

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *Leishmania donovani*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Lyvia Navina Keilonat

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Presber

2. Prof. Dr. H. Zahner

3. PD. J. Clos

Datum der Promotion: 21.11.2008

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Epidemiologie der Leishmaniosen	S. 1
1.2 Leishmanien	S. 1
1.2.1 Morphologie und Lebenszyklus	S. 1
1.3 Taxonomie und Verbreitung der Leishmanien	S. 3
1.4 Methoden zur Klassifizierung der Spezies	S. 4
1.5 Klinische Manifestationen	S. 6
1.5.1 Viszerale Leishmaniose und PKDL	S. 7
1.5.2 Dermatotrope Leishmaniosen	S. 9
1.6 Therapie der Leishmaniose	S. 10
1.7 Der Spezies Komplex <i>L. donovani</i>	S. 11
1.7.1 Epidemiologie	S. 11
1.7.2 Diagnostik und Speziesidentifizierung	S. 12
1.8 Mikrosatelliten	S. 13
1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	S. 16
2. Material und Methoden	S. 18
2.1 Material	S. 18
2.1.1. Chemikalien	S. 18
2.1.2. Lösungen	S. 19
2.1.3. Geräte und Apparaturen	S. 20
2.1.4. Computerprogramme	S. 20
2.1.5. <i>Leishmania</i> - Stämme	S. 21
2.2 Methoden	S. 23
2.2.1 DNS-Präparation aus Leishmanien	S. 23
2.2.2 Amplifizierung der Mikrosatellitenmarker	S. 23
2.2.2.1 Verwendete Primer	S. 23
2.2.2.2 Optimierung der PCR-Bedingungen	S. 24
2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 25

2.2.3 Kontrollelektrophorese für die PCR-Produkte	S. 26
2.2.4 Fragmentlängenanalysen der Mikrosatelliten	S. 26
2.2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	S. 26
2.2.4.2 Fragmentanalyse am Kapillarsequenzierer	S. 28
2.2.5 Statistische Auswertungen	S. 29
2.2.5.1 Modellbasierte Analyse der Populationsstruktur	S. 29
2.2.5.2 Distanzbasierte Analysen der Populationsstruktur	S. 29
2.2.5.3 Populationsgenetische Analysen	S. 30
3. Ergebnisse	S. 31
3.1 Stämme	S. 31
3.2 Auswahl und Optimierung der Mikrosatellitenmarker	S. 31
3.3 Analyse der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese	S. 32
3.4 Analyse der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers	S. 33
3.5 Ermittlung der Populationsstruktur mit Hilfe der STRUCTURE-Software	S. 42
3.6 Bestimmung der genetischen Distanz innerhalb und zwischen den Populationen anhand von Mikrosatellitenvariationen	S. 45
3.7 Räumliche Darstellung der Isolate zueinander mittels der Genetix- FC-Analyse	S. 50
3.8 Charakterisierung der Populationen mit Hilfe des Microsatellite Analyser Programms	S. 51

4. Diskussion	S. 54
4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker und der Isolate	S. 54
4.1.1 Mikrosatellitenmarker	S. 54
4.1.2 Isolate	S. 55
4.2 Nachweis der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen	S. 56
4.3 Sicherung der Ergebnisse	S. 57
4.4 Beziehungen zwischen den afrikanischen und indischen Stämmen	S. 58
4.5 Beziehungen kenianischer und indischer Stämme zueinander	S. 61
4.6 Mikrosatellitenbasierte Taxonomie der sudanesischen <i>L. donovani</i> -Stämme	S. 62
4.7 Genetische Homogenität der indischen Population I	S. 63
4.8 Ursprung und Verbreitung von <i>L. donovani</i>	S. 64
4.9 Reproduktionsmechanismus der Leishmanien	S. 65
5. Zusammenfassung	S. 67
6. Literaturverzeichnis	S. 70
Erklärung an Eides Statt	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis**A**

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
al.	alias
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASAT	Aspartataminotransferase

B

bp	Basenpaar(e)
----	--------------

C

C	Cytosin
CL	Kutane Leishmaniose

D

<i>d.</i>	<i>donovani</i>
DAT	direct agglutination test
DCL	disseminierte kutane Leishmaniose
Ddm	Delta mu genetic distance (Dmu)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DON-	Donovani (interne Laborbezeichnung)
Dps	Proportion of shared alleles

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay

G

G	Guanin
g	Gramm
GOT	Glutamat Oxaloazetat Transaminase

gp63 Glykoprotein von 63 Dalton

H

h Stunde

HAART Highly Active Antiretroviral Therapy

Hae Haemophilus aegypticus

HIV Human immunodeficiency virus

I

IMH Institut für Mikrobiologie und Hygiene

ITS Internal transcribed spacer

IVDU Intravenous drug user

K

KM Knochenmark

L

l Liter

L. *Leishmania*

L. d. *Leishmania donovani*

LIST Liverpool School of Tropical Medicine

M

m milli bzw. meter

M Molar

MCL mukokutane Leishmaniose

min Minute

MLEE Multilocus enzyme electrophoresis

MLMT Multi Locus Microsatellite typing

MMR Mismatch repair

MON Zymodembezeichnung der MontPELLIERgruppe

MS Mikrosatelliten

mSP major surface protease

μ- mikro

N

n-	nano
n	Anzahl der untersuchten Werte
NJ	Neighbor Joining
nm	nanometer

P

p-	pico
P	Signifikantsniveau
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
pH	$-\log [H^+]$
PKDL	Post Kala Azar kutane-leishmaniose

R

RNS	Ribonukleinsäure
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriktionsfragment-längenpolymorphismus
Rp	Repeats
rpm	Rounds per minute

S

s	Sekunde
SCAR	Sequence-Confirmed Amplified Region
SSCP	Single-Stranded Confirmation Polymorphism
ssu-rRns	,small single-unit'ribosomale RNS

T

T	Thymin
T _A	Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA

Tris Tris(hydroxymethyl)amino-methan
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin

U

U Unit
u.a. unter anderem
UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV ultraviolett

V

V Volt
VL Viszerale Leishmaniose

W

W Watt
WHO World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lebenszyklus der Leishmanien	S. 3
Abbildung 2:	Taxonomie des zoologischen Systems von <i>Leishmania</i>	S. 4
Abbildung 3:	Angenommener Mutationsmechanismus bei Mikrosatelliten	S. 14
Abbildung 4:	Ausschnitt einer Polyacrylamidgelelektrophorese	S. 33
Abbildung 5:	Längenpolymorphismen in den Mikrosatellitensequenzen	S. 34
Abbildung 6:	Allelzahl der indisch/kenianischen und afrikanischen Population dargestellt als Säulendiagramm	S. 37
Abbildung 7:	Anzahl der Populationen errechnet mit Hilfe der Bayesischen Statistik	S. 42
Abbildung 8:	Veranschaulichung der Populationsbildung mittels STRUCTURE K 1-K-3	S. 43
	K 4-K6	S. 44
Abbildung 9:	Phylogenetische Beziehungen zwischen <i>Leishmania</i> Isolaten des <i>L. donovani</i> Komplex unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels Dps erstelltem NJ Dendrogramm	S. 48
Abbildung 10:	Unrooted NJ Baum erhalten durch die Berechnung der Dps-Distanz	S. 49
Abbildung 11:	Dreidimensionale FC-Analyse	S. 51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Produkte, deren Hersteller und Herkunft	S. 18
Tabelle 2: Produkte, Hersteller und Herkunft von Geräten und Apparaturen	S. 20
Tabelle 3: Produkte und Hersteller von Computerprogrammen	S. 20
Tabelle 4: <i>Leishmania</i> -Stämme	S. 21
Tabelle 5: Verwendete Marker	S. 24
Tabelle 6: PCR- Ansatz für fluoreszenz-markierte Primer	S. 25
Tabelle 7: Beschreibung der verwendeten Mikrosatellitenmarker	S. 36
Tabelle 8: Repeatanzahl der Mikrosatellitensequenzen in der untersuchten Stammgruppe	S. 38
Tabelle 9: Fragmentgrößen der Mikrosatelliten-Marker in Basenpaaren	S. 40
Tabelle 10: Fst Werte für die identifizierten Populationen	S. 52
Tabelle 11: Parameter für die genetische Diversität der Populationen	S. 52
Tabelle 12: Vergleich von Klinik und Epidemiologie der sudanesischen und indischen PKDL	S. 60

1. Einleitung

Die Verbreitung von Parasiten aus deren endemischen Gebieten nimmt durch viele Faktoren zu. Diese Faktoren sind vor allem globale Erwärmung, Reiseverkehr und Militärdienst in den endemischen Gebieten, aber auch Vertreibung von Völkern in Krisengebieten aus nicht endemischen in endemische Regionen. Die Folge sind verheerende Epidemien mit 100.000en Toten, wie es 1979 im Sudan durch Leishmanien der Fall war (Zijlstra et al. 2001, Ashford 2000). Aufgrund der Ausbreitung von Stämmen mit erhöhter Virulenz oder Resistenz werden hochauflösende Methoden basierend auf Unterschieden im Genotyp dieser Stämme benötigt, die möglichst einfach durchführbar, reproduzierbar und kostengünstig sind. Mit Hilfe dieser Methoden kann in gefährdeten Gebieten eine schnelle Diagnostik mit nachfolgender erregerspezifischer Therapie ermöglicht und eine eventuelle Epidemie verhindert werden. Durch entsprechende Marker können Resistenzen erkannt und unnötiger Chemotherapeutikaeinsatz vermieden werden.

1.1 Epidemiologie der Leishmaniosen

Die Leishmaniosen gehören zu den häufigsten parasitären Infektionskrankheiten der Welt. Sie kommen in 88 Ländern vor, von denen 72 zu den Entwicklungsländern gehören. Die momentane Prävalenz liegt bei 12 Millionen und die Inzidenz bei 1,5 bis 2,5 Millionen, wobei die Zahl der in den Endemiegebieten Lebenden 350 Millionen Menschen umfaßt. (Desjeux et al. 1996).

1.2 Leishmanien

1.2.1 Morphologie und Lebenszyklus

Leishmanien werden von weiblichen Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* (Alte Welt (Europa, Asien und Afrika)) und *Lutzomyia* (Neue Welt (Amerika)) während einer Blutmahlzeit auf die Vertebraten übertragen. Sie präsentieren sich in zwei biologischen Formen. Unterschieden werden die im Vektor auftretenden länglichen Promastigoten mit gut ausgeprägtem Flagellum, die sich im Darm des Vektors vermehren, und die im

Vertebraten-Wirt obligat intrazellulären, rundlichen bis ovalen, etwa 5 µm großen unbegeißelten Amastigoten (Abbildung 1). Nach der Transmission wird die Promastigote von Makrophagen phagozytiert und in ein Phagolysosom eingeschlossen. Das Phagolysosom ist das Fusionsergebnis aus Phagosom und Lysosom. Es wird auch parasitophore Vakuole genannt und enthält eine Vielzahl von mikrobioziden Enzymen. Die Leishmanien schützen sich selbst durch Umwandlung in amastigote Formen mit veränderter Oberfläche und durch aktive Veränderung des Milieus im Innern der Vakuole. Der Transformation zur Amastigote schließt sich die Vermehrung durch binäre Fission an. Beide Formen haben einen Kern (dem Genom) und einen Kinetoplasten, der das Äquivalent zu den Mitochondrien in Vertebraten darstellt und die sogenannte Kinetoplasten- DNS enthält (Dedet et al. 1999). Leishmaniosen werden von 21 verschiedenen Spezies der Gattung *Leishmania* hervorgerufen und von etwa 30 verschiedenen Spezies der Phlebotomen übertragen (Shaw 1994). Die Transmission verläuft anthroozoonotisch, mit der Ausnahme der viszeralen Leishmaniose (VL) in Indien und der durch *L. tropica* verursachten kutanen Leishmaniose (CL), deren Übertragung vermutlich rein anthroponotisch ist (Herwaldt 1999, Desjeux 1996) (Abbildung 1). Auch kongenitale und parenterale Übertragungen, wie durch Bluttransfusion, die Benutzung gleicher Nadeln bei Drogenabhängigen und bei Laborunfällen werden beschrieben (Herwaldt 1999). Eine Ansteckung über Geschlechtsverkehr wurde beobachtet, aber als geringfügiges Risiko eingestuft (Ashford 2000).

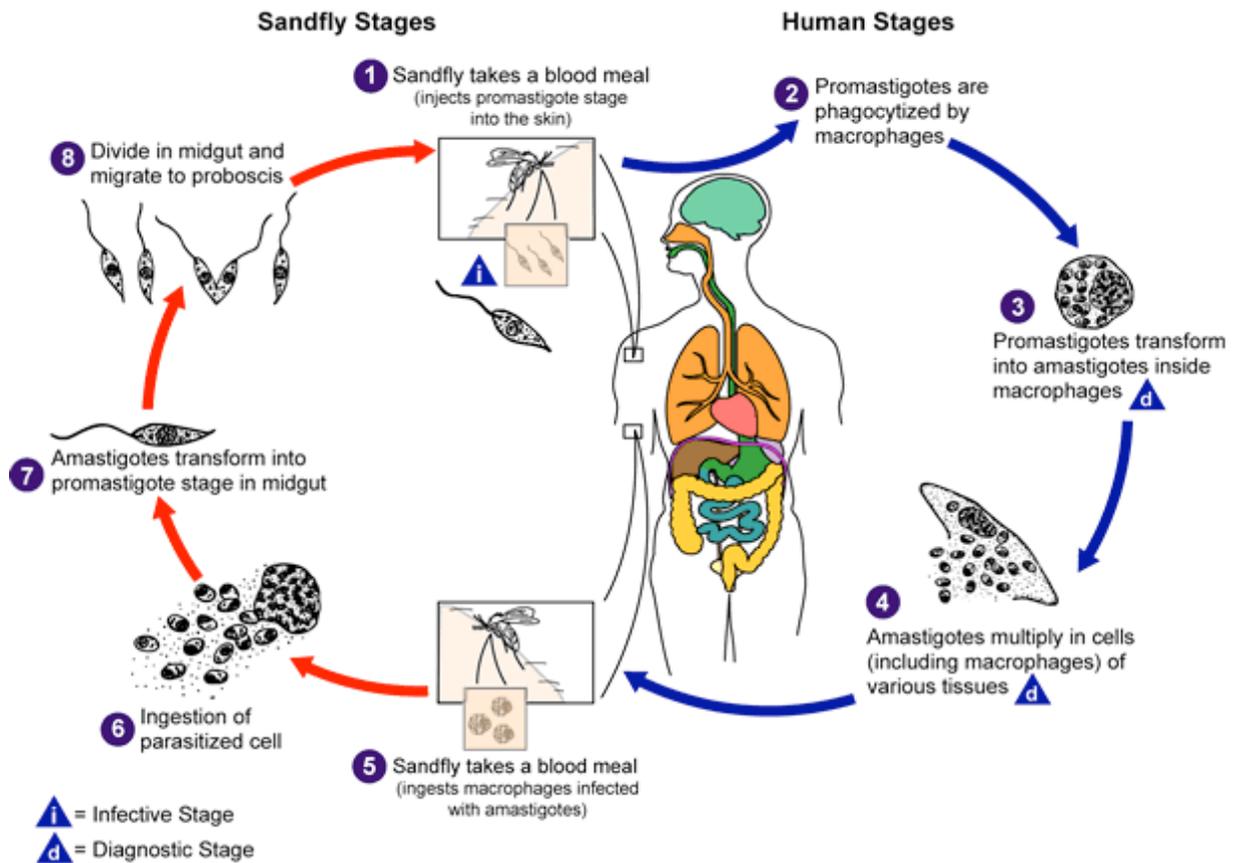


Abbildung 1: Lebenszyklus der Leishmanien

1. Inokulation von promastigoten Stadien durch die Sandmücke; 2. Aufnahme des Parasiten durch Phagozyten; 3. Promastigote wandelt sich zur Amastigote um; 4. Vermehrung amastigoter Formen in Makrophagen; 5/6. Aufnahme amastigoter Leishmanien beim Blutmahl der Sandmücke; 7. Freisetzung der Amastigoten im Mückendarm und Umwandlung in die promastigote Form; 8. Vermehrung der Promastigote durch binäre Fission und Migration in den Stechrüssel.

Aus: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis/htm>

1.3 Taxonomie und Verbreitung der Leishmanien

Parasiten der Gattung *Leishmania* Ross, 1903, sind protozoische Flagellaten, die zur Familie der *Trypanosomatidae* innerhalb der Ordnung *Kinetoplastida* gehören. Die Leishmanien werden wiederum in die Untergattungen *Leishmania* (L.; Alte Welt- außer *L. chagasi*, *L. mexicana* Komplex) und *Vianna* (V.; Neue Welt) (Lainson et al. 1987) unterteilt, denen Komplexe mit verschiedenen Spezies zugeordnet sind (Abbildung 2).

Leishmanien finden ihre Verbreitung auf fünf Kontinenten, wo sie in tropischen und subtropischen Regionen (Desjeux et al 1996) Leishmaniosen hervorrufen.

Reich	Protista Haeckel, 1866			
Unterreich	Protozoa Goldfuss, 1817			
Stamm	Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963			
Unterstamm	Mastigophora Deising, 1866			
Klasse	Zoomastigophorea Calkins, 1909			
Ordnung	Kinetoplastida Honigberg, 1963, <i>emend.</i> Vickerman, 1976			
Unterordnung	Trypanosomatina Kent, 1880			
Familie	Trypanosomatidae Doflein, 1901, <i>emend.</i> Grobben, 1905			
Gattung	<i>Leishmania</i> Ross, 1903			
<u>Untergattung</u>	<i>Leishmania</i> (L.) Safjanova, 1982;		<i>Leishmania</i> (V.)	
<u>Komplex</u> *				
donovani ¹	tropica ¹	mexicana ²	hertigi ²	braziliensis ²
<u>Art</u>				
L.(L.) donovani	L.(L.) tropica	L.(L.) mexicana	L.(L.) hertigi	L.(V.) braziliensis
L.(L.) infantum	L.(L.) aethiopica	L.(L.) amazonensis	L.(L.) daenei	L.(V.) peruviana
L.(L.) chagasi ²	L.(L.) major	L.(L.) pifanoi		L.(V.) panamensis
L.(L.) archibaldi	L.(L.) gerbilli	L.(L.) garhami		L.(V.) guyanensis
		L.(L.) venezuelensis		L.(V.) lainsoni
		L.(L.) aristidesi		L.(V.) naiffi
		L.(L.) enriettii		L.(V.) shawi
				L.(V.) equatoremensis ³
				L.(V.) colombiensis ⁴

Abbildung 2: Taxonomie des zoologischen Systems von *Leishmania*

System illustriert nach Levine et al. (1980) und Lainson und Shaw (1987).

* Begriff ohne taxonomischen Status. 1. Leishmaniosen der ‚Alten Welt‘.

