

## **IFoLeish-2008: Aktueller Stand der Wissenschaft und zukünftige Herausforderungen bei der Bekämpfung der Leishmaniose**

Carsten G. K. Lüder<sup>1</sup> und Stefan Zimmermann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Georg-August-Universität, Göttingen; e-mail: [clueder@gwdg.de](mailto:clueder@gwdg.de)

<sup>2</sup>Abteilung Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Ruprecht-Karls Universität; e-mail: [Stefan.Zimmermann@med.uni-heidelberg.de](mailto:Stefan.Zimmermann@med.uni-heidelberg.de)

### **Einleitung**

Trotz Fortschritten in Diagnostik und Behandlung ist die Leishmaniose nach wie vor eine wichtige Infektionserkrankung vor allem in tropischen und subtropischen Ländern. Ihre Bedeutung wird auch daran deutlich, dass sie von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) kürzlich als eine der wichtigsten ‚Neglected Tropical Diseases‘ (NTDs) klassifiziert wurde. Die Leishmaniose hat sich in den letzten Jahren geographisch ausgebreitet und es wurde eine deutlich Zunahme von Leishmaniosefällen registriert. Heute wird die Zahl der Infizierten auf 12 Millionen Menschen in 88 Ländern geschätzt. Zwei Millionen Menschen erkranken jährlich, davon 1,5 Mio. an kutaner Leishmaniose (CL) und 500.000 an der lebensbedrohenden viszerale Leishmaniose (Kala-Azar, VL). Mindestens 60.000 Patienten sterben jährlich an VL und die Krankheitsbürde der Leishmaniose wird auf 2,4 Mio. DALYs (‚Disability-Adjusted Life Years‘) pro Jahr geschätzt (Hotez et al., 2004).

Der klinischen Bedeutung der Leishmaniose steht ein starker Wissenszuwachs in der Zell- und Molekularbiologie der eukaryontischen Infektionserreger sowie ihrer Interaktionen mit dem Wirt gegenüber. Forschungsanstrengungen der letzten Jahre haben eine Fülle von Informationen über Genom, Transkriptom und Proteom repräsentativer *Leishmania* Spezies generiert. Effiziente Methoden der genetischen Manipulation ermöglichen außerdem phänotypische und pathogenetische Analysen. Eine zentrale Herausforderung der kommenden Jahre ist daher die Nutzung unseres Grundlagenwissens für eine effektivere Bekämpfung der Leishmaniose. Um einen translationalen Ansatz in der Leishmanioseforschung zu fördern, hat die DGHM-Fachgruppe ‚Eukaryontische Krankheitserreger‘ vom 3. bis 5. April 2008 an der Abteilung Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Heidelberg das ‚Interdisciplinary Forum on Leishmaniasis – IFoLeish-2008‘ durchgeführt. Grundlagenwissenschaftler sowie erfahrene Kliniker und Tropenmediziner haben den aktuellen Wissensstand zu Leishmanien und die durch sie verursachten Erkrankungen vorgestellt und ihre Sicht der zukünftigen Entwicklungen diskutiert. Die etwa 60 Teilnehmer aus dem In- und Ausland waren sich einig, dass ein intensiver interdisziplinärer Gedankenaustausch über Fachgrenzen hinweg notwendig ist, um unser umfangreiches Wissen zur Parasiten- und Vektorbiologie sowie zur Pathogenese der Leishmaniosen in verbesserte Behandlungs- und Bekämpfungsstrategien dieser wichtigen Infektionskrankheit umzusetzen.

### **Diagnose und Klinik**

Die Gattung *Leishmania* umfasst etwa 20 verschiedene humanpathogene Arten. Sie führen zu einem breiten Spektrum klinischer Manifestationen mit drei Hauptformen der Erkrankung, der kutanen, der mucokutanen und der viszerale Leishmaniose (**Gerd Burchard, Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg**). Eine Reihe von selteneren Manifestationen erschweren die klinische Diagnose. Fieber, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie sind

