, Steinhoff U, Cutler S, Besier S, Kempf V.A.J, Fingerle V and Kraiczky P. Development and improvement of two immunoassays for the serodiagnosis of louse-borne relapsing fever 2022.
- [3] Leister H, Krause FF, **Mahdavi R**, Steinhoff U, Visekruna A. The Role of Immunoproteasomes in Tumor-Immune Cell Interactions in Melanoma and Colon Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2022; 70(1): 5
- [4] Fischer F, Romero R, Hellhund A, Linne U, Bertrams W, Pinkenburg O, Eldin HS, Binder K, Jacob R, Walker A, Stecher B, Basic M, Luu M, **Mahdavi R**, Heintz-Buschart A, Visekruna A, Steinhoff U (2020) Dietary cellulose induces anti-inflammatory immunity and transcriptional programs via maturation of the intestinal microbiota. *Gut Microbes* 12:1–17.
- [5] Luu M, Romero R, Bazant J, Abass E, Hartmann S, Leister H, Fischer F, **Mahdavi R**, Plaza-Sirvent C, Schmitz I, Steinhoff U, Visekruna A (2020) The NF- $\kappa$ B transcription factor c-Rel controls host defense against *Citrobacter rodentium*. *Eur J Immunol* 50:292–294.

### 8.7.1 Abstracts

**Mahdavi R**, Steinhoff U (2020) Development of an improved sero-diagnosis for visceral Leishmaniasis. IUIS-FAIS-Immuno-Ethiopia Bahir Dar. 2020

**Mahdavi R**, Steinhoff U (2021) Impact of sequence and structure of the Kinesin on Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. 29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology Germany Bonn.

### 8.7.2 Patent

Diagnostic test for high sensitive detection of antibodies from visceral Leishmaniasis patients. European patent, Application No. /Patent No. EP22152398.8

### **8.7.3 Die Entwicklung von Prototypen für ELISA, Lineblot und Lateral-Flow-Tests**

Die Firma NovaTec Immundiagnostica GmbH und Ingenasa diagnostics (Teil von Gold Standard Diagnostics Europe) hat auf der Basis des hier beschriebenen rKLi8.3 Antigens verschiedene diagnostische Testsysteme, wie z.B. line blots, ELISA und einen lateral flow Schnelltest, entwickelt.

### **8.7.4 Finanzierung**

Das Projekt wurde durch das Loewe Center Druid (Projekt C4) im Rahmen des Hessischen Exzellenzprogramms gefördert.

## **8.8 Lebenslauf**

Die Seite 130 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

## 8.9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

M.Sc.:

---

Prof. Dr. G. Bange  
Prof. Dr. L. Essen  
Prof. Dr. P. Graumann  
Prof. Dr. M. Keusgen  
Prof. Dr. E. Meggers  
Prof. Dr. J. Sundermeyer  
Prof. Dr. O. Vazquez

---

Ph.D.:

---

Prof. Dr. S. Becker  
Prof. Dr. R. Jacob  
Prof. Dr. M. Lohoff  
Prof. Dr. U. Steinhoff  
Prof. Dr. M. Schnare  
Dr. med vet. H. Shams-Eldin  
Prof. apl. Dr. A. Visekruna

---



### 8.10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Ulrich Steinhoff für die ausgezeichnete Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Es war mir eine Freude mit Ihnen nicht nur beruflich, sondern auch auf persönlicher Ebene zusammenzuarbeiten. Ich bin sicher, dass mir das, was ich von Ihnen lernen konnte, in meinem weiteren Leben Vieles erleichtern wird. Danke für die tolle Zeit!

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Schnare für die Zweitkorrektur meiner Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich auch bei der gesamten Gruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für ihre Hilfe und Unterstützung: insbesondere danke ich Prof. Dr. Michael Lohoff, Dr. Alexander Visekruna, Dr. Hosam Shams-Eldin, Bärbel Camara, Hanna Leister, Dr. Addi Romero, Anne Hellhund, Claudia Trier und Melanie Wolf für die großzügige und uneingeschränkte Hilfe. Danke für die nette Zeit, die wir zusammen als ein Team gearbeitet haben, ihr habt viele meiner Probleme gelöst und mir in diesem Projekt geholfen.

Zudem möchte ich mich bei unseren internationalen Kooperationspartnern für ihr Interesse an diesem Projekt und für die Bereitstellung von Proben bedanken: Dr. Elfadil Abass, Dr. Franjo Martinkovic, Dr. Henrique Teixeira, Dr. Patrick Bastien und Dr. Marc P. Hübner.

Nicht zuletzt möchte ich den Studenten danken, die unter meiner Anweisung an dem Projekt beteiligt waren. Das waren Sandra Witt, Thu Dinh, Jelena Sorokina, Sara Dörken, Kendra Schmidt, Dalia Sukyte, Lena Heinrich und Julia Nave. Ihr habt meine Arbeit durch eure Unterstützung geprägt und meinen Laboralltag verschönert. Ich möchte mich herzlich bei Sandra Witt für ihre wertvolle Hilfe und Korrektur meiner Doktorarbeit bedanken.

Ich danke Arion, meinem 15 Monate alten Sohn, für die gezwungenen Spielpausen während der Erstellung der Arbeit. Du hast dafür gesorgt, dass ich mich nie gelangweilt habe. Meiner Frau Ioanna danke ich für ihre Ermutigungen und persönliche Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.

### **8.11 Ehrenwörtliche Erklärung**

Die Seite 133 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.