2. Leishmaniosen der ‚Neuen Welt‘. 3. Grimaldi et al. (1992). 4. Kreutzer et al. (1991).

1.4 Methoden zur Klassifizierung der Spezies

Um populationsgenetische und epidemiologische Fragestellungen beantworten zu können, ist eine weitere Unterteilung von Spezies in Subspezies bzw. Stämme notwendig. Da weder die Mikroskopie mit Giemsa-Färbung noch die Kultivierung von

Promastigoten aufgrund ihrer identischen Morphologie zur Differenzierung in Komplex oder Spezies beitragen, schlug Lumsden (1975) eine Differenzierung nach extrinsischen und intrinsischen Kriterien vor. Extrinsisch waren demnach: klinische Ausprägung, geographische Verbreitung und das Verhalten der Erreger in Versuchstieren und Vektoren. Intrinsische Kriterien waren immunologische, biochemische und molekulare Aspekte (Dedet et al. 1999). Die Einteilung nach extrinsischen Kriterien ist obsolet, da die klinische Ausprägung nicht für eine Spezies spezifisch ist und zudem zahlreiche Variationen seit dem Auftreten von HIV/*Leishmania*-Koinfektionen beobachtet wurden. Die geographische Einteilung ist ebenfalls nicht hinreichend. Im Sudan zum Beispiel sind drei verschiedene Spezies endemisch: *L. donovani*, *L. major* und *L. tropica*. *L. donovani* ist Agens für die PKDL (Post Kala Azar Dermale Leishmaniose) und VL im Sudan, *L. major* und *L. tropica* für die CL und alle drei Spezies zusammen sind Agens der sudanesischen mukösen Leishmaniose, einer Unterart der MCL (Osman et al. 2000). Im Mittelmeergebiet kommen *L. infantum*, *L. tropica* und *L. major*, die VL und CL verursachen können, sympatrisch vor. In Südamerika treten *L. chagasi* (Synonym für *L. infantum*), *Leishmania Vianna braziliensis* und *L. amazonensis* zusammen auf und sind Agens der VL, MCL und CL (Bastrenta et al. 2003). Zudem werden Leishmaniosen durch den zunehmenden Reiseverkehr und die globale Erwärmung auch in nicht endemischen Regionen beobachtet, wie z. B. in Deutschland, wo 2001 eine autochthone VL bei einem Kind beschrieben wurde (Bogdan et al. 2001). Eine geographische Zuordnung ist bei Patienten, die mehrere Endemiegebiete bereist haben, ebenfalls nicht möglich (Schönian et al. 2001b).

Für epidemiologische und populationsgenetische Fragen ist eine Identifizierung sowohl auf Intra- als auch auf Interspeziesebene notwendig. Die momentane Standardmethode der „Feintypisierung“ ist seit 1990 (Rioux et al.) die MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis). Durch sie wird das enzymatische Profil (Zymodem), bestehend aus 15 enzymatisch aktiven Proteinen (Isoenzyme), der Parasiten charakterisiert (Rioux et al. 1990). Für jede Art ist eine Anzahl charakteristischer Zymodeme beschrieben, denen die Isolate zugeordnet werden. Nachteilig ist der enorme Zeitaufwand, den diese Methode u.a. durch die notwendige Kultivierung der Parasiten mit sich bringt. Zudem ist eine MLEE teuer und nur in Speziallabors durchführbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die MLEE nur der Phänotyp charakterisiert wird, der durch die Kultivierung modifiziert sein kann. Die Isoenzymanalyse kann nur Änderungen von Basenpaaren

wahrnehmen, wenn es dadurch zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz und damit der Ladung des Proteins kommt. Mutationen in nicht kodierenden Bereichen werden nicht wahrgenommen. Die Klassifikation der Zymodeme deckt sich somit nicht mit Ergebnissen, die durch Genotypisierung erreicht wurden (Schönian et al. 2001a, Jamjoom et al. 2004, Mauricio et al. 2002, Kuhls et al. 2005).

Gegenwärtig wird die MLEE langsam durch andere molekulare Methoden, die den Genotyp charakterisieren ersetzt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die PCR.

PCR-Analysen haben den entscheidenden Vorteil, dass die Erreger-DNS direkt aus dem Gesamtgenom ohne vorherige Kultivierung amplifiziert werden kann. Anhand der Spaltung des ribosomalen „internal transcribed spacers 1 (ITS1)“ mit dem Restriktionsenzym Hae III oder durch Sequenzierung des Amplifikats, können nahezu alle humanpathogenen Spezies identifiziert werden (Schönian et al. 2003, Kuhls et al. 2005).

Für Stammtypisierungen eignen sich Sequenzvergleiche der mitochondrialen Cytochromoxidase II (Ibrahim et al. 2002), oder der Cysteinproteinase B (Quispe Tintaya et al. 2004), die RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) (Zemanová et al. 2004), SCAR (Sequence confirmed amplified region) (Lewin et al. 2002), SSCP (single-stranded confirmation polymorphism) (El Tai et al. 2001), Sequenzierung der ITS- Region (El Tai et al. 2001, Kuhls et al. 2005, Cupolillo et al. 1995), RFLP-Analysen (Restricted Fragment Length Polymorphism) von Multi-copy-Genen, wie gp63 (Mauricio et al. 2001, Dujardin et al. 1995, Quispe Tintaya et al. 2004), sowie Analysen variabler Mikrosatellitensequenzen (Bulle et al. 2002, Schwenkenbecher et al. 2004; Jamjoom et al. 2002a, Ochsenreither et al. 2006).

1.5 Klinische Manifestationen

Die klinische Ausprägung der Leishmaniose hängt sowohl von der Parasitenspezies als auch vom Immunstatus des Wirtes ab (Dedet et al. 1999). Bei Immunsuppression kann es zu einer ausgeprägteren Klinik, bzw. zu atypischen Verläufen kommen. Unterschieden werden fünf Krankheitskategorien: die CL (Orientbeule), die VL (Kala Azar), die mukokutane Leishmaniose (MCL, Espundia), die Post-Kala-Azar-dermale Leishmaniose (PKDL) und die disseminierte CL (DCL) (Ashford 2000). Die Krankheitsbilder weisen auf bestimmte Spezies hin, sind aber nicht pathognomonisch.

So können verschiedene Spezies die gleiche Krankheit verursachen, bzw. eine Spezies zu verschiedenen Krankheitsbildern führen.

1.5.1 Viszerale Leishmaniose und PKDL

Die Erreger der VL in der ‚Alten Welt‘ sind hauptsächlich im *L. donovani* Komplex zusammengefasst. Dazu gehören, basierend auf der Isoenzymanalyse, die Arten *L. donovani* Ross 1903, *L. infantum* Nicolle 1908 (syn. *L. chagasi* (Neue Welt) Cunha & Chagas 1937 (Mauricio et al. 2000, Kuhls et al. 2005) und *L. archibaldi* Castellani & Chalmers 1919. *L. tropica* in der ‚Alten Welt‘ kann, wenn auch selten, Erreger der VL sein (Magill et al. 1993, Sacks et al. 1995). In der ‚Neuen Welt‘ ist der Erreger der VL *L. chagasi* (Herwaldt 1999).

Kommt es zu einer Infektion, so tritt in einigen Fällen ein Ulcus auf (Ashford 2000, Osman et al. 2000). Die Inkubationsperiode beträgt 2-6 Monate. Wird die Infektion manifest, leiden die Patienten an Fieber, Gewichtsverlust, Hepato-Splenomegalie, meist vergrößerten Lymphknoten, Panzytopenie (Zijlstra et al. 2001, Osman et al. 2000) und daraus folgender Immunsuppression. Unbehandelt verläuft eine ausgebrochene Erkrankung, wegen der sekundären Superinfektionen, häufig letal (Ashford 2000). Die durch *L. donovani* verursachte VL kommt hauptsächlich im Sudan und in Kenia sowie in Bangladesch, Nord-Ost-Indien und Nepal vor. Die Beziehung zwischen den afrikanischen und indischen *L. donovani* Stämmen ist bisher unklar. Unterschiede werden bei der Übertragung der indischen und sudanesischen VL berichtet. In Indien wird *L. donovani* von dem synanthropen Vektor *P. argentipes* und in Ostafrika von *P. orientalis* und *P. martini* übertragen (Ashford 2000). Während die Transmission in Indien wahrscheinlich rein anthroponotisch ist - Reservoir ist der Mensch - werden in Ostafrika auch zoonotische Übertragungswege unter Beteiligung verschiedener Säugetierwirte, u.a. Hunde, diskutiert (Dereure et al. 2003, Pralong et al. 2001, Desjeux et al. 2003). Demgegenüber ist die zoonotische Übertragung der VL im gesamten Mittelmeergebiet, Nahen Osten und Südamerika gut dokumentiert. Dort wird die VL durch *L. infantum* hervorgerufen und war primär als Erkrankung bei Kindern bekannt. Bei immunkompetenten Erwachsenen verläuft die Infektion mit *L. infantum* meist asymptomatisch, subklinisch mit spontaner Ausheilung oder mit einer kutanen Symptomatik (Desjeux et al. 2003). In den vergangenen Jahrzehnten wurden vermehrt

HIV/*Leishmania* Koinfektionen verzeichnet (Desjeux et al. 2003). Durch die Schwächung des Immunsystems kann *L. infantum* auch bei Erwachsenen zu schweren viszeralen Verlaufsformen führen. Das Ausbreitungsgebiet der Spezies *L. infantum* erstreckt sich vom Mittelmeergebiet nach Süd-West-Asien und China sowie nach Zentral- und Südamerika.

Im Südsudan wurden während eines Ausbruchs der VL drei Stämme isoliert und mittels Isoenzymanalyse als *L. donovani* (MON-18), *L. infantum* (MON-30) und die „intermediäre Spezies“ *L. archibaldi* (MON-82) klassifiziert (Rioux et al. 1990). Die Präsenz von *L. archibaldi* wurde danach von Pratlong um zwei weitere Zymodeme ergänzt (MON-257 und MON-258) (Pratlong et al. 2001). Bis dato wird die Taxonomie der im Sudan vorkommenden *Leishmania*-Spezies kontrovers diskutiert. Eine vergleichbare Situation bestand bis vor 2000 mit der Taxonomie der *L. infantum* Spezies. Eine Unterteilung von *L. infantum* der ‚Alten Welt‘ und *L. chagasi* der ‚Neuen Welt‘, basierend auf der unterschiedlichen geographischen Verbreitung, den unterschiedlichen Vektoren und Reserviertieren, ist heute obsolet. Mauricio et al. (2000) konnte anhand von PCR-RFLP Analysen zeigen, dass es sich um die gleiche Spezies handelt.

Die PKDL ist eine zusätzliche Komplikation, die meist nach einer bereits durchgemachten VL auftritt. Die Patienten bekommen einen makulo-papulösen Ausschlag, der sich vom Mund aus zu anderen Körperpartien ausbreitet. Die PKDL kommt überwiegend in den Gebieten vor, in denen *L. donovani* auslösendes Agens der VL ist. Diese Regionen sind vor allem Ostafrika (Sudan, Äthiopien, Kenia) und der indische Subkontinent (Indien, Nepal, Bangladesch). Die PKDL tritt in Indien bei 5% - 10% und im Sudan bei 50% - 60% der Patienten nach behandelter VL auf. Unterschiede werden neben der Inzidenz auch in Bezug auf das Patientenalter, die klinische Ausprägung, die Inkubationszeit und die Behandlungsdauer der PKDL in Indien und dem Sudan beobachtet (Tabelle 12 in 4.5). Die PKDL tendiert dazu, chronisch zu werden. In Indien, wo die VL anthroponotisch übertragen wird, gelten PKDL-Patienten als Reservoir in interepidemischen Phasen der VL. Im Sudan wird diese Rolle des Reservoirs wahrscheinlich von Hunden und Wildtieren übernommen. In den mediterranen Regionen, in denen *L. infantum* Erreger der VL ist, treten PKDL Erkrankungen nur selten auf, jedoch in zunehmendem Maße bei HIV/*Leishmania* koinfizierten Patienten (Zijlstra et al. 2003).

1.5.2 Dermatotrope Leishmaniosen

Die selbstlimitierende CL wird von Leishmanien verursacht, die der dermatotropen Gruppe angehören. Einige Wochen nach Inokulation des Erregers entsteht an der Bißstelle eine lokale kutane Läsion, die je nach Erreger ulzerierend oder nodulös sein kann (Herwaldt 1999). Ulzerierende Formen werden besonders für *L. major*, *L. panamensis* und *L. braziliensis* beschrieben, während die weniger schmerzhaften nodulösen Läsionen für *L. tropica*, *L. aethiopica* und *L. peruviana* charakteristisch sind. Die Größe der Läsionen variiert zwischen einigen Millimetern und mehreren Zentimetern im Durchmesser. Zudem kommt es vor allem bei *L. major*- Infektionen häufig zu mehreren, simultan auftretenden Läsionen. Obwohl die beschriebenen Manifestationen nicht mit systemischen Krankheitszeichen in Verbindung gebracht werden und in Immunkompetenten nicht lebensbedrohlich sind, verursachen sie doch aufgrund der Entstellung einen großen Leidensdruck bei den Patienten.

Infektionen durch *L. aethiopica* und *L. amazonensis* können bei bestimmten immunologischen Voraussetzungen disseminierte anstelle einzelner Läsionen der Haut zur Folge haben. Diese DCL kommen bisher nur in Venezuela, der Dominikanischen Republik sowie in Äthiopien und Kenia vor (Ashford 2000).

Eine weitere Form der CL ist die MCL, die vor allem durch *L. braziliensis*, *L. panamensis* und *L. guyanensis* aus der *Vianna* Untergruppe und *L. (L.) amazonensis* (*L. mexicana* Komplex) verursacht wird. Diese Erkrankung ist durch eine Absiedlung der Erreger in Naso- und Oropharynx nach vorangegangener kutaner Läsion gekennzeichnet (Herwaldt 1999). Das Ulcus kann in einigen Fällen auch schon mehrere Jahre zurück liegen. Die Destruktion der Schleimhaut kann so weit voran schreiten, dass das Gesicht oder auch Gaumen und Rachen weitestgehend zerstört werden. Der Zustand kann durch die Aspiration von Gewebsteilchen und die Unmöglichkeit der Nahrungsaufnahme lebensbedrohlich sein.

Seit der Verbreitung des HI-Virus in Leishmaniose Endemiegebieten werden zunehmend abweichende klinische Symptome beschrieben (Puig et al. 2003). So wird in immunsupprimierten Patienten beispielsweise disseminierte CL auch durch *L. major* und *L. braziliensis* hervorgerufen (Dedet et al. 1999).

Im Zusammenhang mit HIV/*Leishmania*-Koinfektionen werden auch zunehmend kutane Läsionen während und nach der Behandlung beschrieben. Ob es sich in diesen Fällen

um eine Parasitenaussaat nach unzureichender Therapie oder um eine Neuinfektion handelt, ist bisher noch unklar.

1.6 Therapie der Leishmaniose

Die Behandlung der VL und der CL erfolgt seit sechs Jahrzehnten parenteral hauptsächlich durch pentavalente Antimonpräparate. Die ohnehin langsame Wirkung und teure Behandlung wird durch eine alarmierende Anzahl resistenter Stämme im Norden von Bihar verschlimmert, die dort bis zu 60% beträgt (Sundar et al. 2000). Therapeutika zweiter Wahl, sind Amphotericin B, Allopurinol, Pentamidine oder Paromomycin, die in diversen Kombinationen mit erheblichen systemischen ungewünschten Wirkungen verbunden sind, allen voran die meist irreversible Nierentoxizität bei 50-80% der Patienten mit systemischer Amphotericin-Gabe (Estler 2000, Ashford 2000, Davies et al. 2003). Ein besserer und weniger schädigender Effekt kann mit liposomalem Amphotericin B erreicht werden, das aber sehr teuer ist und somit für die meisten Patienten in den Endemiegebieten nicht in Frage kommt. Das Alkylphospholipid Miltefosine, das ursprünglich als Medikament gegen Krebs entwickelt wurde und oral eingenommen werden kann, zeigte Heilungsraten von 94% bei Patienten mit VL. Auch Patienten, die nicht auf pentavalente Antimonpräparate ansprechen konnten mit diesem Medikament geheilt werden. Aufgrund der Teratogenität und der langen Halbwertszeit von 7 Jahren ist dieses Medikament jedoch mit viel Bedacht einzusetzen. Miltefosine wird über 4 Wochen á 100 mg/d eingenommen. Die Möglichkeit der oralen Einnahme und die schnelle Besserung von Symptomen führen häufig zum frühzeitigen Abbruch der Therapie, wenn diese nicht überwacht wird. Eine Resistenz gegen dieses Medikament könnte sich somit schnell entwickeln (Agrawal et al. 2005). Bei HIV/*Leishmania*-Koinfizierten ist die Heilung mit den meisten Antileishmaniosepräparaten weder als Mono- noch als Kombinationspräparat möglich. Die Häufigkeit von Therapieversagen wird mit 60% angegeben. Den einzigen Effekt zur Besserung brachte bisher die HAAR-Therapie (Davies et al. 2003), die eine Verbesserung des Immunstatus bewirkt und so auf eine Stagnation der Komplikationen durch Koinfektionen in Europa hoffen lässt.

1.7 Der Spezies Komplex *L. donovani*

1.7.1 Epidemiologie

Der Erreger der VL in Südamerika, dem Mittelmeergebiet und in Asien (Nahe Osten) (Iran und China) ist *L. infantum*, wo der domestizierte Hund das wichtigste Reservoirtier ist. In Indien ist *L. donovani* auslösendes Agens der anthroponotisch übertragenen VL. Grund für die Anthroponose ist der Vektor *Phlebotomus argentipes*, der keine Hunde befällt (Ashford 2000). Andere Tiere, z.B. Rinder werden zwar befallen konnten jedoch nicht als Reservoir identifiziert werden. Dereure und Mitarbeiter (2003) konnten anhand tierischer Leishmanienisolate nachweisen, dass Infektionen durch *L. donovani* im Sudan Anthroponosen sind. Ob in Indien die PKDL Patienten mit einer unbekannt lange anhaltenden Krankheitsdauer Reservoir der Parasiten zwischen Epidemien sind, lässt sich bislang nur vermuten.

Die Serumprävalenz der infizierten Hunde beträgt im gesamten Mittelmeergebiet 16,7%. Sie variiert von Region zu Region und beträgt in Italien in Apulien 14,5% und der Toskana 24%. Für die Alpenregion Frankreichs wird eine Serumprävalenz von 3 - 17% angegeben. Auf der iberischen Halbinsel sind es 5%, 18% in der Region Priorato und 8,5% in der Gegend um Lissabon (Moreno et al. 2002). Hunde, bei denen eine Leishmaniose diagnostiziert wird, können zwar behandelt werden, jedoch ist die Effizienz der Behandlung unabhängig von dem Medikament nur sehr gering. Viele Hunde zeigen vorerst eine Besserung der klinischen Symptome oder sind asymptomatisch, haben aber innerhalb des ersten Jahres einen Rückfall (endogene Infektion, Relaps) oder eine exogene Reinfektion. Dies führt zu einem permanenten Infektionsrisiko für Mensch und Tier vor allem in interepidemischen Phasen. Nachteilig bei der Identifizierung der Erreger mit der Isoenzymanalyse ist die fehlende Möglichkeit der Differenzierung zwischen endogener und exogener Reinfektion. Wenn das später untersuchte Isolat desselben Individuums das gleiche Zymodem besitzt, kann wegen der ungenügenden „Diskriminierung“ nicht unterschieden werden, ob es sich um einen Rückfall oder eine Reinfektion handelt (Morales et al. 2002). In solchen Fällen bietet sich bisher nur die RFLP-Analyse der Kinetoplasten-DNA (Morales et al. 2002) zur Differenzierung an.