typische Symptome von manifester VL, aber gastrointestinale, nephrologische und neurologische Symptome können ebenfalls vorkommen. Mit etwa 90% sind subklinische Infektionen häufig, was zur Reaktivierung in immunsupprimierten Patienten führen kann. Eine symptomatische VL kann sich in *Leishmania*/HIV-koinfizierten Patienten auch als Folge eines entzündlichen Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) nach anti-retroviraler Therapie entwickeln. Die Zahl dieser Fälle könnte zukünftig mit einer breiteren Verfügbarkeit anti-retroviraler Therapien weiter zunehmen. Im Gegensatz zur VL ist die kutane Leishmaniose (CL) in der Regel eine lokal begrenzte, selbstheilende Hauterkrankung, obwohl generalisierte Verläufe nach Infektion mit *L. major* vorkommen. Hautmanifestationen unterscheiden sich deutlich in Morphologie und Lage. In HIV-Patienten sind Rezidive und multiple Hautläsionen häufig. Nach Infektion mit *L. braziliensis* kann sich eine CL zur destruirenden und lebensbedrohenden mucokutanen Leishmaniose (MCL) entwickeln. Prognostische Marker einer MCL sind weitgehend unbekannt, sind aber für eine frühe therapeutische Intervention dringend erforderlich. ‚Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis‘ (PKDL) ist eine chronische Hauterkrankung, die als Folge einer durch *L. donovani* verursachten VL entstehen kann. Die Manifestationsrate von PKDL ist u.a. vom Parasitenstamm abhängig und reicht von 5-15% in Indien bis zu 55-60% im Sudan (**Poonam Salotra, Institute of Pathology, Safdarjung Hospital Campus, New Delhi, Indien**). Klinische Manifestationen reichen von hypopigmentierten Flecken bis zu knotigen oder ulzerierenden Hautveränderungen. Pathogenetisch liegt der PKDL eher eine Reaktivierung persistierender Parasiten als eine Reinfektion zugrunde. Analysen des Transkriptoms von *L. donovani* RNA aus Patienten mit VL und PKDL zeigten 3% differentiell exprimierte Gene. Solche für gp63, PSA-2, Amastin- und Calpain-ähnliche Proteine waren während PKDL hochreguliert und könnten an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein. Neben spezifischen Faktoren des Parasiten spielen systemische und lokale Immunreaktionen eine wichtige Rolle. So waren die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  sowie die Transkriptmengen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 im Gewebe von PKDL-Patienten deutlich erhöht und erreichten nach erfolgreicher Therapie Normalwerte. Proinflammatorische Zytokinantworten könnten also an der Pathogenese der PKDL beteiligt sein, wobei allerdings lokale Unterschiede zwischen indischen und sudanesischen Patienten festgestellt wurden.

Die Heterogenität der Manifestationen nach *Leishmania*-Infektion erschwert eine klinische Diagnose (siehe oben). Außerdem sind die unterschiedlichen *Leishmania*-Arten morphologisch nicht zu unterscheiden. Dabei ist die Speziesidentifikation für eine adäquate Therapie von großer Bedeutung, da sich unterschiedliche Arten u.a. hinsichtlich Therapieresistenzen deutlich unterscheiden (**Henk Schalling, Royal Tropical Institute, Amsterdam, Niederlande**). Analysen von Isoenzymen, Mikrosatelliten und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) werden zur Speziesdifferenzierung eingesetzt, sind aber in vielen endemischen Gebieten oft nicht durchführbar. Nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation (NASBA) der 18S rRNA wurde kürzlich etabliert. Obwohl NASBA noch nicht zur Speziesidentifikation eingesetzt werden kann, erlaubt sie die Diagnose aktiver *Leishmania*-Infektionen mit hoher Sensitivität und Spezifität. Da auch eine Quantifizierung von Parasiten möglich ist (QT-NASBA), ist diese Methode besonders geeignet, um den Krankheitsverlauf vor und nach Chemotherapie zu verfolgen. Da NASBA bei einer gleich bleibenden Temperatur von 41°C durchgeführt wird, ist sie auch unter einfacheren Bedingungen durchführbar. Der Nachweis des NASBA-Amplikons durch Hybridisierung mit einer Gold-konjugierten Sonde mittels eines Teststreifens war ein weiterer wichtiger Schritt hin zu einer einfachen, aber dennoch sensitiven und spezifischen Methode zur Diagnose der Leishmaniose, die nun zur Evaluierung in tropischen Regionen zur Verfügung steht.