Alvar (1996) beschrieb Zymodeme bei HIV positiven Patienten (hauptsächlich IVDU), die bisher weder in Immunkompetenten, Vektoren oder Hunden nachgewiesen werden konnten, das eine anthroponotische Übertragung via kontaminierte Nadeln

wahrscheinlich erscheinen ließ. Die Frage, ob die Transmission bei intravenösen Drogenabhängigen anthroponotischer oder anthropozoonotischer Art ist, sollte demnach ebenfalls mit besser diskriminierenden genotypischen Methoden untersucht werden (Chicharro et al. 2003).

1.7.2 Diagnostik und Speziesidentifizierung

Die Diagnose der VL muss möglichst frühzeitig gestellt werden, um durch rechtzeitige Therapie ernsthafte gesundheitliche Schäden zu vermeiden. Nur durch eine früh einsetzende Behandlung kann das volle Ausmaß der Erkrankung verhindert und die Parasitenanzahl im Menschen und damit die Übertragungshäufigkeit von Mensch zu Mücke verringert werden. Damit wird auch die Anzahl der Reservoirs eingeschränkt (Desjeux 1996).

Häufig basiert die Diagnose noch auf der Klinik, da Routinetests zu teuer sind oder eine schlechte Infrastruktur die permanente Vorhaltung diagnostischer Methoden verhindert. Der Nachweis wird routinemäßig - falls möglich - durch die Mikroskopie und Kultur von Biopsiematerial erbracht. Die Nachteile dieser Methoden sind zahlreich. Die Entnahme von Biopsien aus Knochenmark, Milz, Leber oder Lymphknoten ist für den Patienten sehr schmerzhaft. Die Kultivierung ist sehr zeit- und arbeitsaufwendig, nicht immer erfolgreich und vor allem teuer. Zudem ist die Sensitivität niedrig. Das trifft auch für den relativ einfachen und schnellen mikroskopischen Nachweis zu. Weder die Kultur noch die Mikroskopie ermöglichen jedoch eine Identifizierung auf Speziesebene, da die Spezies morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind (Schönian et al. 2001b, Schallig et al. 2002).

In Endemiegebieten sind serologische Tests wie z.B. der „Direkt-Agglutinationstest“ (DAT) als auch der rK39-Dipstick-Test für Screeninguntersuchungen von Patienten mit VL geeignet. Bei negativem rK39-Dipstick-Test oder niedrigem DAT-Titer kann eine VL sicher ausgeschlossen werden. Aufgrund der einfachen Handhabung ist der rK-39-Test auch für Feldstudien gut geeignet. Diese und andere serologische Verfahren, wie ELISA und indirekter-Fluoreszenz-Antikörpertest (IFAT) haben den Nachteil, dass sie nicht zwischen klinischen, subklinischen und zurückliegenden Infektionen unterscheiden können (Schönian et al. 2004).

Für den Nachweis der Leishmanien mittels PCR hat sich die Amplifikation verschiedener Multicopy-Zielsequenzen bewährt, wie der Amplifikation der Kinetoplasten-Minicircle-DNS, des Mini-Exon-Gens, variabler Sequenzen des ssu rRNA-Gens und des internal transcribed spacer (ITS) im ribosomalen Operon. Eine Speziesdiagnose kann z.B. mit ITS1-PCR-RFLP erfolgen (Schönian et al. 1996).

1.8 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten (‘simple sequence repeats’) sind kurze repetitive Elemente von ein bis sechs Basenpaaren, die bis zu 60 Mal wiederholt sein können. Sie sind im Genom von Eukaryonten und Prokaryonten in unterschiedlicher Anzahl anzutreffen und werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt. Mikrosatelliten zeichnen sich durch einen hohen Polymorphismus aus, der sich als variable Anzahl der repetitiven Elemente ausprägt (Barker 2002, Ellegren 2004). Die Instabilität der Mikrosatelliten ist auf die ‘DNA-Polymerase-Slippage’ zurückzuführen, bei der eine kurze Dissoziation des Template-Stranges und des 3‘ Endes des Primers eine versetzte Anlagerung der Polymerase zur Folge hat. Der resultierende Repeatzugewinn bzw. –verlust stellt sich extrahelikal dar und wird als ‘Frameshift’-Intermediat bezeichnet (Abbildung 3).

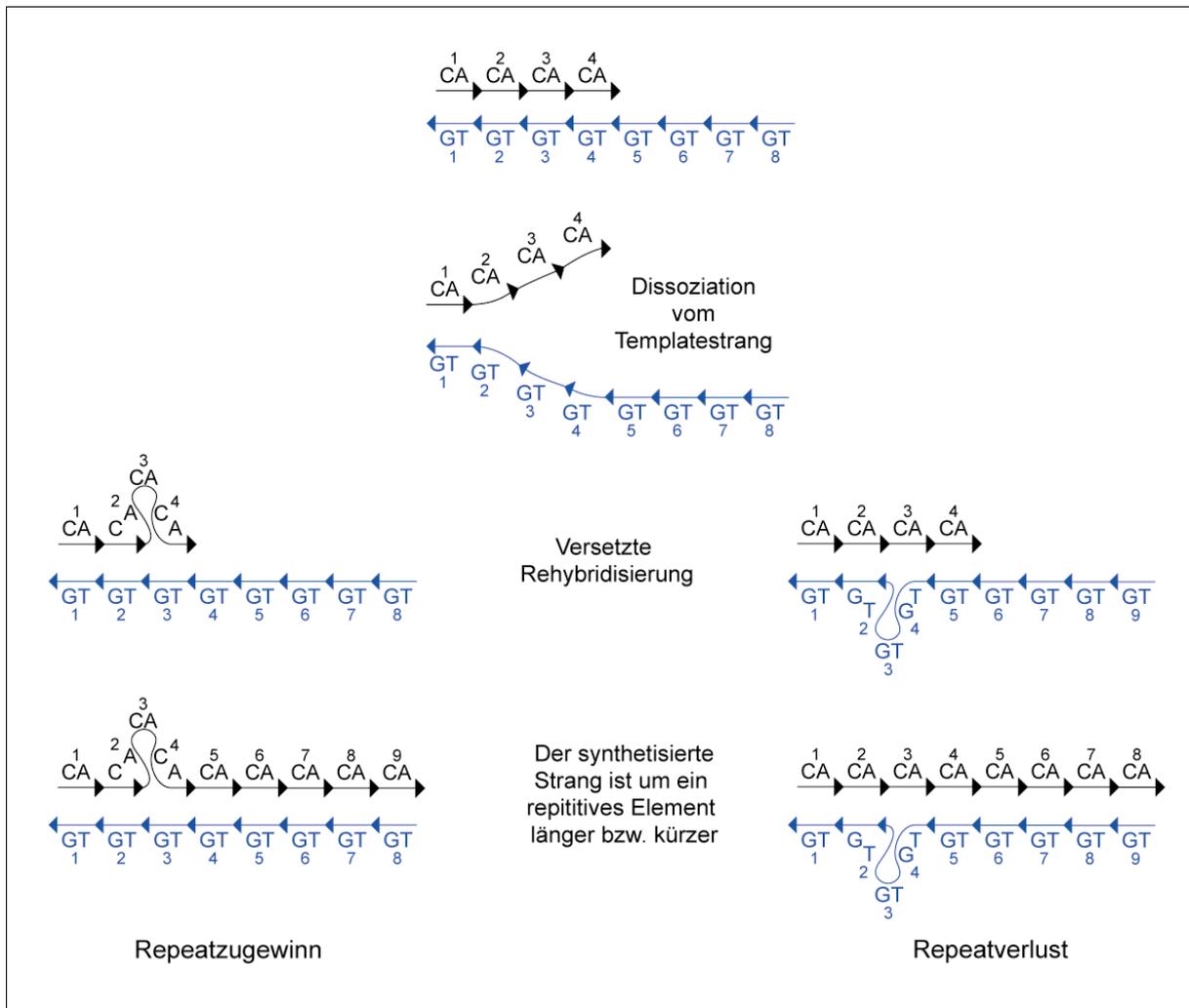


Abbildung 3: Angenommener Mutationsmechanismus bei Mikrosatelliten.

Die Entfernung des ‚Frameshift‘- Intermediats kann durch das ‚postreplicative mismatch repair‘ system (MMR) oder durch die 3‘-5‘ Exonuklease der Polymerase vorgenommen werden. Obwohl beide Mechanismen effektiv ‚Frameshifts‘ beseitigen, nimmt die Effizienz der Exonuklease im Gegensatz zu dem MMR–System mit zunehmender Repeatlänge kontinuierlich ab, so dass bei langer Repeatzahl das MMR-System dominiert (Gragg et al. 2002, Moxon et al. 1999). Wird das Intermediat nicht vor der nächsten Replikation entfernt, so wird die Veränderung des repetitiven Elements manifest. Wegen dieser hohen genetischen Variabilität eignen sich Mikrosatelliten für genetische Untersuchungen auch innerhalb von Spezies.

Leishmanien sind relativ reich an Mikrosatelliten Sequenzen (Rossi et al. 1994). Mikrosatellitenloci lassen sich in hohen Probenzahlen analysieren, benötigen nur geringe Mengen an DNS und die erhaltenen Daten lassen sich im Gegensatz zu der

Isoenzymanalyse ohne Probleme zwischen den Laboren austauschen. Der hohe Grad an Polymorphismen und die unterschiedlichen Größen der Allele ermöglichen es, eine große genetische Diversität aufzudecken (Jamjoom et al. 2004). Mikrosatellitenmarker bieten sich daher besonders gut für epidemiologische, taxonomische und populationsgenetische Analysen an und wurden bereits für die Subspeziesdifferenzierung bei einigen *Leishmania* Spezies, wie *L. donovani*, *L. tropica* und *L. infantum* entwickelt (Jamjoom et al. 2002b, Schwenkenbecher et al. 2004, Bulle et al. 2002, Ochsenreither et al. 2006). Die Längenvariationen bei Mikrosatelliten-Markern können mit Hilfe von Kapillarsequenzierern analysiert werden, wodurch „high throughput“-Analysen möglich und Auswertungen großer Datensätze erleichtert werden. Für die Spezies *L. tropica* konnte eine Analyse mit dem Kapillarsequenzierer bereits in unserem Labor etabliert werden (Schwenkenbecher et al. 2004, 2006).

Von Nachteil ist, dass für eine bestimmte Spezies entwickelte Mikrosatelliten-Marker oft nicht informativ für andere Spezies sind bzw. keine Amplifikate erhalten werden. So wurden anhand des sequenzierten *L. major*-Genoms insgesamt 13 für *L. major* polymorphe Marker entwickelt, von denen aber nur zwei auch innerhalb der Spezies *L. donovani* differenzieren können (Jamjoom et al. 2002a, Schwenkenbecher et al. 2004). Daher war es notwendig, für diese *Leishmania* Arten neue Marker mit Hilfe von angereicherten Bibliotheken zu entwickeln, um umfassende Analysen zu Phylogenie und Epidemiologie zu erhalten (Jamjoom et al. 2002 b, Ochsenreither et al. 2006).

Ein weiterer Nachteil ist das Phänomen der Homoplasie, das bei Mikrosatelliten auftritt. Die Evolution der Mikrosatelliten-Sequenzen geht zwar tendenziell in Richtung der Zunahme von Repeats, Selektionsmechanismen wie das Mismatch Repair System oder die 3' 5' Exonuklease (siehe oben) wirken aber gegen zu lange Repeats (Gragg et al. 2002). Aufgrund dadurch bedingter möglicher Repeatverluste können evolutiv unterschiedliche Mikrosatelliten die gleiche Länge haben. Um den Einfluss der Homoplasie zu minimieren, sollten deshalb viele unterschiedliche Marker - möglichst 15 – 20 - verwendet werden (Ruzzante 1998).

1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die genetische Variabilität von *Leishmania donovani*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft mit Hilfe von ausgewählten Mikrosatelliten (MS)-Markern zu untersuchen. Davon ausgehend sollen den *L. donovani*-Komplex betreffende taxonomische, epidemiologische und populationsgenetische Fragen geklärt werden.

Die Spezies des *L. donovani*-Komplex (*L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi*) sind Auslöser viszeraler aber auch kutaner Leishmaniosen in Ostafrika, auf dem indischen Subkontinent, im Mittelmeerraum und in Südamerika. Bisher werden, anhand der Isoenzymanalyse, im Sudan drei Spezies (*L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi*) innerhalb des *L. donovani* sensu lato-Komplexes unterschieden. Diese Taxonomie, die auf dem bisherigen Goldstandard - der Isoenzymanalyse - basiert, ist jedoch umstritten und wird insbesondere durch genotypische Analysen in Frage gestellt.

Bisher werden die indischen und ostafrikanischen Stämme des *L. donovani*-Komplexes trotz gravierender epidemiologischer und biologischer Unterschiede nicht ausreichend voneinander differenziert. So stellt z.B. die zunehmende, bis zu 60% betragende, Resistenz gegenüber pentavalenten Antimonpräparaten bei *L. donovani* infizierten Patienten auf dem indischen Subkontinent ein großes Problem dar. Im Vergleich dazu gibt es bisher keine Anhaltspunkte für eine ähnliche Resistenzentwicklung bei *L. donovani* infizierten Patienten in Ostafrika. Unklar ist bislang auch, ob die PKDL (Post-Kala-Azar-Dermatose) aufgrund von Therapieversagen oder Neuinfektion auftritt und welche Rolle die PKDL-Patienten in interepidemischen Phasen spielen.

Neben dem Vorteil der Feintypisierung von Leishmanien auf Subspeziesebene hat die Isoenzymanalyse entscheidende Nachteile. Die zeit- und arbeitsaufwändige Anzucht der Erreger ist teuer und macht es unmöglich, eine hohe Anzahl von Proben zu analysieren. Diese Methode ist somit Speziallabors vorbehalten. Sie ist auch zunehmend umstritten, da sie lediglich einen Phänotyp charakterisiert, der unter dem Einfluß der Kultivierung modifiziert werden kann.

Für epidemiologische Untersuchungen ist aber die Identifikation des Genotyps notwendig, um zuverlässig auf Inter- und Intraspeziesebene differenzieren zu können. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit MS Marker eingesetzt, die auch innerhalb verschiedener Zymodeme unterscheiden können. Die in dieser Arbeit durchgeführte MLMT (Multi Locus Microsatellite Typing) beruht auf Längenpolymorphismen in über

das Genom verteilten Mikrosatellitensequenzen. MS sind bis zu 60 mal wiederholte Mono- bis Hexanukleotidrepeats. Sie sind reichlich und ubiquitär im Genom der meisten Eukaryonten vorhanden, weisen eine hohe Anzahl von Allelen auf, sind kodominant und werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt. Auch das Genom von Leishmanien ist reich an MS und die Vorzüge der MLMT für die Feintypisierung von Subspezies und Stämmen konnten z. B. für *L. tropica* bereits gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 Mikrosatellitenmarker verwendet, die von Jamjoom et al. (2002) und Schwenkenbecher et al. (2004) publiziert wurden. Die entsprechenden MS wurden aus 54 DNA-Proben von *L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi* Stämmen aus Ostafrika, Indien, Israel und China sowie 2 DNA-Proben von *L. infantum* aus dem Mittelmeergebiet mit Hilfe optimierter PCR-Protokolle amplifiziert und im Agarosegel nachgewiesen. Die Analyse der erhaltenen Fragmente erfolgte dann durch die Polyacrylamidgelelektrophorese, mit anschließender Auswertung anhand der Bionumerics Software, und im Kapillarsequenzierer mit dem Fragmentanalyse-Modul. Für jeden untersuchten Stamm und Marker wurde die Fragmentgröße in Basenpaaren und Anzahl der Repeats ermittelt. Anhand der Ergebnisse wurden Datenmatrizen erstellt, die die Grundlage für die Berechnungen der genetischen Distanz zwischen den unterschiedlichen Stämmen und deren Zuordnung zu verschiedenen Populationen bildeten. Verglichen mit der Isoenzymanalyse liegen die Vorteile der hochauflösenden MS in einer verbesserten Diskriminierung der einzelnen Subspezies und Stämme und der schnellen gleichzeitigen Analyse vieler Proben im Kapillarsequenzierer.

Neben der Aufklärung der taxonomischen Verhältnisse innerhalb des *L. donovani*-Komplexes sollten in dieser Arbeit auch Populationsstrukturen mit den daraus folgenden Konsequenzen für die Entwicklung neuer Diagnostika, Therapeutika und Vakzine, innerhalb des *L. donovani* Komplex aufgedeckt werden. Wenn möglich, sollte auch auf die historische Ausbreitung der Leishmanienstämme in der Alten Welt geschlossen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Produkte, deren Hersteller und Herkunft

<i>Produkte</i>	<i>Hersteller</i>
10x PCR-Puffer	AppliedBiosystems Roche, Foster City, USA
Acrylease	Stratagene, La Jolla, USA
Agarose NA	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Amoniumperoxidsulfat 10% (APS)	Merck, Darmstadt
AmpliTaq [®] DNA Polymerase	Applied Biosystems Roche, Foster City, USA
Aqua bidest	Braun, Melsungen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
CEQ [™] Sample Loading Solution 6.0 ml	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
CEQ [™] Sequencing Separation Buffer	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
CEQ [™] Separation Gel	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
CEQ [™] Size Standard Kit-400	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
DNS-Leiter 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe
DNS-Leiter 10 bp	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Ethidiumbromid-standard	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll	Sigma, St. Louis, USA
Formaldehyd 37%	J. T. Baker, Philipsburg, USA
Gel Save	Appli Chem, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Primer (unmarkiert)	TibMolbiol, Berlin
Primer (fluoreszenzmarkiert)	Proligo, Paris, Frankreich
Rotiphorese Gel 29	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Silan A 174	Appli Chem, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Temed(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Biodeal, Markkleeburg
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

2.1.2 Lösungen

Stopplösung I: 30 ml

1,5 ml Glyzerin

3 mg Bromphenolblau

600 µl EDTA [0,5 M; pH 8,0]

30 µl Tris [1 M; pH 8,0]

Mit Aqua dest. Auffüllen.

10x TBE-Puffer:

1,6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

0,8 g Borsäure

0,6 ml EDTA [0,5 M; pH 8,0]

Aqua bidest auf 15 ml auffüllen

dNTP's: Ausgangskonzentraion 100 mM

50 µl A, C, G, T

1800 µl Aqua bidest.

Stopplösung II:

0.25% Bromphenolblau

0.25% Xylencyanol FF

15% Ficoll

Mit Aqua dest. Auffüllen.

Tris(hydroxymethyl)aminomethane: 100 ml; 1M; pH 8,0

12,11 g Tris

etwas Aqua dest. hinzufügen, pH mittels pH – Meter (WTW) auf 8,0 einstellen und mit

Aqua dest. auffüllen.

TE-Puffer: 200 ml; pH 8,0

2 ml Tris(hydroxymethyl)aminomethane (1M; pH 8,0)

400 µl EDTA (0,5M; pH 8,0)

Mit Aqua dest. auffüllen.

2.1.3 Geräte und Apparaturen

Tabelle 2: Produkte, Hersteller und Herkunft von Geräten und Apparaturen

<i>Produkte</i>	<i>Hersteller</i>
96-Well-Platten	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
96-Flat-Well-Platten	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter Life Science Research, Krefeld
Eagle Eye II	Stratagene, Heidelberg
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Geltrockner Maxidry D 64	Biometra, Göttingen
Gelschalen	Biotec- Fischer, Reiskirchen
Gene Genius Bio Imaging System	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
PH – Meter, Microprocessor	WTW, Weilheim
Powersupply-Phero stab 300/500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Robocycler Gradient 40	Stratagene, La Jolla, USA
Spectrophotometer, Ultrospec III	Pharmacia LKB, Erkerode
Trio- Thermoblock	Biometra, Göttingen
Transilluminator TFX	Vilber/ Lourmat, Torcy, Frankreich
Vortexer, Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Computerprogramme

Tabelle 3: Produkte und Hersteller von Computerprogrammen

<i>Produkte</i>	<i>Hersteller</i>
BIONUMERICS	Applied Maths BVBA
GENETIX 4.02	Montpellier group; http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm
MICROSAT	Minch et al. (1997)

MSA	Dieringer, Schlötterer (2003)
PAUP 4.0b8	Swofford (2000)
PHYLIP 3.6	Felsenstein (2004); http://evolution.genetics.washington.edu/
STRUCTURE	Pritchard et al. (2000)

2.1.5 *Leishmania*- Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 56 *Leishmania*-Isolate aus dem *L. donovani* Komplex, die aus verschiedenen endemischen Regionen stammen, auf ihre genetische Distanz hin untersucht. Die DNS-Proben wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schönian zur Verfügung gestellt. Es wurden dabei Isolate von Patienten mit verschiedenen klinischen Ausprägungen der Leishmaniose und verschiedener Wirte untersucht. Tabelle 4 gibt Aufschluß über die WHO-Bezeichnung, die entsprechende hausinterne Kodierung der Isolate, die Zymodeme und die Pathologie.

Tabelle 4: Untersuchte *Leishmania*-Stämme

WHO-Code ¹	Laborbezeichnung ² IMH Charité	Zymodem ³	Pathologie ⁴
MHOM/IN/1980/DD8	DON-01	MON-2***	VL
MHOM/KE/1983/NLB189	DON-02	MON-37***	PKDL
MHOM/KE/1984/NLB218	DON-03	n.d.	PKDL
MHOM/KE/1985/NLB323	DON-04	MON-37***	VL
MHOM/SD/1975/LV139	DON-06	n.d.	CL
MHOM/SD/1962/LRC-L61	DON-07	MON-82 **	Keine Angabe
MHOM/SD/1968/1S	DON-08	n.d.	VL
MHOM/IN/1971/LRC-L51a	DON-10	n.d.	VL
MHOM/CN/????/Wangjie1	DON-11	MON-35***	VL
MHOM/SD/1992/51-band	DON-12	MON-30 *	VL
MHOM/SD/1993/GE	DON-13	MON-82 **	VL
MHOM/SD/1993/AEB	DON-14	MON-82 **	VL
MHOM/SD/1993/45-UMK	DON-15	MON-30 *	VL
MHOM/SD/1993/762L	DON-16	MON-30 *	VL
MHOM/SD/1993/9S	DON-17	MON-18***	VL
MHOM/SD/1993/452BM	DON-18	MON-30 *	PKDL
MHOM/SD/1993/597LN	DON-19	MON-30 *	PKDL
MHOM/SD/1993/38-UMK	DON-20	MON-30 *	VL
MHOM/SD/1993/35-band	DON-21	MON-82 **	VL

2. Material und Methoden

MHOM/SD/1993/597-2	DON-22	MON-30 *	PKDL
MHOM/SD/1993/338	DON-23	MON-18***	PKDL
MHOM/ET/1967/HU3	DON-24	MON-18***	VL
MHOM/IN/1993/BI2302	DON-28	n.d	Keine Angabe
MHOM/IL/1998/LRC-L740	DON-29	n.d	Keine Angabe
MHOM/ET/????/HUSSEN	DON-38	MON-31***	VL
MHOM/IN/????/DEVI	DON-39	MON-2***	VL
MHOM/SD/1982/GILANI-LG12	DON-41	MON-30 *	VL
MHOM/SD/1982/GILANI- LEM494	DON-42	MON-30 *	VL
MHOM/ET/ 1972/GEBRE1	DON-43	MON-82 **	VL
MHOM/IN/1983/AG83	DON-44	n.d	VL
MHOM/IN/2001/BHU20140	DON-45	n.d.	VL
MHOM/SD/1997/LEM3429	DON-46	MON-257 **	VL
MHOM/SD/1997/LEM3463	DON-47	MON-258 **	VL
MHOM/IN/1954/SC23	DON-48	MON-38***	VL
MCAN/SD/2000 /LEM3946	DON-49	MON-274***	CanVL
MHOM/IN/2002/BHU1	DON-51	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU2	DON-52	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU3	DON-53	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU4	DON-54	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU5	DON-55	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU6	DON-56	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU7	DON-57	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU8	DON-58	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU9	DON-59	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU11	DON-60	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU12	DON-61	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU13	DON-62	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU15	DON-63	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU17	DON-64	n.d.	VL
MHOM/IN/2002/BHU20	DON-65	n.d.	VL
MHOM/KE/1955/LRC-L53	DON-66	MON-36***	VL
MHOM/KE/????/LRC-L445	DON-67	n.d	Keine Angabe
MHOM/SD/1962/3S	INF-33	MON-81*	VL
MHOM/SD/1997/LEM3472	INF-38	MON-267*	PKDL
MHOM/TN/1980/IPT1	INF-01	MON-1*	VL
MHOM/ES/1988/LLM175	INF-37	MON-198*	VL (HIV-positiv)

¹ WHO-Schlüssel: Wirt/ Land, in dem der Parasit isoliert wurde/ Jahr der Isolation/ Isolatbezeichnung. Wirte: Mammalia (M), Homo sapiens (MHOM), Canis familiaris

(MCAN). Herkunftsland: China (CN), Spanien (ES), Äthiopien (ET), Israel (IL), Indien (IN), Kenia (KE), Sudan (SD), Tunesien (TN). Unbekannte Jahreszahlen wurden mit vier Fragezeichen gekennzeichnet.

²Isolate: *L. donovani* (DON), *L. infantum* (INF)

³Zuordnung durch die Isozymenanalyse: Zymodeme der Montpellier Forschungsgruppe (MON), *L. infantum* *; *L. archibaldi* **, *L. donovani* *** . Nicht differenziert (n. d.).

⁴Pathologie: Viszerale Leishmaniose (VL), Kutane Leishmaniose (CL), Post kala-azar dermale Leishmaniose (PKDL), Canine VL (CanVL)

Der von Jamjoom et al. (2002a) klonierte Stamm MHOM/ET/67/HU3; (Laborbezeichnung: DON-24) auf Basis dessen Sequenz die Marker entwickelt wurden, wurde in allen PAGE und Fragmentanalysen als Referenzstamm mitgeführt

2.2 Methoden

2.2.1 DNS-Präparation aus Leishmanien

Die DNS wurde aus kultivierten Promastigoten mit der Phenol-Chloroform-Methode extrahiert, wie in Schönian et al. (1996) beschrieben. Die Konzentration sowie die Reinheit wurden mit dem Spektrophotometer (Pharmacia LKB) durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt. Die DNS der verschiedenen Leishmanien-Stämme wurde bei 4°C gelagert und für die PCR einheitlich auf 10 ng/μl mit H₂O verdünnt.

2.2.2 Amplifizierung der Mikrosatellitenmarker

2.2.2.1 Verwendete Primer

Für die Analyse der Mikrosatellitenfragmente mit der automatischen Kapillarelektrophorese wurden fluoreszenzmarkierte Vorwärtsprimer verwendet (Proligo). Für die Analyse der MS-Fragmente mit der PAGE wurden nicht-markierte Primer verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Marker

Marker	Markierung	Sequenz (5'-3') Forward	Sequenz (5'-3') Reverse	Rp-anzahl ¹ DON-24	Genbanknr. ²
LIST 7011	DyeD3	CGGCGACATGCACACATA	CACACACATTGAAGATGGAGGA	(TA) ₁₃	AF389876
LIST 7021	DyeD2	CCGAATACACAAGCCTCCTC	TCAGGCTTCGTCGTTTCTTT	(CA) ₁₅	AF427869
LIST 7023	DyeD3	CTTTGCGTTGCGCACTAA	GCTTGTGTTCCGTGTGTGTT	(CA) ₁₉	AF427871
LIST 7025	DyeD4	GGAGTCGTCTCTCTGTTACGC	ATCGCGTGCATGGGTATT	(CA) ₂₂	AF427873
LIST 7027	DyeD3	CTCTCTCGTCACCACAGCAC	AGGGGACAAGACACAGATGG	(CA) ₁₅	AF427875
LIST 7028	DyeD3	CACTCCACTGCGTTGGATA	CTTTGACCGCCGTTCTTT	(GT) ₁₀	AF427876
LIST 7030	DyeD3	TCTCTGCACGTCTGTGTGTG	TCTTCCTGAAGGGCGATG	(GT) ₉	AF427878
LIST 7033	DyeD3	CATTGCTGAGTGCTGCTAGTG	ATGAGCGTACTGGGCACAC	(GT) ₂₁	AF427881
LIST 7035	DyeD3	AAAGGTATGATACGCCTGTGG	ACCGCAAAGAACGGACAT	(GT) ₁₅	AF427883
LIST 7037	DyeD4	ATGCTGAGCCCATCAAGACT	GATGTCCCCGTTTACTCCAA	(GT) ₂₀	AF427885
LIST 7039	DyeD3	CTCGCACTCTTTCGCTCTTT	GAGACGAGAGGAACGGAAAA	(CA) ₁₀	AF427887
LIST 7040	DyeD3	GCAGAGCGAGACACACAGAC	GTGCACGTTGATGTGCTTCT	(CA) ₁₁	AF427888
GA6	n. m.	GTGTGAGCTAATCGATTGGG	CGCTCTCTCTGTCTCTGTCT	(GA) ₈	AY826388
GA10	n. m.	ACTCACTCCGTTGGGATGAT	CGCGCATATCTCTATCCACT	(GA) ₁₉	AY826390
GACA1	n. m.	CTGCCTGCCTGTCCGTGCCT	GGAGAAGAAGAAATGGTGAG	(GACA) ₃	AY826397

Markierte Vorwärtsprimer (schwarz- DyeD2, grün- DyeD3, blau- DyeD4),

Vorwärtssequenz („Forward“), Rückwärtssequenz („Reverse“), n. m.; nicht markiert

¹ Repeatanzahl bezogen auf den Referenzstamm DON-24.

² Die Genbanknummern in der Primertabelle beziehen sich auf den Referenzstamm MHOM/ET/67/HU3

2.2.2.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Ermittlung der spezifischen Annealingtemperatur (T_A) wurde jedes Primerpaar mit der DNS des Referenzstammes (MHOM/ET/1967/HU3) mit einem modifizierten Mikrosatelliten-PCR-Ansatz, wie unter Punkt 2.2.2.3. beschrieben, amplifiziert. Anschließend wurde der Referenzstamm im standardisierten Mikrosatelliten Thermoprogramm, beschrieben unter 2.2.2.3., mit zwei Temperaturgradienten, $T_A = 42^\circ\text{C} - 56^\circ\text{C}$ und $T_A = 44^\circ\text{C} - 58^\circ\text{C}$ getestet und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die richtige Annealingtemperatur wurde durch die Bande mit der deutlichsten Markierung ausgewählt. Nach der Bestimmung der T_A wurde für jedes Primerpaar die PCR mit DNS-Proben der in Tabelle 4 aufgeführten Isolate unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation der Fragmente mit fluoreszenzmarkierten Vorwärtsprimern, notwendig für die Analyse der Mikrosatellitenfragmente mit der automatischen Kapillarelektrophorese, wurde ein Standardansatz von 50 µl verwendet (Tabelle 6). Die fluoreszenzmarkierten Primer wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Der Standardansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und für 2 Sekunden mit dem Vortexer (Bender & Hobein) auf niedriger Stufe durchmischt. Bei jeder PCR wurden eine Negativkontrolle, bei der keine DNS enthalten ist, sondern die entsprechende Menge durch Aqua ad iniectabilia aufgefüllt wird, und eine Positivkontrolle mit der DNS des Referenzstammes mitgeführt. Die PCR- Ansätze wurden entweder im Trio-Thermoblock (Biometra) oder im Robocycler Gradient 40 (Stratagene) initial bei 95°C für 4 min denaturiert. In den folgenden 35 Zyklen wurde noch mal jeweils für 30 s bei 95°C denaturiert. Nach Anlagerung der Primer bei der spezifischen Annealingtemperatur (T_A) für 30 s, folgte die Primerverlängerung für 1 min bei 72°C. Nach einer terminalen Elongation von 6 min wurde das Amplifikat auf 4°C heruntergekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die PCR-Produkte im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die verschiedenen Annealingtemperaturen sind unter Punkt 3.4. in Tabelle 7 nachzulesen.

Tabelle 6: PCR- Ansatz für fluoreszenz-markierte Primer

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	<i>Endkonzentration</i>
10x Puffer	5 µl	1x
DNTPs	4 µl	0,2 mM je Nukleotid
Vorwärtsprimer	1 µl	10 pmol/ 50 µl
Rückwärtsprimer	0,5 µl	5 pmol/ 50 µl
Taq-Polymerase	0,2µl	1 U/µl
DNS	2 µl	10 ng/ µl

Mit Aqua bidest. auf 50 µl auffüllen

Der PCR-Standardansatz für nicht markierte Primer unterscheidet sich durch die Menge an Vorwärtsprimer, die 5pmol/ 50 µl beträgt.

2.2.3 Kontrollelektrophorese für die PCR-Produkte

Für den elektrophoretischen Nachweis der amplifizierten MS-Marker wurden 1,3%-ige Agarosegele verwendet. Dafür wurden in der Mikrowelle 1,3 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer vollständig gelöst. Nach einer kurzen Abkühlung wurde das flüssige Gel in eine Gelschale (15 x 15 cm) mit Kamm (1mm Dicke) gegossen und im Kühlraum bei 4°C verfestigt. Jeweils 8 µl des Amplifikats wurden mit 3 µl Stopplösung I vermischt und in die Geltaschen (Slots) gefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 8 µl einer 1 kb Leiter (375 µl Aqua bidest., 75 µl Stopplösung I, 50 µl 1 kb-Leiter Ausgangslösung Standard I) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 6 V pro cm Gellänge für 1-2 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10-15 min im Ethidiumbromidbad (100 µl einer 10mg/ml Ethidiumbromidstandardlösung auf 2 l Aqua bidest) gefärbt, kurz im Wasserbad gewaschen und die Banden anschließend unter UV-Licht mit Hilfe des Eagle-Eye-II-System oder Gene-Genius-System visualisiert und als Foto dokumentiert.

2.2.4 Fragmentlängenanalysen der Mikrosatelliten

2.2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels (Sambrook et al. 1989) wurden die Glasplatten in aufsteigender Konzentration mit Aqua dest, 70%-igem und 96%-igem Alkohol gereinigt. Anschließend wurden beide Platten zur besseren Ablösung des Gels mit einigen Spritzern Acrylease oder Gel Save eingerieben und die Ohrenplatte im Kambereich zusätzlich mit Silan A 174 zur besseren Adhäsion und Stabilisierung der Slots behandelt. Die Glasplatten wurden mit den Abstandhaltern (Spacern) dazwischen aufeinandergelegt und mit 5 cm breitem Klebeband abgeklebt. Zusätzlich wurden zur Adhäsion der Platten Stahlklammern nebeneinander an jede Seite angebracht. Der Kamm wurde nach Gießen des Gels vorsichtig luftblasenfrei zwischen die beiden Platten eingeführt und ebenfalls mit Stahlklammern fixiert. Für ein 12%-iges Polyacrylamidgel von 0,8 mm Dicke und 45 cm x 35 cm Größe wurde eine Lösung von 150 ml verwendet, bestehend aus 45 ml Acrylamid:bisacrylamid 29:1 (40%

Stammlösung- Rotiphorese Gel 29), 15 ml 10x TBE und 90 ml Aqua dest. Durch Zugabe von 750 µl APS 10% und 75 µl Tetramethylethyldiamin (Temed) wurde die Polymerisierung gestartet, die nach 2-3 h abgeschlossen war. Anschließend wurden Klebeband, untere Spacer und Kamm von den Gelplatten entfernt. Letztere wurden in die Halterung der Elektrophoresekammer eingespannt und mit einer Aluminiumplatte versehen, die eine ausgeglichene Wärmeverteilung über die Platten gewährleisten sollte. Die obere Pufferkammer wurde mit 3%iger Agarose abgedichtet. In den oberen und unteren Tank wurde 0,5x TBE- Puffer gefüllt und nach der Entfernung des Kamms die Slots mit Hilfe einer Mikroliterpipettespitze von Gelresten gereinigt. Die Gelkammer wurde an das Stromversorgungsgerät angeschlossen und ein Vorlauf bei 10 W für 30 min gestartet. Auf das Polyacrylamidgel wurden PCR- Produkte mit nicht-markierten Vorwärtsprimern aufgetragen. Jeweils 15 µl dieser PCR-Produkte wurden mit 5 µl Stopplösung II (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF und 15% Ficoll) gemischt und nach dem Vorlauf in die Slots gegeben. Als Molekulargewichtsmarker wurden 8 µl einer 10 bp-Leiter (entspricht 5,2 µl TE-Puffer pH 8, 1,6 µl Ladepuffer, 1,2 µl 10 bp-Leiter Ausgangslösung Standard, Invitrogen) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 6 W für 16 h über Nacht durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Silberfärbung nach Budowlé et al. (1991). Dazu wurde das Gel in 3 l 1%-iger Salpetersäure (46 ml 65% Salpetersäure und 2954 ml Aqua dest.) für 10 min fixiert und anschließend kurz in destilliertem Wasser gespült. Danach wurde das Gel in einer Silbernitratlösung (0,2%) (6g 0,2% Silbernitrat in 3000 ml Aqua dest. gelöst) für 25 min gefärbt und dann nochmals für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in einer 3 l 0,28 M Natriumcarbonatlösung (89,1 g Natriumcarbonat in 3000 ml Aqua dest.), der kurz vor Gebrauch 1 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt wurde. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. folgte eine Fixierung in 3 l einer 10%-igen Essigsäure (300 ml 99%-100% Essigsäure in 2700 ml Aqua dest.). Anschließend wurde das entwickelte Gel nochmals in destilliertem Wasser gewaschen, auf Filterpapier gezogen und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Das Gel wurde bei 65°C für 3 h auf dem Geltrockner Maxidry D 64 (Biometra) unter Vakuum getrocknet und anschließend eingescannt. Die Auswertung der Größe der amplifizierten Mikrosatellitenfragmente erfolgte mit Hilfe der Bionumerics-Software V 2.5 (Applied Maths BVBA).