## Epidemiologie

Für die Gesundheitsüberwachung, aber auch zur Charakterisierung unterschiedlicher Krankheitsverläufe, Wirtsspektren und Resistenzverhalten ist die Genotypisierung auf der Ebene von *Leishmania*-Stämmen notwendig. Eine Analyse von mehreren hochpolymorphen und evolutionär neutralen DNA-Repeats (Multilocus-Mikrosatelliten Typisierung, MLMT) ist eine zuverlässige und effiziente Methode und geeignete Marker wurden für verschiedene *Leishmania*-Arten identifiziert (**Gabriele Schönian, Charité-Universitätsmedizin, Berlin**). Die Typisierung von 91 Stämmen des *L. donovani*-Komplexes ergab 6 Hauptpopulationen mit unterschiedlicher geografischer Verbreitung. Die Heterogenität innerhalb dieser Populationen variierte erheblich und war in der um das Mittelmeer vorkommenden Population am größten. Eine Genotypisierung von 141 europäischen *L. infantum*-Stämmen zeigte die hohe Sensitivität von MLMT, da neben einer non-MON-1- auch drei MON-1-Subpopulationen identifiziert wurden. Obwohl sie weitgehend klonal sind, findet dennoch ein Genfluss sogar zwischen non-MON-1- und MON-1-Subpopulationen statt. Es konnte jedoch kein Einfluss der unterschiedlichen Genotypen auf Wirtsspektrum oder Krankheitsverlauf nachgewiesen werden.

Seit 15 Jahren hat sich die geografische Verbreitung der Leishmaniose deutlich ausgeweitet. Migration, Verstädterung sowie erhöhte Suszeptibilität z.B. durch Immunsuppression wurden als Risikofaktoren dieses Prozesses identifiziert. **Paul Ready, Natural History Museum, London, UK**, ging der Frage nach, inwieweit klimatische Veränderungen und die globale Erwärmung zu einer Verbreitung der Vektoren, der Sandmücken und einer Ausbreitung von autochthoner Leishmaniose beigetragen haben. Infektionen von Hunden mit *L. infantum* haben sich eindeutig nach Norditalien ausgebreitet. Eine Umfrage unter französischen Veterinären ergab außerdem eine Ausbreitung caniner Leishmaniose nach Nordfrankreich, obwohl unklar bleibt wie viele dieser Fälle tatsächlich auf eine autochthone Übertragung zurückzuführen sind. Eine hochauflösende räumliche Kartierung in einer Modelregion Südfrankreichs zeigte, dass lokales Habitat, Verstädterung, Landnutzung und klimatische Parameter wie Temperatur und Feuchtigkeit die Verbreitung von Sandmücken und Leishmaniose entscheidend beeinflussen. Dies macht deutlich, dass eine Kombination verschiedener geografischer und klimatischer Faktoren die Verbreitung der Leishmaniose bestimmt. Das Risiko einer generellen Ausbreitung autochthoner Leishmaniose nach Zentraleuropa aufgrund eines einzelnen Faktors wie der Klimaerwärmung erscheint dagegen eher unwahrscheinlich. Allerdings muss betont werden, dass neuerdings Fälle von Leishmaniose bei Menschen und Hunden aus Zentraleuropa ohne Reiseanamnese in endemische Gebiete diagnostiziert wurden. Außerdem muss die Leishmaniose, vor allem in Form von Hautmanifestationen bei Rückkehrern aus tropischen oder temperierten Regionen der Erde immer in Betracht gezogen werden (**August Stich, Missionsärztliche Klinik, Würzburg**). In Deutschland werden jedes Jahr etwa 100 solche Fälle festgestellt, wobei die Dunkelziffer groß sein dürfte.

### **Pathogenomics und –postgenomics**

Die Übertragung zwischen Vektor und Säuger erfordert weitreichende Anpassungen der Leishmanien an unterschiedliche Umgebungen. Erstaunlicherweise transkribieren sie ebenso wie andere Kinetoplastida mehrere Gene konstitutiv in ein polycistronisches RNA-Molekül, dass durch anschließendes *trans*-Splicing einer sogenannten Spliced-Leader (SL)-Sequenz am 5'-Ende und Polyadenylierung am 3'-Ende in einzelne reife mRNAs prozessiert wird. Die Regulation der Genexpression muss daher weitgehend posttranskriptionell erfolgen. Die Degradierung von RNA wurde dabei als wichtiger Mechanismus identifiziert (**Christine Clayton, Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg**). Sie wird durch sequentielle Deadenylierung vom poly-A-Schwanz durch den CAF1/NOT-Komplex, Abspaltung des 5'-Trimethylendes des SL und nachfolgenden RNA-Verdau mittels 3'-Exosom und 5'-3'-Exonukle-

asen vermittelt. Alternativ können nicht benötigte oder falsch gefaltete mRNAs nach Export aus dem Nukleus und Abspalten der 5'-Trimethylkappe durch die XRNA 5'-3'-Exonuklease direkt verdaut werden. Die Zusammensetzung und Kristallstruktur des CAF1/NOT-Komplexes und des Exosoms von *Leishmania* unterscheiden sich deutlich von ihren Säugerhomologen und stellen daher potentielle Targets für neue Chemotherapeutika dar.

Neben RNA-Degradierung stellen post-translationale Modifikationen einen wichtigen Regulationsmechanismus bei der Differenzierung von Leishmanien dar. Durch Untersuchungen des phospho-Proteoms von promastigoten und amastigoten *L. donovani* wurden 94 bekannte Proteine identifiziert (**Gerald Späth, Institut Pasteur, Paris, Frankreich**). Dabei handelte es sich zum großen Teil um Proteine, die an der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradierung, der Proteinfaltung und der Translationskontrolle beteiligt sind. Die Synthese, Stabilität und Degradierung von *Leishmania*-Proteinen scheint also wesentlich durch die Phosphorylierung regulatorischer Netzwerke beeinflusst zu werden. Interessanterweise sind mehr als 35% der phospho-Proteine mit bekannter oder unbekannter Funktion in promastigoten und amastigoten Parasitenstadien differentiell phosphoryliert. Chaperone und Proteine eines HSP90/Faltungskomplexes waren dabei besonders häufig in Amastigoten phosphoryliert. Diese Daten zeigen, dass Chaperone durch stadienspezifisch regulierte Kinasen und/oder Phosphatasen modifiziert werden und deren Modifikation wichtigen Einfluss auf die Parasitendifferenzierung besitzen könnte. Chaperone sind aber nicht nur Targets von Kinasen und Phosphatasen, sondern beeinflussen ihrerseits das phospho-Proteom von *Leishmania* wie durch Inhibierung von HSP90 gezeigt wurde (**Joachim Clos, Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg**). Ein komplexes Netzwerk von Phosphorylierung und Dephosphorylierung von und durch Chaperone scheint demnach die Parasitendifferenzierung bei der Übertragung zwischen Vektoren und Säugern zu regulieren. Verschiedene Hitzeschockproteine von *Leishmania* werden als Stressantwort nach Übertragung auf den Menschen auch differentiell expremiert. HSP100 wird nach Umwandlung zum intrazellulär vor allem in Makrophagen vorkommenden Amastigoten-Stadium deutlich hochreguliert. Interessanterweise sind HSP100-defiziente Mutanten von *Leishmania* nicht in der Lage, sich in Makrophagen zu vermehren und sind für Mäuse avirulent, vermehren sich aber als Promastigote wie der Wildtyp (**Joachim Clos**). Die genaue Funktion von *Leishmania* HSP100 ist bisher zwar unbekannt, es scheint aber für die Stabilisierung von Amastigoten in deren Wirtszelle essentiell zu sein.

Die Oberfläche von *Leishmania* Pro- und Amastigoten ist mit verschiedenen Glycokonjugaten bedeckt, z.B. Lipophosphoglycan (LPG), Glycosylinositolphospholipide (GIPLs), Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine und Glycosphingolipide. Sie stehen in direktem Kontakt mit Wirtsstrukturen der Überträgermücken und Säugerwirte und gelten als wichtige Regulatoren der Parasit-Wirt-Interaktion. Das Monosaccharid Galactofuranose ist Bestandteil des LPGs und der GIPLs von *L. major*, kommt aber nicht in Vertebraten vor (**Francoise Routier, Medizinische Hochschule, Hannover**). Die Deletion von *glf*, dessen Genprodukt die Bildung von Galactofuranose katalysiert, hatte keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *L. major*, obwohl die Parasiten kein LPG und nur stark verkürzte GIPLs produzieren. Nach experimenteller Infektion von Mäusen entwickelten sich Hautläsionen aber nur sehr verzögert, erreichten allerdings letztendlich ähnliche Größe wie nach Infektion mit dem Wildtypstamm. Dies zeigt eine kritische Rolle der Galactofuranose für die Etablierung der *L. major*-Infektion, nicht aber für intrazelluläres Überleben und Vermehrung der Amastigoten.