2.2.4.2 Fragmentanalyse am Kapillarsequenzierer

Die automatische Fragmentanalyse am CEQ8000 entspricht einer elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente innerhalb von Kapillaren. Die folgenden Lösungen wurden von der Firma CEQ, USA, zur Fertigstellung eines Mastermix bezogen. Ein Mastermix von 29 µl wurde aus je 28,75 µl CEQ-Sample Loading Solution (SLS) und 0,25 µl CEQ-Standard entsprechend der Probenanzahl in einem Eppendorf- Gefäß zusammen pipettiert. Die Größenangabe des CEQ-Standards beträgt zwischen 60 und 400bp (d.h. alle 10 bzw. 20 bp ein Standardpeak in rot-(D1)). PCR-Produkte, die unter Verwendung der fluoreszenz-markierten Primer der Gruppe dyeD3 (grüne Markierung) amplifiziert worden waren, wurden vor der Analyse 1:5 und die der Gruppe dyeD4 (blaue Markierung) 1:20 verdünnt, um die gewünschte gleichmäßige Fluoreszenz der farblich verschieden markierten Fragmente zu erhalten. Bei den PCR-Produkten, deren Vorwärtsprimer mit dyeD2 (schwarze Markierung) markiert worden waren, war eine Verdünnung des Amplifikats nicht notwendig. Die vorbereiteten PCR-Amplifikate wurden manuell aufgeschüttelt und anschließend kurz bei 8000 rpm (Zentrifuge 5415 D) zentrifugiert. Aus der Suspension wurde 1 µl entnommen und in je eine Kammer einer 96-Well-Platte pipettiert. Jeweils 29 µl Mastermix wurden nach kurzem Schütteln und Zentrifugieren auf die PCR-Produkte pipettiert. Beide Komponenten wurden gemischt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Entsprechend der Anzahl verwendeter Kammern auf der 96-Well-Platte wurden in einer 96-flat-Well-Platte die kongruenten Kammern mit CEQ Separation Buffer gefüllt. Bei unterschiedlicher Markierung der Amplifikate war es möglich, pro Kammer bis zu drei verschieden markierte Amplifikate zu verwenden. In diesem Fall wurde die Menge an SLS entsprechend reduziert. Die vorbereiteten Platten und das fertig gelieferte Polyacrylamidgel wurden in den CEQ 8000 eingesetzt. Die Laufdauer im verwendeten Programm frag-1 betrug pro Reihe (acht Kammern) eine Stunde. Das Prinzip der Kapillarelektrophorese führte computergesteuert über die CEQ 8000 Software zu der Darstellung der Mikrosatellitenfragmente als Spektrogramme mit entsprechender Fragmentgrößenangabe.

Die gleichzeitige Analyse vieler Proben stellt vor allem eine kostengünstige und schnelle Variante der Fragmentanalyse dar.

2.2.5 Statistische Auswertungen

2.2.5.1 Modellbasierte Analyse der Populationsstruktur

Die Populationsstrukturen wurden mittels der Bayesischen Statistik mit dem Programm STRUCTURE errechnet (Pritchard et al. 2000). STRUCTURE ermittelt die wahrscheinliche Anzahl (K) vorhandener Populationen anhand der Allelfrequenzen in verschiedenen Loci. Die Isolate werden dann anhand ihrer Genotypen den jeweiligen Populationen zugeordnet. Eine Vorlaufzeit von 10.000 Wiederholungen wurde festgesetzt und die wahrscheinliche Anzahl von Populationen durch 100.000 Markov Chain Monte Carlo Iterationen ermittelt. Die wahrscheinliche Anzahl der Populationen wurde über den Vergleich von logarithmischen Wahrscheinlichkeiten ($\ln \Pr(K/X)$, wobei X die Menge der Genotypen entspricht) für Werte zwischen K 1 und 10 erhalten. Die Werte wurden in einem Diagramm verglichen. An dem höchsten Punkt (Plateau) der Kurve, hergeleitet nach Gauss, erfasst der Wert K die tatsächliche Anzahl der Populationen.

2.2.5.2 Distanzbasierte Analysen der Populationsstruktur

Die Berechnung der genetischen Distanz einschließlich der statistischen Unterstützung durch Bootstrap-Analysen (1000 Replikationen) (Felsenstein 1985) erfolgte mit Hilfe der Software MICROSAT 1.5d (Minch et al. 1997). Dazu wurden die Mikrosatellitenfragmente in Basenpaaren pro Locus angegeben und mit zwei unterschiedlichen Distanzmethoden Dendrogramme erstellt. Die Distanzmethode D_{AS} (D_{ps} = proportion of shared alleles) (Bowcock et al. 1994) basiert auf der Theorie des Infinite Allele Models (IAM), bei der jede Mutation eine neue beliebig hohe Anzahl an Repeats hervorbringen kann (Benett et al. 1998). Die zweite Distanzmethode (D_{dm}) basiert auf dem schrittweisen Mutationsprozess (SSM=single step mutation model), bei dem davon ausgegangen wird, dass Mikrosatelliten über den Zugewinn oder Verlust von ein oder zwei Repeats schrittweise mutieren (Goldstein et al. 1995). Für die Konstruktion der UPGMA bzw. Neighbor-joining Dendrogramme beider Distanzmodelle wurde das PAUP 4.0b8 Programm (Swofford 2000) oder PHYLIP 3.6 (Felsenstein 2004) benutzt.

2.2.5.3 Populationsgenetische Analysen

Statistische Daten, wie F_{st} , p-Werte, Allelzahl, H_e (erwartete Heterozygotie) und H_o (beobachtete Heterozygotie) unter Berücksichtigung der SSM- und IAM-Modelle, wurden mit dem Programm MICROSATELLITE ANALYSER (Dieringer und Schlötterer 2003) berechnet. Anhand des MSA werden die genetischen Distanzen zwischen Populationen ermittelt.

Um genetische Substrukturen auf Populationsebene aufzudecken, wurde eine FCA (factorial correspondence analysis) mit Hilfe von GENETIX (Dawson und Belkhir, 2001) durchgeführt, die die einzelnen Isolate aufgrund ihres Allelstatus räumlich in einer 3-D-Graphik darstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Stämme

Zur Untersuchung der genetischen Variabilität verschiedener Leishmanienstämme wurden Isolate aus acht Ländern ausgewählt, die entweder von VL- oder PKDL-Patienten stammten. In einem Fall wurde die Diagnose der CL gestellt (DON-06).

Von den ausgewählten 56 Isolaten sind 22 aus Indien, 5 aus Kenia, 3 aus Äthiopien, 22 aus dem Sudan, und jeweils ein Isolat aus China, Israel, Spanien und Tunesien. 30 Isolate wurden bereits mit der Isoenzymanalyse in 16 unterschiedliche Zymodeme und drei unterschiedliche Spezies, *L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi*, eingeteilt (Tab.4 in 2.1.5). Für diese *Leishmania*-Stämme wurde die Variation der Repeat-Längen mit 15 verschiedenen Mikrosatellitensequenzen analysiert.

3.2 Auswahl und Optimierung der Mikrosatellitenmarker

Zwölf der in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare (LIST-Primer) wurden von Jamjoom (Jamjoom et al. 2002b) aus einer angereicherten Genbibliothek - basierend auf dem Stamm MHOM/ET/67/HU3 - entwickelt (Tab. 5). Für diesen Stamm ist für jeden Marker die Anzahl der Repeats in der Datenbank angegeben. Aus diesem Grund diente in dieser Arbeit MHOM/ET/67/HU3 als Referenzstamm. Diese Marker waren auch für *L. infantum* polymorph. Drei Primerpaare (GA6, GA10, GACA1) wurden ursprünglich von Schwenkenbecher et al. (2004) für *L. tropica* entwickelt, zeigten aber auch Polymorphismen bei unterschiedlichen *L. donovani* und *L. infantum* Stämmen.

Für die Analyse der 56 Isolate (Tab. 4 in 2.1.5) wurden zunächst die PCR-Bedingungen (Tab. 6 in 2.2.2.3) und die Annealingtemperatur (Tab. 7) für jedes Primerpaar bestimmt, um zu einem optimalen Ergebnis zu gelangen. Die DNS aller Stämme wurde mit den unter Punkt 2.2.2.1 in Tabelle 7 aufgeführten Primerpaaren amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel überprüft.

3.3 Analyse der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Marker GA6, GA10 und GACA1 war die Analyse mittels Kapillarsequenzierer durch die zu erwartende niedrige Fragmentgröße von unter 100 bp erschwert. Die Variation der Mikrosatellitensequenzen bei diesen Markern wurde deshalb mit Hilfe der PAGE bestimmt. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 10 bp-Leiter (Abb. 4). Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte mit der Bionumerics-Software. Der Referenzstamm MHOM/ET/67/HU3 (DON-24) wurde als Vergleich auf das Gel mit aufgetragen. Mit den Markern GA6, GA10 und GACA1 konnten Polymorphismen sowohl innerhalb der sudanesischen als auch innerhalb der indischen Stämme, jedoch nicht bei den Isolaten aus der Region Bihar nachgewiesen werden. Doppelbanden wurden innerhalb der Marker GA6 und GA10 bei den sudanesischen Stämmen beobachtet. Bei dem Marker GACA1 konnten keine Doppelallele detektiert werden. Nullallele traten nicht auf. Anhand der bekannten Mikrosatellitensequenzen des klonierten Stammes wurde von der Größe des PCR-Produkts auf die Anzahl der repetitiven Sequenzen in den untersuchten Isolaten geschlossen (Tab. 8).

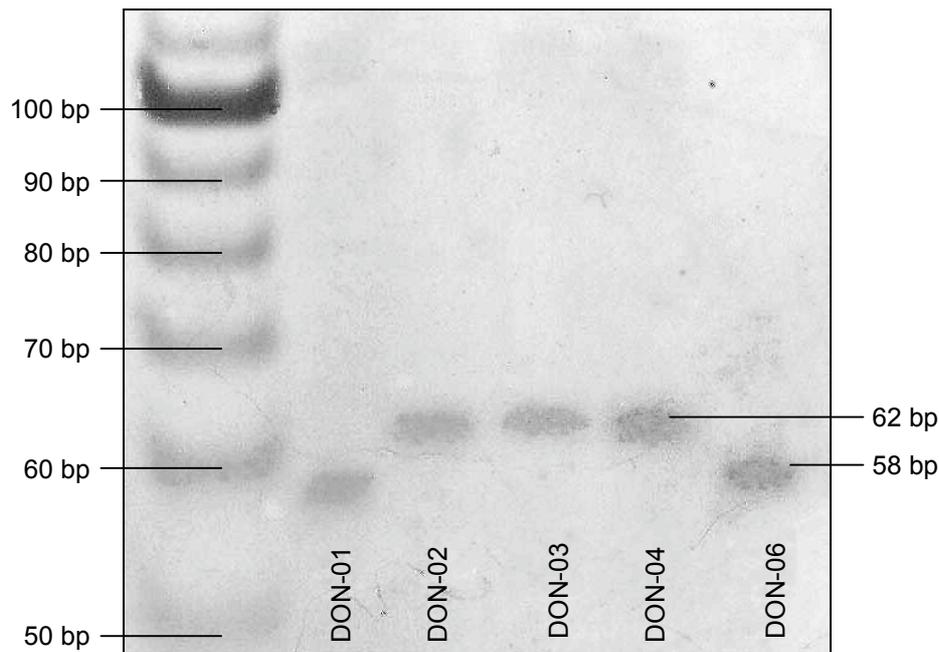


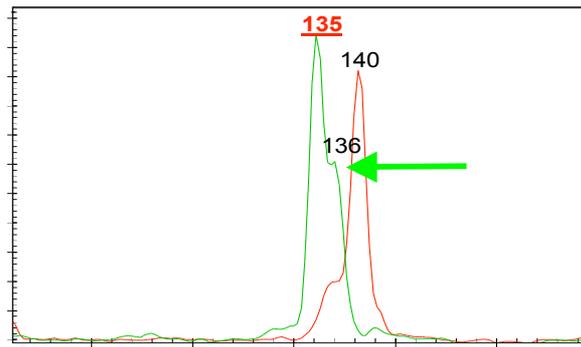
Abbildung 4: Ausschnitt einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Dargestellt ist Locus GACA1 mit *L. donovani* Stämmen aus Indien (Don-01), Kenia (Don-02, Don-03 und Don-04) und Sudan (Don-06), als Molekulargewichtsmarker diente eine 10-bp-Leiter.

3.4 Analyse der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers

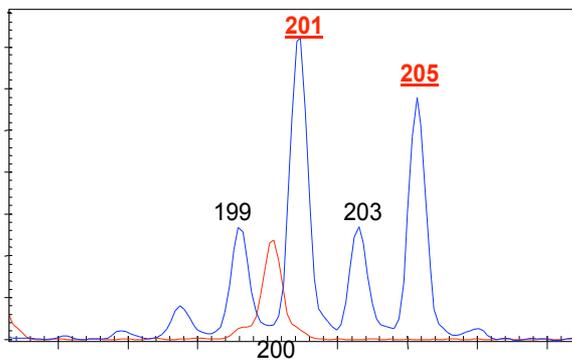
Die Amplifikate der LIST-Marker wurden mit dem Kapillarsequenzierer auf Größe und Heterozygotie untersucht. Mit allen Primerpaaren und für alle ausgewählten Stämme wurden entsprechende PCR-Produkte erhalten. Nullallele traten nicht auf. In jedem Fall konnten ein bis zwei Banden der erwarteten Größe visualisiert werden (Abb.5).

A LIST7028 DON-64



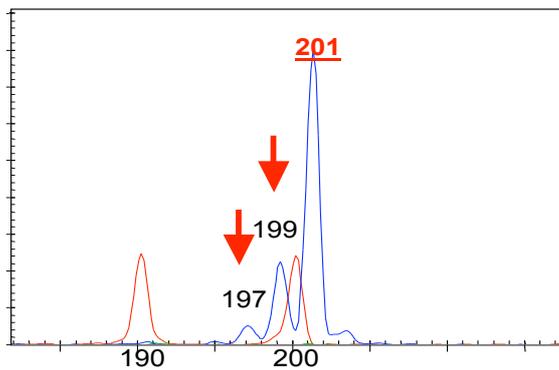
Einzelbande

B LIST7037 INF-33



Doppelbande

C LIST7037 DON-14



Stotterbande

Abbildung 5: Längenpolymorphismen in den Mikrosatellitensequenzen

Dargestellt am Beispiel zwei verschiedener Marker und drei verschiedener Stämme.

Die Grafik wurde von der CEQ8000 Software übernommen. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren angegeben. Die Peaks des Molekulargewichtsmarkers sind rot, die der unterschiedlichen Mikrosatelliten-Allele in grün oder blau dargestellt. Grafik A zeigt ein homozygoten Allel mit einem A-Überhang (grüner Pfeil). Grafik B stellt beispielhaft ein heterozygoten Allel dar. In Grafik C sind Stotterbanden gezeigt (rote Pfeile). Die tatsächlichen Allele sind rot, fett und unterstrichen.

Ein häufiges Problem bei der Auswertung von Mikrosatelliten-Analysen ist das Auftreten sogenannter Stotterbanden sowie von A-Überhängen. Stotterbanden, in Abbildung 5, Grafik C, beispielhaft dargestellt, sind meist um eine (oder auch zwei) Repeat-Einheiten kürzer als die Hauptbande, was auf das „DNA-Polymerase Slippage“ (siehe Abb. 3) während der Replikation von Mikrosatelliten-Sequenzen zurückzuführen ist. Beim Slippage kommt es zu einer kurzen Dissoziation des Templatestranges und des 3' Ende des Primers und einer versetzten Anlagerung der Polymerase. Daraus resultiert ein Extraloop entweder im Template- oder Primerstrang und somit ein Repeatverlust oder Repeatgewinn, letzteres ist in den Stotterbanden sichtbar.

In Abbildung 5 ist ein deutlicher A-Überhang in Grafik A zu sehen. Das kommt dadurch zustande, dass die Taq-Polymerase, die über eine template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität verfügt, häufig während der PCR-Reaktion einen Adeninrest an das PCR-Produkt anlagert, unabhängig von der Sequenz am 3'-Ende des Amplifikats. Die in Grafik B der Abbildung 5 gezeigten Doppelbanden sind wahrscheinlich Ausdruck von Heterozygotie in diesen Isolaten und Loci. Die Möglichkeit, dass es sich um Mischisolate handelt, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Im Kapillarsequenzierer analysierte Werte eindeutiger Banden wurden übernommen. Traten Stotterbanden auf, wurden die Peaks mit der höchsten Intensität und gleichzeitig der höchsten Fragmentlänge ausgewählt. Nach Shinde et al. (2003) treten Deletionen 14 mal häufiger auf als Insertionen, so dass in den meisten Fällen der Wert mit der höchsten Fragmentlänge und der höchsten Intensität als Ursprungsallel angesehen werden konnte (Abbildung 5, C).

In einigen Fällen war es schwierig, Stotterbanden und Doppelallele richtig zu werten. Abweichende bzw. unsichere Ergebnisse wurden in einem unabhängigen Experiment verifiziert. Die Anzahl und Art der insgesamt vorkommenden Allele für die einzelnen Loci und Stämme sind in Tabelle 7 und Abbildung 5 dargestellt. Bei 11 der 12 LIST-Loci

wurden zwischen 1 (LIST 7030) und 25 (LIST 7040) Doppelbandenpeaks nachgewiesen (Tab. 8 und 9). Die wahrscheinlichste Ursache dafür sind heterozygote Allelkombinationen an den jeweiligen Loci, auch wenn Stammgemische - wie bereits erwähnt - nicht völlig ausgeschlossen werden können.