## **Immunantworten und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf**

Neben der *Leishmania*-Spezies bestimmt die Immunantwort des Wirtes den Krankheitsverlauf entscheidend mit. Zelluläre Immunantworten vom Th1-Typ sind dabei für die Kontrolle der intrazellulären Parasiten essentiell. **Uwe Ritter, Universität Regensburg**, hob die Rolle unterschiedlicher Subtypen von dendritischen Zellen (DC) für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort in einem Mausmodell für CL hervor. DC der Dermis, nicht aber epidermale Langerhanszellen sind für das Priming von CD4+ T-Zellen in den regionalen Lymphknoten verantwortlich. Nach Einwanderung in die Haut sind *Leishmania*-spezifische CD4+ T-Zellen dann in der Lage, Makrophagen zur Parasitenabwehr zu aktivieren. Im Gegensatz dazu führen Langerhanszellen eher zu Priming und Aktivierung von CD8+ T-Zellen, die während anhaltender Infektion der IFN- $\gamma$ -Antwort und anti-parasitären Effektormechanismen in der Haut entgegenwirken. Einschränkend sei jedoch erwähnt, dass die Depletion von Langerin-positiven Zellen inklusive Langerhanszellen dennoch zu erhöhten Parasitenzahlen an der Infektionsstelle führte.

Für die Aktivierung angeborener und adaptiver Immunantworten vom Th1-Typ und die Kontrolle von *Leishmania* ist das Zytokinmilieu von entscheidender Bedeutung. **Christian Bogdan, Universität Erlangen**, stellte die Bedeutung von IFN- $\alpha/\beta$ , den sog. Typ1-Interferonen bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort während der Leishmaniose in der Maus dar. IFN- $\alpha/\beta$  wird vor allem von plasmazytoiden DC (pDC) nach Kontakt mit *Leishmania* oder *Leishmania* DNA sezerniert, ein Vorgang der TLR9-, MyD88- und IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR)-abhängig ist. Typ1-Interferone werden auch *in vivo* nach Infektion von Mäusen mit *L. major* und *L. infantum* verstärkt exprimiert. Allerdings sind auch IFNAR-defiziente Mäuse in der Lage, die IFN- $\gamma$  Produktion durch natürliche Killerzellen (NK) zu aktivieren und *L. major* zu kontrollieren. Die durch NK vermittelte Infektabwehr während der kutanen und viszeralen murinen Leishmaniose erfolgt daher unabhängig vom IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor und Typ1-Interferonen. Dagegen ist die NK-vermittelte Parasitenabwehr während *Leishmania*-Infektionen entscheidend von der Produktion von IL-12 durch myeloide DC und der Aktivierung von TLR9 abhängig. Die Sekretion von Zytokinen durch DC hat auch entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der adaptiven Immunantwort während der kutanen Leishmaniose. IL-12 ist der Prototyp von Zytokinen, die eine Entwicklung schützender Th1-Lymphozyten bewirken, aber eine Reihe anderer Zytokine regulieren ebenfalls die Polarisierung von T-Helferzellen (**Esther von Stebut-Borschitz, Universität Mainz**). DC von *Leishmania*-suszeptiblen BALB/c-Mäusen produzieren nach Infektion mit *L. major* weniger IL-1 $\alpha/\beta$  und mehr IL-12p40 Homodimere (IL-12p80) als resistente C57BL/6-Mäuse. In der Frühphase der Infektion exogen zugeführtes IL-1 $\alpha$  schützt BALB/c-Mäuse vor einem progressiven Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu blockiert IL-12p80 den IL-12-Rezeptor, fördert die Entwicklung von Th2-Antworten und führt zu einer Verschlechterung des klinischen Verlaufs von CL. Neben DC wurden neutrophile Granulozyten als Produzenten von IL-12p80 in BALB/c-Mäusen identifiziert (**Francoise Tacchini-Cottier, WHO Immunology Research and Training Center, Epalinges, Schweiz**). Kürzlich wurde das Th1/Th2-Paradigma durch Charakterisierung weiterer Th Subpopulationen wie der Th17-Population erweitert. **Esther von Stebut-Borschitz** präsentierte Daten über erhöhte Konzentrationen von IL-17 und IL-23p19 in *Leishmania*-infizierten BALB/c-Mäusen. Interessanterweise waren IL-17A-defiziente Mäuse vor einem progressiven Krankheitsverlauf nach Infektion mit *L. major* geschützt und zeigten eine verminderte Einwanderung von APC und neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe. Eine große Anzahl von persistierenden Neutrophilen wurde tatsächlich in Hautläsionen von empfänglichen BALB/c-Mäusen nachgewiesen (**Francoise Tacchini-Cottier**). In resistenten C57BL/6-Mäusen geht die Anzahl von Neutrophilen dagegen durch Kontakt-abhängige, durch Makrophagen induzierte Apoptose kontinuierlich zurück. Auf der anderen Seite sind Neutrophile aber auch wichtig bei der Ausprägung einer schützenden adaptiven Immunantwort und als anti-parasitäre Effektorzellen. So führt eine