Tabelle 7: Beschreibung der verwendeten Mikrosatellitenmarker

Marker	Min. und max. TA in C°	Repeatanzahl	Heterozygotie Gesamt in %	Allelzahl pro Marker	Größe des Fragments
<i>Alle Isolate</i>					
LIST 7011	7 – 20	42	0	11	168 – 194 bp
LIST 7021	15 – 27	53	25,0	10	219 – 243 bp
LIST 7023	7 – 21	54	7,1	9	147 – 175 bp
LIST 7025	6 – 29	51	23,2	11	171 – 217 bp
LIST 7027	8 – 18	50	21,4	10	176 – 196 bp
LIST 7028	5 – 12	50	16,1	5	135 – 151 bp
LIST 7030	9 – 20	42	1,8	5	173 – 195 bp
LIST 7033	6 – 32	44	16,1	16	176 – 228 bp
LIST 7035	8 – 17	53	7,1	7	177 – 195 bp
LIST 7037	10 – 23	51	10,7	9	181 – 207 bp
LIST 7039	8 – 28	44	17,9	9	191 – 231 bp
LIST 7040	6 – 18	50	44,6	8	207 – 231 bp
GA6	4 – 6	58	3,6	3	62 – 66 bp
GA10	4 – 6	42	1,8	3	82 – 86 bp
GACA1	1 – 11	48	0	3	58 – 98 bp

Angabe der min. und max. Repeatzahlen aller untersuchten Stämme, der Markerspezifischen Annealingtemperatur, der prozentualen Heterozygotie, Allelzahl pro Marker und der Fragmentgrößen (in Basenpaaren).

Tabelle 7 gibt Auskunft über die Repeatanzahl, die zugehörige Annealingtemperatur, Heterozygotie, Allelzahl und Fragmentgröße für jeden Marker. Die Allelzahl betrug zwischen drei und 16, mit einem Durchschnittswert von 7.9. Insgesamt waren die LIST Marker den übrigen Markern (GA6, GA10 und GACA1) in der Repeatvariabilität überlegen. Die höchste Differenz der Repeats konnte bei dem Marker LIST7033 (6-32) verzeichnet werden. Mit fast 45% wurde die höchste Heterozygotierate für den Marker LIST 7040 verzeichnet. Lediglich der Marker LIST 7011 war für alle untersuchten

Stämme homozygot. Die Rate an Doppelbanden war innerhalb der ostafrikanischen Isolate größer als bei den asiatischen Stämmen. Die Isolate aus dem indischen Endemiegebiet erwiesen sich als sehr homogen, Polymorphismen konnten in dieser Gruppe nur mit dem Marker LIST 7033 detektiert werden (Tab. 8 und 9).

In Abbildung 6 ist die Anzahl der Allele, die in den zwei hauptsächlichen Regionen Afrika und Indien auftreten, miteinander verglichen. Die Anzahl der afrikanischen Allele beträgt 81 bezogen auf 25 Isolate (Population III und IV) und die der indischen und kenianischen Allele 36 bezogen auf 27 Isolate.

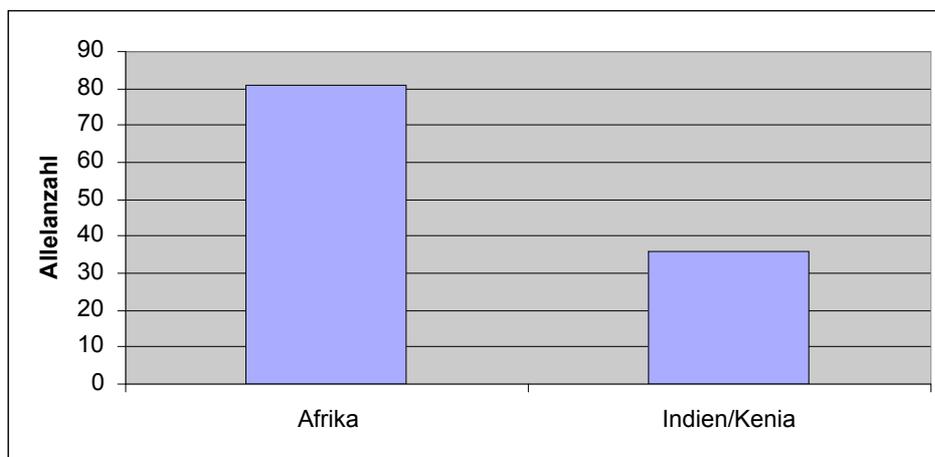


Abbildung 6: Allelzahl der indisch/kenianischen und afrikanischen Population dargestellt als Säulendiagramm

Tabelle 8: Repeatanzahl der Mikrosatellitensequenzen in der untersuchten Stammgruppe⁴

Nr.	Isolat	Herkunft	GA6	GA10	GACA1	LIST 7011	LIST 7021	LIST 7023	LIST 7025	LIST 7027	LIST 7028	LIST 7030	LIST 7033	LIST 7035	LIST 7037	LIST 7039	LIST 7040	
1	DON-11	China	6	5	1	8	24	14; 19	8	13;16	11; 12	14; 20	7	10	17; 20	22; 28	6	DON-11
2	DON-02	Kenia	5	6	2	7	19	8	7	11	8	10	13	12	13	10	18	DON-02
3	DON-03	Kenia	5	6	2	7	19	8	7	11	8	10	21	12	13	10	18	DON-03
4	DON-04	Kenia	5	6	2	7	19	8	7	11	8	10	21	12	13	10	18	DON-04
5	DON-10	Indien	5	6	2	7	20	8	7	11	8	10	13	12	13	10	18	DON-10
6	DON-48	Indien	5	6	2	7	20	8	7	11	8	10	13	12	13	10	18	DON-48
7	DON-66	Kenia	5	6	2	7	20	8	7	11	8	10	13	12	13	10	18	DON-66
8	DON-67	Kenia	5	6	2	7	19	8	7	11	8	10	13	12	12	10	18	DON-67
9	DON-01	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	32	8	19	11	17	DON-01
10	DON-28	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-28
11	DON-39	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-39
12	DON-45	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-45
13	DON-51	Indien	6	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-51
14	DON-52	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-52
15	DON-53	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	29; 31	8	19	11	17	DON-53
16	DON-54	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-54
17	DON-55	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-55
18	DON-56	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-56
19	DON-57	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-57
20	DON-58	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-58
21	DON-59	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	32	8	19	11	17	DON-59
22	DON-60	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-60
23	DON-61	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-61
24	DON-62	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-62
25	DON-63	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-63
26	DON-64	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-64
27	DON-65	Indien	5	6	1	8	22	7	7	12	5	10	31	8	19	11	17	DON-65
28	DON-44	Indien	6	5	1	13	15; 16	19	21	15	10; 11	9	20	15	20; 22	9	7; 11	DON-44

⁴ Farbliche Kennzeichnung der Populationen nach STRUCTURE und NJ Dendrogramm. **Population I**, **Population II**, **Population III**, **Population IV**, **Population V**, **Population VI**

Nr.	Isolat	Herkunft	GA6	GA10	GACA1	LIST 7011	LIST 7021	LIST 7023	LIST 7025	LIST 7027	LIST 7028	LIST 7030	LIST 7033	LIST 7035	LIST 7037	LIST 7039	LIST 7040	
29	DON-06	Sudan	5	5	1	12	15	18	20	15	11	9	21; 23	15	20; 23	8; 9	11	DON-06
30	DON-07	Sudan	6	5	1	20	15	18	20; 22	15; 16	11	9	20; 22	15	21; 22	8	7; 11	DON-07
31	DON-08	Sudan	6	5	1	13	15; 16	19	22	15	10; 11	9	21	15	20	9; 10	7; 11	DON-08
32	DON-12	Sudan	6	5	1	7	16	18	21; 29	14	11	9	14; 21	15	19; 21	8	7; 11	DON-12
33	DON-14	Sudan	6	5	1	11	15	18	21	15	10	9	22	15	20	9	7; 11	DON-14
34	DON-15	Sudan	6	5	1	11	16	17; 19	22; 29	15; 17	11	9	22	15	20	8; 9	7; 11	DON-15
35	DON-16	Sudan	6	5	1	9	16	18	19; 21	14; 17	11	9	14; 20	15	20; 21	8; 9	7; 11	DON-16
36	DON-17	Sudan	6	5	1	12	15	18	21	15; 16	10	9	22	15	20	8; 9	7; 11	DON-17
37	DON-18	Sudan	6	5	1	12	15; 16	18	21	17	10	9	23	15; 16	20	9; 10	7; 11	DON-18
38	DON-19	Sudan	6	5	1	11	15; 16	19	21; 29	14; 15	10; 11	9	22	15	21	8	7; 11	DON-19
39	DON-20	Sudan	6	5	1	16	15; 16	18	21	14; 15	10; 11	9	21	15	19; 20	8; 9	7; 11	DON-20
40	DON-21	Sudan	5; 6	5	1	18	15; 16	18; 20	22; 29	14	11	9	22; 24	15	20; 21	9	7; 11	DON-21
41	DON-22	Sudan	6	5	1	11	15; 16	19	21; 29	14; 15	10; 11	9	22	15	21	8	7; 11	DON-22
42	DON-23	Sudan	6	5	1	9	15; 16	18	22; 29	14; 15	10; 11	9	22	15	20	9	7; 11	DON-23
43	DON-24	Äthiopien	6	5	1	13	15	19	22	15	10	9	21	15	20	10	7; 11	DON-24
44	DON-41	Sudan	6	5	1	11	15; 16	18	22; 29	15; 16	10; 11	9	22; 27	15	20	8; 9	7; 11	DON-41
45	DON-42	Sudan	6	5	1	11	15	18	23; 29	16; 17	10; 11	9	22	15; 16	20	9	7; 11	DON-42
46	DON-43	Äthiopien	6	5	1	11	15; 16	18	22	14; 15	10	9	22	15	20	9	7; 11	DON-43
47	INF-33	Sudan	5	5	1	10	15; 22	18	19	14	10	9	22	14; 15	20; 22	8; 9	7; 11	INF-33
48	DON-46	Sudan	5	6	1	10	15; 21	18	6; 21	13	11	10	22	10	20; 22	9	7; 11	DON-46
49	DON-47	Sudan	5; 6	5	1	13	21	18	6	13	11	10	6	10	21	19	7; 11	DON-47
50	DON-49	Sudan	6	5, 6	1	10	21	18	6; 21	13	11	10	6	10	21	9	7; 11	DON-49
51	DON-13	Sudan	5	6	1	10	15; 21	18	6; 21	13	11	10	22	10	20; 22	8	7; 11	DON-13
52	DON-38	Äthiopien	6	5	1	14	21	7	6	13	11	10	6	10	21	19	11	DON-38
53	INF-38	Sudan	6	5	1	10	21	18	21	13	11	10	22	10	21	8	7; 11	INF-38
54	DON-29	Israel	6	5	1	8	25; 26	15; 21	22	18	10	11	6	10	19	12	7; 15	DON-29
55	INF-01	Tunesien	4	4	11	9	27	7	9	9	10	10	14; 15	14	12	15	9	INF-01
56	INF-37	Spanien	4	4	11	9	26	7	10	8	10	10	16; 17	14; 17	10	19	8	INF-37

Tabelle 9: Fragmentgrößen der Mikrosatelliten-Marker in Basenpaaren⁴

Nr.	Isolat	Herkunft	GA6	GA10	GACA1	LIST 7011	LIST 7021	LIST 7023	LIST 7025	LIST 7027	LIST 7028	LIST 7030	LIST 7033	LIST 7035	LIST 7037	LIST 7039	LIST 7040	Isolat
1	DON-11	China	66	84	58	170	237	161; 171	175	186; 192	149; 151	183; 195	178	181	195; 201	219; 231	207	DON-11
2	DON-02	Kenia	64	86	62	168	227	149	173	182	143	175	190	185	187	195	231	DON-02
3	DON-03	Kenia	64	86	62	168	227	149	173	182	143	175	206	185	187	195	231	DON-03
4	DON-04	Kenia	64	86	62	168	227	149	173	182	143	175	206	185	187	195	231	DON-04
5	DON-10	Indien	64	86	62	168	229	149	173	182	143	175	190	185	187	195	231	DON-10
6	DON-48	Indien	64	86	62	168	229	149	173	182	143	175	190	185	187	195	231	DON-48
7	DON-66	Kenia	64	86	62	168	229	149	173	182	143	175	190	185	187	195	231	DON-66
8	DON-67	Kenia	64	86	62	168	227	149	173	182	143	175	190	185	185	195	231	DON-67
9	DON-01	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	228	177	199	197	229	DON-01
10	DON-28	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-28
11	DON-39	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-39
12	DON-45	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-45
13	DON-51	Indien	66	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-51
14	DON-52	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-52
15	DON-53	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	222; 226	177	199	197	229	DON-53
16	DON-54	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-54
17	DON-55	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-55
18	DON-56	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-56
19	DON-57	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-57
20	DON-58	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-58
21	DON-59	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	228	177	199	197	229	DON-59
22	DON-60	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-60
23	DON-61	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-61
24	DON-62	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-62
25	DON-63	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-63
26	DON-64	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-64
27	DON-65	Indien	64	86	58	170	233	147	173	184	135	175	226	177	199	197	229	DON-65
28	DON-44	Indien	66	84	58	180	219; 221	171	201	190	147; 149	173	204	191	201; 205	193	209; 217	DON-44

⁴ Farbliche Kennzeichnung der Populationen nach STRUCTURE und NJ Dendrogramm. **Population I**, Population II, Population III, **Population IV**, Population V, Population VI

Nr.	Isolat	Herkunft	GA6	GA10	GACA1	LIST 7011	LIST 7021	LIST 7023	LIST 7025	LIST 7027	LIST 7028	LIST 7030	LIST 7033	LIST 7035	LIST 7037	LIST 7039	LIST 7040	Isolat
29	DON-06	Sudan	64	84	58	178	219	169	199	190	149	173	206; 210	191	201; 207	191, 193	217	DON-06
30	DON-07	Sudan	66	84	58	194	219	169	199; 203	190; 192	149	173	204; 208	191	203 ; 205	191	209; 217	DON-07
31	DON-08	Sudan	66	84	58	180	219; 221	171	203	190	147; 149	173	206	191	201	193; 195	209; 217	DON-08
32	DON-12	Sudan	66	84	58	168	221	169	201; 217	188	149	173	192 ; 206	191	199; 203	191	209; 217	DON-12
33	DON-14	Sudan	66	84	58	176	219	169	201	190	147	173	208	191	201	193	209; 217	DON-14
34	DON-15	Sudan	66	84	58	176	221	167; 171	203; 217	190; 194	149	173	208	191	201	191; 193	209; 217	DON-15
35	DON-16	Sudan	66	84	58	172	221	169	197; 201	188; 194	149	173	192 ; 204	191	201; 203	191; 193	209; 217	DON-16
36	DON-17	Sudan	66	84	58	178	219	169	201	190; 192	147	173	208	191	201	191; 193	209; 217	DON-17
37	DON-18	Sudan	66	84	58	178	219; 221	169	201	194	147	173	210	191; 193	201	193; 195	209; 217	DON-18
38	DON-19	Sudan	66	84	58	176	219; 221	171	201; 217	188; 190	147; 149	173	208	191	203	191	209; 217	DON-19
39	DON-20	Sudan	66	84	58	186	219; 221	169	201	188; 190	147; 149	173	206	191	199 ; 201	191; 193	209; 217	DON-20
40	DON-21	Sudan	64 ; 66	84	58	190	219; 221	169; 173	203; 217	188	149	173	208; 212	191	201 ; 203	193	209; 217	DON-21
41	DON-22	Sudan	66	84	58	176	219; 221	171	201; 217	188; 190	147; 149	173	208	191	203	191	209; 217	DON-22
42	DON-23	Sudan	66	84	58	172	219; 221	169	203; 217	188 ; 190	147; 149	173	208	191	201	193	209; 217	DON-23
43	DON-24	Äthiopien	66	84	58	180	219	171	203	190	147	173	206	191	201	195	209; 217	DON-24
44	DON-41	Sudan	66	84	58	176	219; 221	169	203; 217	190; 192	147; 149	173	208; 218	191	201	191; 193	209; 217	DON-41
45	DON-42	Sudan	66	84	58	176	219	169	205; 217	192; 194	147; 149	173	208	191; 193	201	193	209; 217	DON-42
46	DON-43	Äthiopien	66	84	58	176	219; 221	169	203	188; 190	147	173	208	191	201	193	209; 217	DON-43
47	INF-33	Sudan	64	84	58	174	219; 233	169	197	188	147	173	208	189; 191	201; 205	191; 193	209; 217	INF-33
48	DON-46	Sudan	64	86	58	174	219; 231	169	171; 201	186	149	175	208	181	201; 205	193	209; 217	DON-46
49	DON-47	Sudan	64 ; 66	84	58	180	231	169	171	186	149	175	176	181	203	213	209; 217	DON-47
50	DON-49	Sudan	66	84 ; 86	58	174	231	169	171; 201	186	149	175	176	181	203	193	209; 217	DON-49
51	DON-13	Sudan	64	86	58	174	219; 231	169	171; 201	186	149	175	208	181	201; 205	191	209; 217	DON-13
52	DON-38	Äthiopien	66	84	58	182	231	147	171	186	149	175	176	181	203	213	217	DON-38
53	INF-38	Sudan	66	84	58	174	231	169	201	186	149	175	208	181	203	191	209; 217	INF-38
54	DON-29	Israel	66	84	58	170	239; 241	163; 175	203	196	147	177	176	181	199	199	209; 225	DON-29
55	INF-01	Tunesien	62	82	98	172	243	147	177	178	147	175	192; 194	189	185	205	213	INF-01
56	INF-37	Spanien	62	82	98	172	241	147	179	176	147	175	196; 198	189; 195	181	213	211	INF-37

3.5 Ermittlung der Populationsstruktur mit Hilfe der STRUCTURE-Software

Für die Zuordnung der untersuchten Stämme zu unterschiedlichen Populationen wurde die Methode der Bayesischen Statistik verwendet, bei der die Wahrscheinlichkeit anzunehmender Populationen anhand der Allelfrequenzen in verschiedenen Loci und Isolaten ermittelt wird. Um die Anzahl der Populationen (K) zu bestimmen, wurden 10 unabhängige Läufe mit K 1 bis 10 durchgerechnet. Nach der Berechnung von \ln , der wahrscheinlichen Anzahl sich ergebender Populationen, entspricht die optimale Anzahl von Populationen dem K , bei dem die Kurve das Plateau erreicht. In diesem Fall befindet sich das Maximum oder auch Plateau der Kurve bei $K=6$ (Abb. 7).

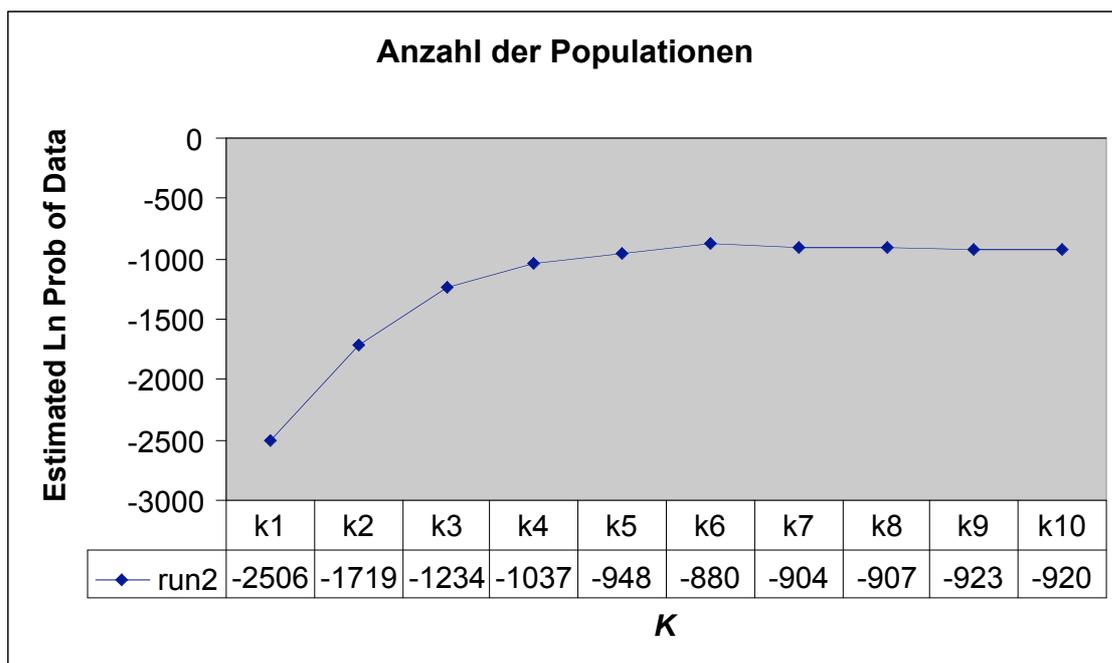
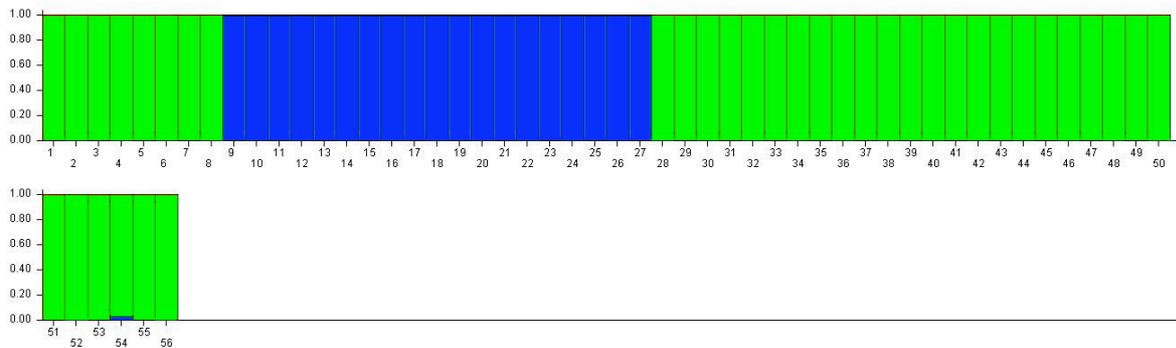


Abbildung 7: Anzahl der Populationen errechnet mit Hilfe der Bayesischen Statistik

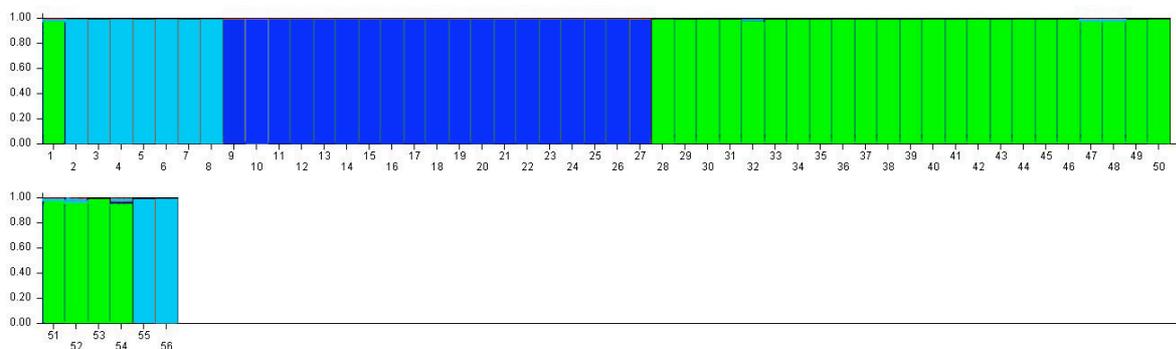
K gibt die Anzahl der Populationen an, \ln ist die für die jeweilige Anzahl von Populationen ermittelte Wahrscheinlichkeit.

Die aus der Structure-Analyse resultierenden sechs Populationen korrelieren weitestgehend mit ihrer geographischen Herkunft und sind wie folgt benannt: **I** (Indien; 19 Isolate), **II** (Kenia/Indien; 7 Isolate), **III** (Ostafrika 1; 20 Isolate), **IV** (Ostafrika 2; 6

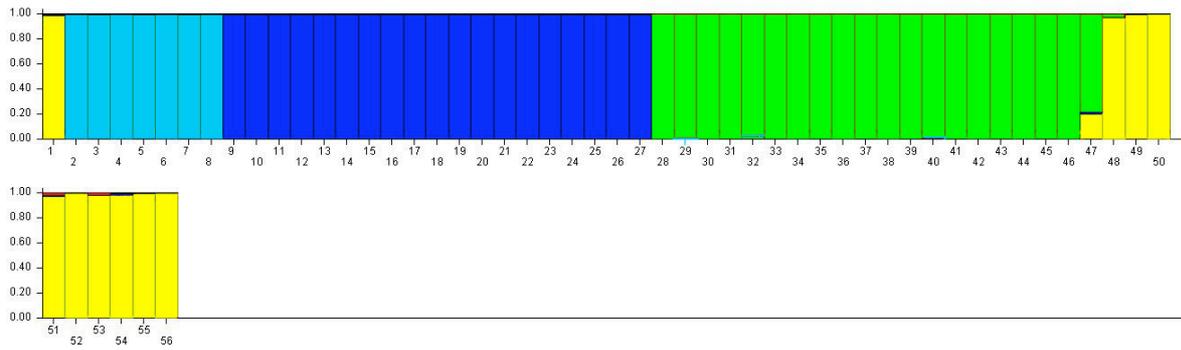
Isolate), **V** (China, Israel; 2 Isolate) und **VI** (*L. infantum*; 2 Isolate). Die Ergebnisse für $K = 1$ bis $K = 6$ wurden in Abbildung 8 dargestellt (nachfolgend). Die Anordnung der Stämme von links nach rechts entspricht ihrer Auflistung in Tabelle 8 bzw 9. Bei $K = 1$ (Daten nicht dargestellt) sind alle Stämme einheitlich rot dargestellt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Separation stattfindet.



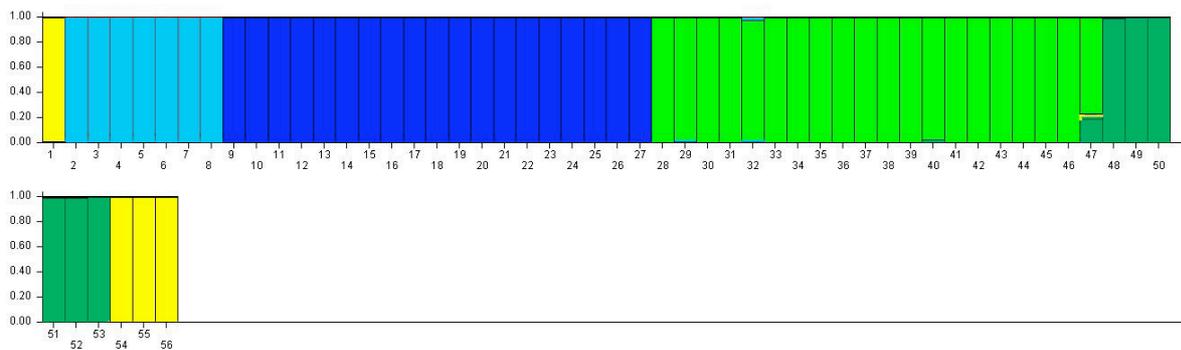
K = 2: Die Population I (blau) bestehend aus indischen Stämmen spaltet sich von einer zweiten Population (grün) ab, die aus allen übrigen Stämmen besteht.



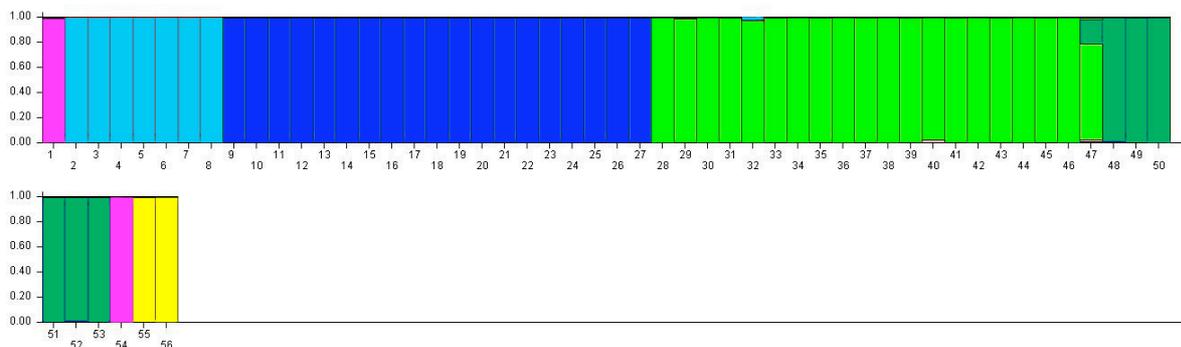
K = 3: Die Gruppe II (hellblau), die fünf kenianische, zwei indische und die zwei mediterranen *L. infantum* Stämme enthält wird von der grünen Population abgetrennt. Interessanter Weise wird ein indisches Isolat weder bei $K = 2$ noch bei $K = 3$ einer indischen Population zugeordnet (Abb.8 Nr.28, don-44).



K = 4: In Durchlauf 4 werden die Isolate aus Israel und China, fünf sudanesische, ein äthiopischer Stamm und die mediterranen Stämme in eine neue Population (gelb) eingeordnet.



K = 5: In K5 separiert sich eine vierte Population (dunkelgrün), bestehend aus fünf sudanesischen und einem äthiopischen Stamm von den *L. infantum* Stämmen des Mittelmeergebietes und den Isolaten aus China und Israel (gelb).



K = 6: Hier spaltet sich der chinesische und israelische Stamm (pink) von der mediterranen *L. infantum* Population VI ab

Abbildung 8: Veranschaulichung der Populationsbildung mittels STRUCTURE

Gezeigt ist K1 bis K = 6 aus Durchlauf 2.

Jedes Isolat ist durch eine farbliche Bande einer bestimmten Population repräsentiert

(**Population I**, **Population II**, **Population III**, **Population IV**, **Population V**, **Population VI**). Dünne schwarze Linien trennen die Individuen voneinander. Nummern sind den Isolaten wie in Tabelle 8 und 9 zugeordnet.

Bei $K = 7$ werden schließlich die Isolate aus Israel und China unterschiedlichen Populationen zugeordnet. Aufgrund der zu geringen Stammanzahl ist diese Aussage aber nicht zuverlässig und $K = 7$ nicht dargestellt. Zudem geht aus der Abbildung 7 eine Populationsgröße von 6 Gruppen hervor. Bemerkenswert ist, dass sich das Isolat MHOM/IN/83/AG83 (Don-44) aus Indien zu keiner Zeit von der Gruppe Ostafrika 1 abspaltet. Die *L. infantum* Isolate aus Afrika und dem Mittelmeergebiet bilden keine einheitliche Population. Die sudanesischen und äthiopischen Stämme von *L. infantum* gehören zusammen mit *L. archibaldi* und *L. donovani* aus der gleichen Region entweder zur Gruppe III oder IV, während die *L. infantum* Stämme aus Tunesien und Spanien eine separate Population formen. Interessanter Weise gruppieren sich Stämme aus Kenia und Indien gemeinsam in einer Population, trotz der großen geographischen Distanz zwischen diesen beiden endemischen Gebieten.

3.6 Bestimmung der genetischen Distanz innerhalb und zwischen den Populationen anhand von Mikrosatellitenvariationen

Für die untersuchten Isolate wurde die genetische Distanz mit den Methoden Delta mu square genetic distance *Ddm* (Goldstein 1995) und Proportion of shared alleles *Dps* (Bowcock 1994) ermittelt. Die Berechnungen der genetischen Distanz basieren entweder auf der Theorie eines schrittweisen Mutationsprozesses (*Ddm*), bei dem davon ausgegangen wird, dass Mikrosatelliten über den Zugewinn oder Verlust von ein oder zwei Repeats schrittweise mutieren oder auf dem klassischen „infinite allele“ Mutationsmodell (*Dps*), bei dem jede Mutation ein neues nachweisbares Allel hervorbringt. Deka (1995) konnte zeigen, dass Mikrosatelliten nicht strikt dem schrittweisen Mutationsprozess folgen. Aus diesem Grund wurden beide Analysen durchgeführt und miteinander verglichen. Dendrogramme wurden mit Unweighted Pair

Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA, Sneath 1973) und Neighbor Joining (NJ, Saitou 1987) mittels PAUP- Software erstellt.

Im mittels Dps erstellten Neighbour Joining Dendrogramm (Abb. 9, übrige Daten nicht dargestellt) zeichnen sich zwei große Populationen ab, die aus jeweils zwei und drei Subpopulationen bestehen. Die Subpopulationen **I** und **II** bilden eine Hauptgruppe, die Subpopulationen **III**, **IV** und **V** die zweite. Die mediterranen *L. infantum* Stämme, als nächste Verwandte der *L. donovani*, wurden als Außengruppe definiert und bilden die Gruppe **VI**. Die Zugehörigkeit der Isolate zu den einzelnen Populationen entspricht weitestgehend der Einteilung durch STRUCTURE (Abb: 8). Auffällig ist die enge Beziehung von 15 indischen Isolaten in der **Population I** zueinander, die alle an einer vertikalen Achse angeordnet und somit identisch zu sein scheinen. Beachtlich ist, dass zwei indische und fünf kenianische Isolate gemeinsam die **Population II** bilden. Trotz unterschiedlicher Methoden und Berechnungen, ändert sich die Zugehörigkeit des Stammes MHOM/IN/83/AG83 (DON-44) zur **Population III** nicht. Die PKDL-Isolate sind über verschiedene Cluster verteilt. Die afrikanischen Isolate befinden sich in der **Population III** und der **Population IV**, und zwar unabhängig davon, ob sie mittels Isoenzymanalyse den Arten *L. archibaldi*, *L. infantum*, oder *L. donovani* zugeordnet worden waren. Diese Gruppierungen werden auch durch die UPGMA- Dendrogramme gestützt (Bäume nicht dargestellt).

Die UPGMA Analyse unterscheidet sich hauptsächlich in der Anordnung einzelner Stämme innerhalb der Populationen. Zudem sind die mediterranen *L. infantum* Isolate als eigenständige Gruppe zwischen der **Population II** und der **Population III** eingeordnet. Wählt man die NJ Methode ohne eine Außengruppe zu definieren, ordnen sich die mediterranen *L. infantum* Stämme ebenfalls zwischen **Population II** und **III** ein (Abbildung 10). In der Abbildung 10 sind zusätzlich zu den Isolatkennungen die MON Typen gezeigt. Während die Dendrogramme des Dps basierten Modells mit dem Programm STRUCTURE gut übereinstimmen, werden durch das Ddm basierte Modell (Daten nicht dargestellt) die Isolate don-11 und don-29 in die Population IV eingeordnet. Die Isolate don-46, don-13 und inf-38, die im Dps- Modell in der Population IV dargestellt sind, werden im Ddm in die Population III eingeordnet. Don-3 und don-4 aus Population II im Dps Modell bilden im Ddm Modell eine eigene Population.

Das NJ Dps Dendrogramm wurde statistisch mit Hilfe einer Bootstrapanalyse evaluiert. Die Analyse wurde mit 1000 Bootstraps berechnet. Die mediterranen *L. infantum* Isolate

fungierten dabei als Außengruppe. Dargestellt ist der Consensus Me Neighbor Joining Baum der Dps Methode als Phylogramm. Die Separation der **Population I** und der **Population II** ist mit Bootstrapwerten von 100% hochsignifikant. Isolate aus Ostafrika (**Population III** und **Population IV**) bilden Cluster, die durch Bootstrapwerte von 72% bzw. 50% unterstützt werden. Die **Population V** ist mit Bootstrapwerten von 54% am geringsten statistisch abgesichert (Abb.9). Die definierten Populationen des NJ Baums werden durch die in STRUCTURE ermittelten identischen Populationen gestützt.

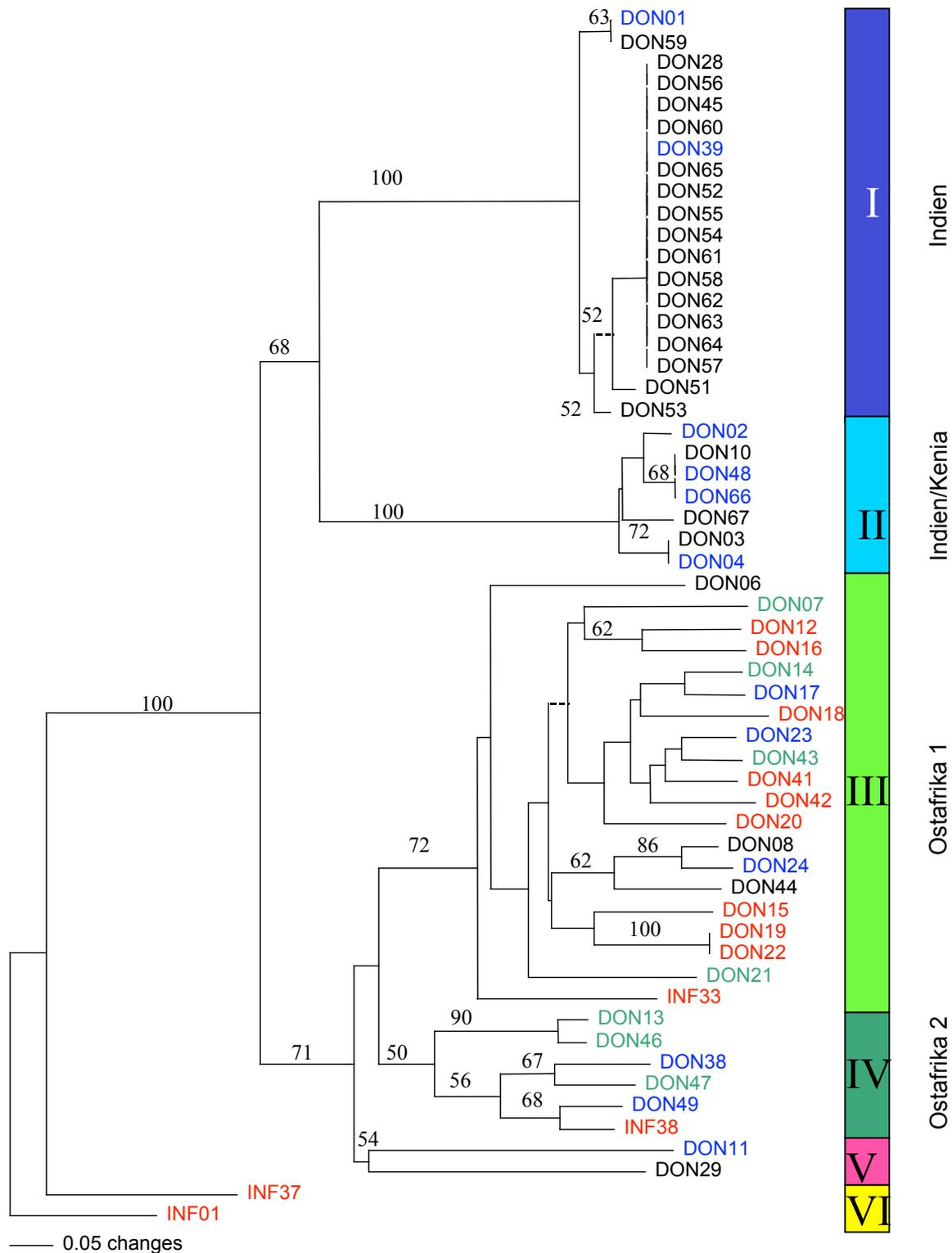


Abbildung 9: Phylogenetische Beziehungen zwischen *Leishmania* Isolaten des *L. donovani* Komplex unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels Dps erstelltem NJ Dendrogramm.