Depletion von Neutrophilen durch Förderung einer dominanten Th2-Antwort zu erhöhten Parasitenlasten und einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes. Die Vermittlung von Resistenz durch Neutrophile ist dabei von der Expression von TLR2, 7 und 9 sowie Rezeptor-aktivierendem IL-12, aber nur geringen Mengen von IL-12p80 und TGF- $\beta$  abhängig. Neutrophile Granulozyten erfüllen also während Infektionen mit Leishmanien sowohl schützende als auch krankheitsfördernde Funktionen und dies ist entscheidend vom Zeitpunkt der Aktivierung und dem Phänotyp der Neutrophilen abhängig.

Eukaryontische Parasiten wie *Leishmania* haben ausgefeilte Mechanismen evolviert, um der Immunantwort des Wirtes teilweise zu entkommen. *L. major* und möglicherweise andere Leishmanien 'benutzen' dabei neutrophile Granulozyten, um in der Frühphase der Infektion Zutritt in geeignete Wirtszellen zu erhalten (**Tamas Laskay, Universität Lübeck**). Neutrophile Granulozyten besiedeln das infizierte Gewebe sehr schnell und phagozytieren Leishmanien kurz nach Infektion. Dabei verhindern die intrazellulären Parasiten einen raschen apoptotischen Zelltod der ansonsten kurzlebigen Neutrophilen. Mit zunehmender Infektionsdauer läßt jedoch der anti-apoptotische Effekt der Leishmanien nach und apoptotische Neutrophile inklusive intrazellulärer Parasiten werden von Makrophagen phagozytiert. Interessanterweise führt die Aufnahme von apoptotischen Neutrophilen zu einer TGF- $\beta$ -vermittelten teilweisen Deaktivierung der Makrophagen und einer produktiven Infektion der Makrophagen mit Leishmanien. Diese Ergebnisse haben zu dem Konzept von Neutrophilen als 'Trojanische Pferde' für *L. major* Promastigote und deren Infektion von Makrophagen geführt. Neben apoptotischen Neutrophilen sind auch promastigote Parasiten mit einem Apoptose-ähnlichen Phänotyp selber an der TGF- $\beta$ -abhängigen Schwächung der lokalen inflammatorischen Antwort beteiligt. Eine Depletion dieser sterbenden Subpopulation von Promastigoten schwächt das pathogene Potential des Parasiteninokulums erheblich ab. Dies zeigt, dass eine Form des altruistischen Zelltodes von Leishmanien das intrazelluläre Überleben der restlichen Population und die Etablierung der Infektion erleichtert. Sowohl der kontrollierte Zelltod von *Leishmania*-infizierten neutrophilen Granulozyten als auch Parasiten mit einem Apoptose-ähnlichen Phänotyp inhibieren also die lokale anti-parasitäre Entzündungsreaktion und erleichtern die Etablierung der kutanen Leishmaniose.

### **Therapie und Prävention**

Genauere Kenntnisse der Antigenität von *Leishmania* haben neue Informationen zur Parasit-Wirt-Interaktion sowie zu den Aussichten bei der Entwicklung einer effektiven Vakzine und sensitiven immundiagnostischen Methoden geliefert. Durch Untersuchungen des Proteoms von *L. donovani* mit Seren von VL Patienten aus einem Hochendemiegebiet in Indien wurden > 500 verschiedene Antigene identifiziert (**Peter Walden, Charité – Universitätsmedizin, Berlin**). Die individuellen Antikörperantworten unterschieden sich dabei jedoch deutlich und immundominante Antigene konnten nicht identifiziert werden. Untersuchungen verschiedener Parasitenisolate ergaben außerdem Hinweise auf antigene Drift hin zu Parasitenstämmen, die in dem spezifischen Patienten nicht-immunogen waren. Trotz der Heterogenität der Antikörperantworten und der Parasitenisolate konnten dennoch eine Reihe gemeinsamer Antigene von *L. donovani* identifiziert werden. Inwieweit sich diese für die Entwicklung eines serologischen Testes oder einer Vakzine auf der Basis eines Antigen-Cocktails einsetzen lassen, bleibt abzuwarten. Aufgrund der intrazellulären Lokalisierung des Parasiten und der Heterogenität der Antikörperantworten könnten T-Zell-Antigene besser geeignete Vakzinkandidaten darstellen. Das Kinetoplastid-Membranprotein (KMP)-11 von *L. donovani* weist eine hohe Dichte von CD8+ und CD4+ T-Zell-Epitopen auf. Außerdem wird es von *Leishmania*-infizierten Makrophagen prozessiert und im Kontext verschiedener HLA Klasse I-Allotypen präsentiert. Es stellt daher einen interessanten Kandidaten für möglicherweise schützende

CD8+ T-Zell-Antworten von einer breiteren und heterogenen Bevölkerungsgruppe dar. Die Art der Antigengabe hat entscheidenden Einfluss auf die Effektivität möglicher anti-*Leishmania* Vakzine. **Heidrun Moll, Universität Würzburg**, präsentierte Daten zur Vakzinierung von Mäusen mit Antigen-beladenen DC. Langerhanszellen, mDC und pDC, die *ex vivo* mit *Leishmania* Antigenen beladen wurden, induzieren durchweg eine starke Immunität gegenüber *L. major*-Infektionen. Die Voraussetzungen dafür unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit der DC-Population deutlich. So induzierten mit *Leishmania*-Antigen beladene mDC, nicht aber pDC nur dann eine schützende Immunität, wenn sie *ex vivo* mit dem TLR9-Liganden CpG koaktiviert worden waren. Die Protektion durch mDC beruhte dabei auf Induktion einer Th1-polarisierten Immunantwort durch Aktivierung von residenten DC. Die Daten zeigen, dass DC tatsächlich geeignet sein könnten durch therapeutische Vakzinierung mit Antigen-beladenen autologen DC oder – wahrscheinlicher – durch Immunprophylaxe mittels ‚*in situ*-Targeting‘ zu einem Schutz vor Leishmaniose beizutragen.

Aufgrund von Resistenzen gegenüber Antimonpräparaten sowie Nebenwirkungen auch alternativer Therapeutika wie Amphotericin B sind neue Medikamente zur Behandlung der VL dringend erforderlich. Ein Meilenstein war daher die Entwicklung von oral verfügbarem Miltefosin, einem Alkylphosphocholin, zur Behandlung der viszeralen Leishmaniose (**Shyam Sundar, Institute of Medical Sciences, Varanasi, Indien**). Miltefosin hat auch 8 Monate nach Behandlung eine Erfolgsrate von 94% und ist besser verträglich als parenteral verabreichtes Amphotericin B, obwohl auch nach Miltefosin Nebenwirkungen wie Erbrechen oder Diarrhoe nicht selten sind. Es kann auch Kindern verabreicht werden, ist aber während der Schwangerschaft kontraindiziert. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass bei Monotherapie eine Behandlung mit Miltefosin über 4 Wochen erforderlich ist. Dies hat einen Therapieabbruch in 20-33% der Patienten zur Folge, was die Entwicklung von resistenten *L. donovani*-Stämmen beschleunigen dürfte. Dies könnte durch Kombinationstherapien vermieden werden. Eine kürzlich durchgeführte Phase II-Studie zeigte, dass eine Kombinationstherapie von Miltefosin und liposomalem Amphotericin B für 7 Tage bessere Therapieergebnisse liefert als Monotherapien mit Miltefosin oder liposomalem Amphotericin B über 28 Tage. Kombinationstherapien mit Miltefosin stellen daher eine mögliche künftige Alternative dar, um die Compliance der Patienten zu erhöhen und Resistenzentwicklungen gegen Miltefosin vorzubeugen.

Maßnahmen der Vektorkontrolle können die Übertragung von *Leishmania* vermindern oder sogar ganz verhindern. Aufgrund der terrestrischen Lebensweise der Sandmückenlarven und der damit verbundenen weiten Verbreitung der Brutplätze sind jedoch nur eine Bekämpfung der adulten Vektoren sowie eine Vermeidung des Kontaktes von Vektor und Säuger möglich (**Michele Maroli, Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien**). In Südamerika und einigen Mittelmeerregionen sind Kampagnen zur Bekämpfung der Sandmücken durch Spritzen von Insektiziden durchgeführt worden und haben in der Tat zur Reduktion der Vektorpopulation beigetragen. Solche Kampagnen sind jedoch auf das Insektizidspritzen in Gebäuden beschränkt und haben sich als sehr aufwändig herausgestellt, da sie geschultes Personal und eine geeignete Infrastruktur erfordern. Aufgrund der meist nächtlichen Stechaktivität der Sandmücken dürften Insektizid-behandelte Moskitonetze eine geeignete und kosteneffektive Alternative darstellen. Verschiedene Feldstudien haben die Effektivität von Pyrethroid-imprägnierten Netzen gegen Sandmücken und die Inzidenz von kutaner Leishmaniose bestätigt. Um den Vektor-Wirt-Kontakt außerhalb von Gebäuden zu vermeiden, sind schützende Kleidung und Repellents die einzigen Möglichkeiten. Wirkstoffe wie Diethyltoluamid (DEET) und das kürzlich entwickelte Picaridin schützen effektiv über mehrere Stunden gegenüber Sandmücken. In der Mittelmeerregion sind Maßnahmen zur Kontrolle von Hundeleishmaniose eine Alternative, da Hunde das Reservoir für *L. infantum* darstellen. Tatsächlich führte die Verwendung von Pyrethroiden bei Hunden zu einer Reduktion der

Hundeleishmaniose um 50-90% und hatte auch günstige Auswirkungen auf die Inzidenz von VL des Menschen.

### **Künftige Herausforderungen**

Trotz signifikanter Fortschritte im Verständnis der Biologie von Leishmanien und ihrer Vektoren sowie der Pathogenese der Leishmaniose in Zeiten von Genomik und Postgenomik sind eine Reihe von zentralen Fragen nach wie vor ungelöst (**Werner Solbach, Universität Lübeck**). Welche Bedeutung hat z.B. der kürzlich nachgewiesene Genfluss zwischen unterschiedlichen Parasitenstämmen für die Populationsdynamik, den klinischen Verlauf und die Entwicklung resistenter Leishmanien? Welche weiteren Faktoren außer Parasitenspezies und Immunantwort des Wirtes beeinflussen das klinische Bild der Leishmaniose, wie z.B. genetische Determinanten des Wirtes, Epigenetik, Reaktivierung oder Reinfektion, Koinfektionen mit anderen Pathogenen, Vektorspezies oder kleine Unterschiede in Subpopulationen von Immunzellen oder dem Zytokinmilieu? Die Beantwortung dieser Fragen ist essentiell, um Risikofaktoren von klinisch apparenter VL, PKDL oder MCL zu definieren. In diesem Zusammenhang dürfte auch die Entwicklung neuer Tiermodelle hilfreich sein, die der Situation im Menschen ähnlicher ist als die in Mäusen. Trotz Erfolgen in der Vergangenheit sind außerdem weitere Anstrengungen notwendig, um eine sensitive und spezifische Diagnostik zu entwickeln, die in den am meisten betroffenen Ländern der Tropen und Subtropen einsetzbar ist und die – besonders wichtig – eine Speziesidentifizierung erlaubt. Darüber hinaus sind neue Therapeutika oder Behandlungsschemata mit besserer Verträglichkeit und höherer Akzeptanz der Patienten erforderlich. Obwohl die Liste ungelöster Probleme sicherlich nicht komplett ist, zeigt sie, dass zu ihrer Lösung interdisziplinäre Anstrengungen von Grundlagenwissenschaftlern und Klinikern gefragt sind, um eine effektivere und dauerhafte Bekämpfung dieser wichtigen Parasitose zu erreichen.

### **Danksagung**

Wir danken Heidrun Moll, Würzburg, und Werner Solbach, Lübeck, für ihre Mitarbeit bei der Erstellung des wissenschaftlichen Programms. IFoLeish-2008 wurde von der DFG, der DGHM, der DGP, der C.H.S. Stiftung Heidelberg und industriellen Sponsoren unterstützt.

### **Literatur**

Hotez PJ, Remme JHF, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman G (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the disease control priorities in developing countries project. Clin Infect Dis **38**: 871-878.