Die statistische Relevanz der Gruppierungen wurde durch eine Bootstrap-Analyse geprüft. Nur Bootstrap-Werte höher als 50% sind in dem Dendrogramm angezeigt. Zuordnung durch die Isoenzymanalyse: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. archibaldi*. **V**: China /Israel; **VI**: Mediterrane *L. infantum* Stämme

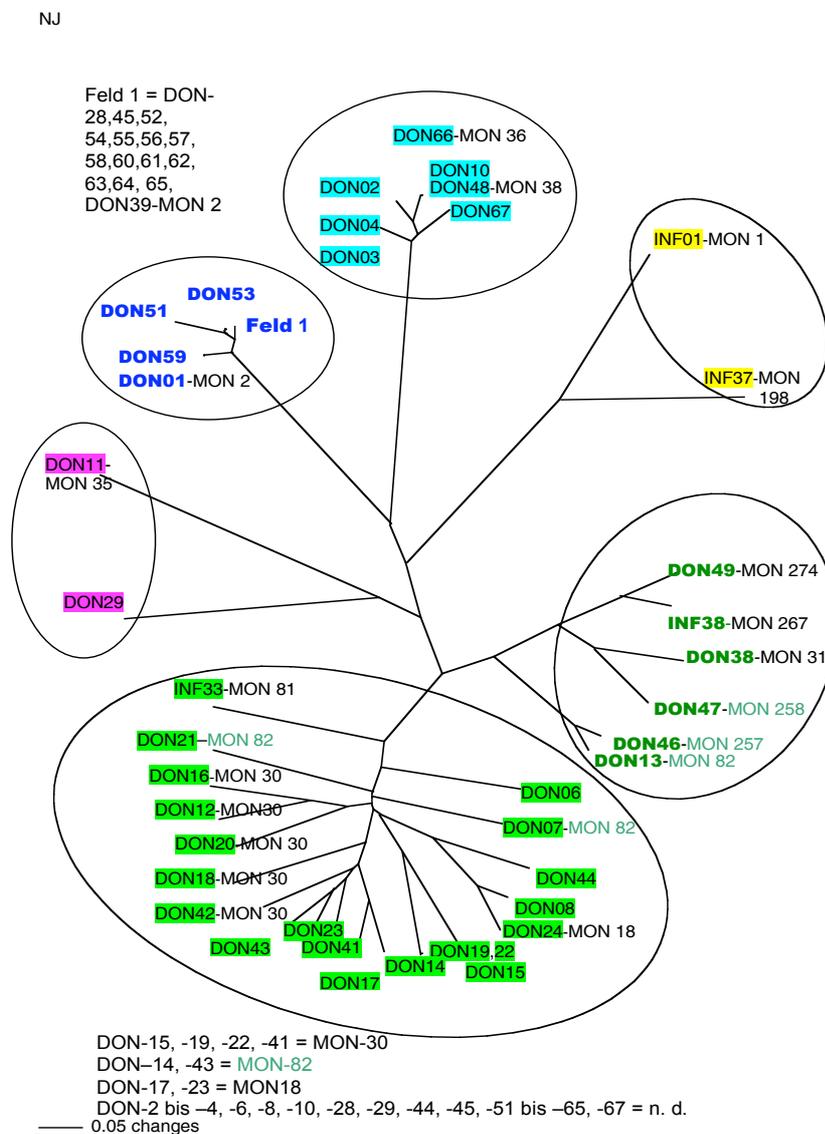


Abbildung 10: Unrooted NJ Baum erhalten durch die Berechnung der Dps-Distanz.

Feld 1 enthält die Mehrzahl der indischen Stämme aus der Population I. Kreisfelder betonen die Populationen.

Farbliche Kennung der Populationen wie in Abbildung 9, zugehörige MON Typen neben den Isolatzbezeichnungen - MON 82 entspricht *L. archibaldi*.

3.7 Räumliche Darstellung der Isolate zueinander mittels der Genetix-FC-Analyse

Das Genetix Programm, das auf dem Vergleich unterschiedlicher Allele beruht, nimmt die Unterteilung der Stämme in vier eindeutige Gruppen vor, wobei die Isolate graphisch aufgrund ihres ähnlichen Allelstatus räumlich dargestellt werden. In Abbildung 11 ist die dreidimensionale Verteilung der Isolate gezeigt. Hiernach stehen die **Population III**, **Population IV** und **Population V** in relativ enger Beziehung zueinander, während die **Population I** und **Population II** genetisch etwas weiter voneinander entfernt zu sein scheinen. **Population VI** dagegen ist genetisch von den anderen Populationen isoliert. Schaut man sich die Gruppen einzeln an, fällt auf, dass die **Population I**, bestehend aus 19 indischen Isolaten, nur aus ein bis zwei Kästchen besteht, was die These der Identität aus Abbildung 9 unterstützt. **Population II** umfasst sieben Isolate, die aber nur durch drei Kästen dargestellt sind; auch hier scheinen identische Isolate vorhanden zu sein. Der chinesische Stamm wurde zur besseren Anschauung in Magenta (weiter rechts im Bild) und der israelische Stamm in Pink dargestellt. Auch in dieser Darstellung kann keine Korrelation zwischen Subpopulationen und der klinischen Krankheitsausprägung (VL versus PKDL) beobachtet werden.

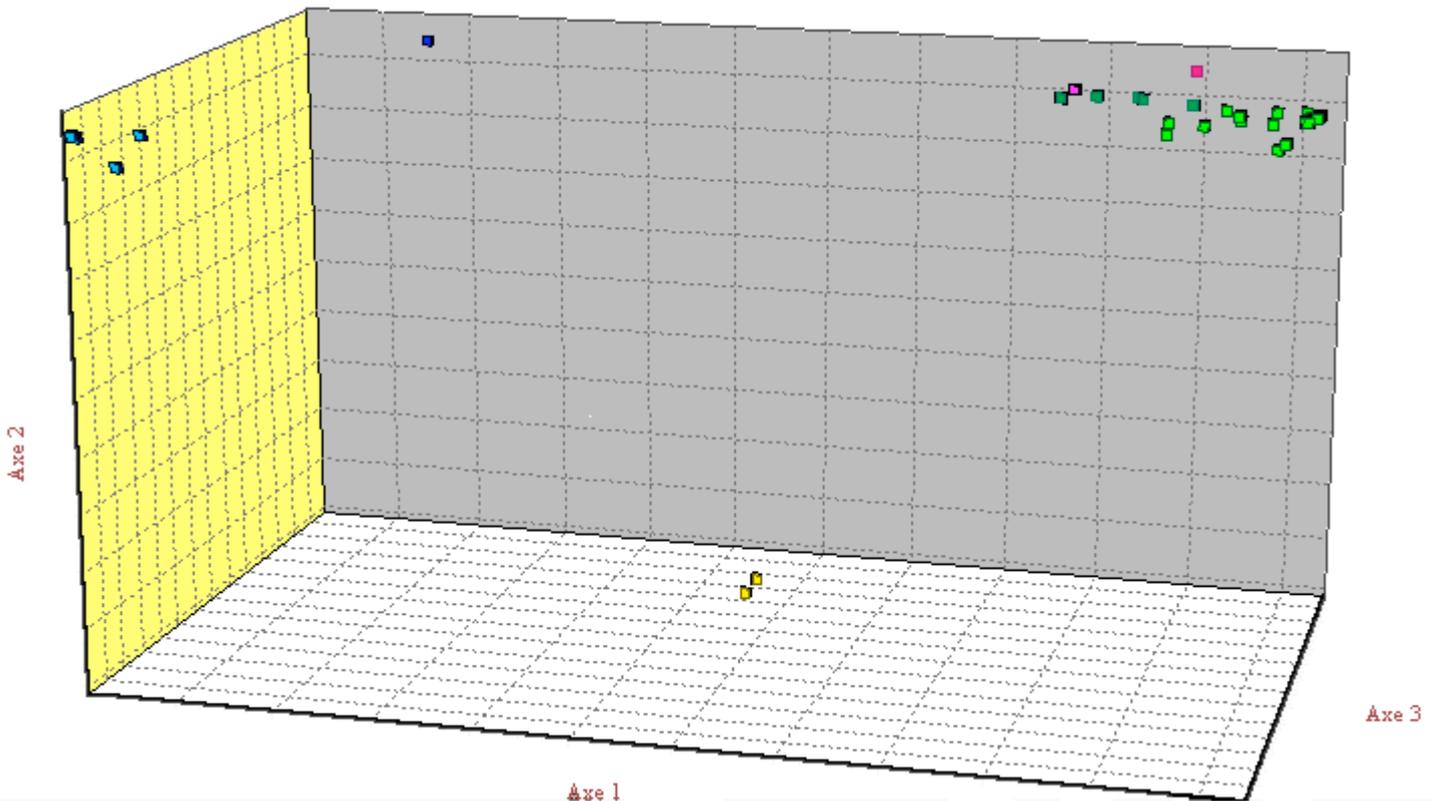


Abbildung 11: Dreidimensionale FC-Analyse

Auf die Beschriftung wurde zur besseren Übersicht verzichtet. Farben entsprechen den Gruppen I-VI wie in STRUCTURE und dem Phylogramm (**Population I**, **Population II**, **Population III**, **Population IV**, **Population V**, **Population VI**).

3.8 Charakterisierung der Populationen mit Hilfe des Microsatellite Analyser Programms

Die genetische Differenzierung zwischen den Populationen wurde durch F_{st} -Werte mit den korrespondierenden p-Werten im MSA Programm untersucht.

Der höchste F_{st} -Wert lag bei 0.95 zwischen der Population I (Indien) und Population II (Indien und Kenia/Indien). Die geringsten F_{st} -Werte von 0.36 wurden zwischen der Population III und V (China und Israel) beobachtet. Alle F_{st} -Werte sind > 0.25 und somit Ausdruck eines sehr hohen Grades an genetischer Divergenz zwischen den Populationen.

Tabelle 10 gibt Auskunft über die F_{st} -Werte zwischen den Populationen, p war bei jeder Berechnung mit $<0,01$ hoch signifikant. In der Tabelle 11 sind die Populationen V und VI nicht dargestellt, da die Isolatanzahl zu gering ist.

Tabelle 10: F_{st} Werte für die identifizierten Populationen

<i>Fst-values:</i>	<i>Pop1</i>	<i>Pop2</i>	<i>Pop3</i>	<i>Pop4</i>	<i>Pop5</i>	<i>Pop6</i>
Pop1	0	0.945	0.745	0.866	0.904	0.933
Pop2		0	0.669	0.759	0.795	0.824
Pop3			0	0.408	0.358	0.548
Pop4				0	0.393	0.579
Pop5					0	0.391

Tabelle 11: Parameter für die genetische Diversität der Populationen

Genetische Diversität basiert auf der Analyse von 15 Mikrosatellitensequenzen.

<i>Population</i>	<i>Herkunftsland</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>Durchschnittliche Allelzahl</i>
I	Indien	19	0,133	0,004	0,023	1,2
II	Indien, Kenia	7	0,133	0,000	0,050	1,2
III	Sudan, Äthiopien	20	0,800	0,293	0,293	3,5
IV	Sudan, Äthiopien	6	0,667	0,144	0,144	1,9

N , Anzahl der Isolate pro Population; P , Anteil polymorpher loci; H_o , beobachtete Heterozygotie; H_e , erwartete Heterozygotie, die durchschnittliche Allelzahl berechnet sich aus der Summe der Allele pro Population dividiert durch die Anzahl der Marker

Um die genetische Diversität zu beurteilen, wurden P , H_e , H_o und die durchschnittliche Allelzahl der 15 Mikrosatellitenmarker innerhalb jeder Population ermittelt. Die durchschnittliche Allelzahl beträgt zwischen 1,2 für Population I (Indien) und 3,5 für Population III (Ostafrika 2). Der Wert für den Anteil polymorpher Loci ist für die Populationen I und II am niedrigsten (0,133) und am höchsten für die Population III (0,800). Die Werte für die erwartete Heterogenität (H_e) unterscheiden sich mit 0,023 für Population I signifikant von der Population III mit H_e 0,293. Die genannten Werte deuten darauf hin, dass die Population I die Population mit der geringsten und die Population III die mit der größten Diversität ist. Bei den indischen Stämmen wurde fast ausschließlich nur ein einziges Allel (99,6%) gefunden. Heterozygotie konnte in Population I nur an einem Locus (LIST 7033) bei einem Isolat (Don-53) festgestellt werden. Innerhalb der

afrikanischen Stämme aus Sudan und Äthiopien wurden in den Populationen III und IV zusammen 26,9% Doppelallele detektiert.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Populationsstrukturen innerhalb der Art *L. donovani*. Dafür sollten die genetischen Beziehungen verschiedener Leishmanien-Isolate, vor allem aus den zwei wichtigsten geographisch unterschiedlichen endemischen Regionen in Asien und Afrika, geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden für 56 Stämme Längenpolymorphismen in insgesamt 15 Mikrosatellitensequenzen nachgewiesen und mittels populationsgenetischer Methoden analysiert, die auf der Anwendung der Bayesischen Statistik bzw. der Berechnung unterschiedlicher genetischer Distanzen beruhen.

4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker und der Isolate

4.1.1 Mikrosatellitenmarker

In dieser Arbeit wurden 15 polymorphe Mikrosatellitenmarker ausgewählt, um eine populationsgenetische Studie zur Variabilität von *L. donovani* Stämmen unterschiedlicher Herkunft durchführen zu können. Zur Klärung der intraspezifischen Variabilität verschiedener Leishmanienspezies ist es notwendig Stammunterschiede nachweisen zu können. Der Vergleich der Sequenzen von Mikrosatelliten hat dabei den entscheidenden Vorteil, dass man mit dieser Methode besser zwischen verschiedenen Isolaten diskriminieren kann als mit anderen bisher beschriebenen Methoden. Das gilt auch für Stämme innerhalb einer Spezies. Ein ausreichend groß gewählter Satz von Mikrosatellitenmarkern sollte somit die tatsächliche Verwandtschaft von Stämmen innerhalb einer Spezies widerspiegeln. Zudem basieren die Daten auf Unterschieden in der DNS Sequenz und können daher gut zwischen verschiedenen Laboratorien verglichen werden. Die Etablierung von Datenbanken vereinfacht zusätzlich den Datenaustausch. Insgesamt 12 der in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatellitenmarker wurden von Jamjoom (2002b) für Analysen im *L. donovani*-Komplex entwickelt. Weitere drei Mikrosatellitenmarker wurden ursprünglich von Schwenkenbecher (2004) für *L. tropica* entwickelt, konnten aber in dieser Arbeit verwendet werden, da sie ebenfalls polymorph für *L. donovani*- und *L. infantum*-Stämme waren.

Aufgrund der Homoplasie von Mikrosatelliten ist es wichtig, mindestens 10 unabhängige Marker für populationsgenetische Studien auszuwählen. Wie bereits früher

beschrieben, führt das Slippage der DNS-Polymerase während der Replikation der Mikrosatelliten-Sequenzen zu einer Verlängerung oder Verkürzung der jeweiligen repetitiven Sequenzen; die Tendenz geht in der Evolution aber eher in Richtung der Verlängerung. Die Entstehung zu langer Mikrosatelliten wird allerdings durch das MMR-System oder die 3'-5' Exonuklease-Aktivität der Polymerase verhindert (Gragg et al. 2002). Das kann zur Folge haben, dass Stämme trotz großer genetischer Distanz, Mikrosatelliten gleicher Länge aufweisen. Grund dafür ist die jeweilige Phase, in der sich die entsprechende Sequenz befindet. Während sich der Mikrosatellit in einem Organismus in der Phase des Repeatzugewinns befindet, kann der Mikrosatellit in dem anderen Individuum in der Phase des Repeatverlustes sein. Das Phänomen der Homoplasie verzerrt die auf der Mikrosatellitenanalyse basierenden taxonomischen Verhältnisse und macht die Verwendung von mindestens 10 unabhängigen Markern für populationsgenetische Analysen und taxonomische Studien erforderlich (Ruzzante 1998).

Von Nachteil ist auch, dass die bisher für *Leishmania* publizierten Mikrosatelliten-Marker weitgehend speziesspezifisch sind. Die im Rahmen des *L. major*-Genomprojekts veröffentlichten Sequenzen können somit nicht ohne weiteres für andere Leishmanienarten genutzt werden. Es wurden aber bereits ausreichend große Sätze von Mikrosatellitenmarkern für Analysen innerhalb *L. tropica*, *L. donovani* und *L. infantum* (Schwenkenbecher et al. 2004, Jamjoom et al. 2002b, Bulle et al. 2002, Ochsenreither et al., 2006) entwickelt, die zumindest teilweise auch für andere Arten polymorph sind.

4.1.2 Isolate

Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Diskriminierung afrikanischer und indischer *L. donovani* Stämme. Im Hinblick darauf wurden 52 Isolate aus den Regionen Sudan, Äthiopien, Kenia und Indien ausgewählt, die über einen Zeitraum von 40 Jahren gesammelt wurden. Für Vergleichszwecke wurden außerdem jeweils ein Stamm aus China und aus Israel sowie zwei Stämme aus dem Mittelmeergebiet (Spanien und Tunesien) untersucht. Bei den Mittelmeerstämmen handelt es sich um *L. infantum* Isolate, die als Außengruppe mitgeführt wurden. Aus der Region Sudan/Äthiopien wurden Isolate der Arten *L. donovani* (8 Isolate), *L. infantum* (10 Isolate) und *L.*

archibaldi (7 Isolate) analysiert und ausgewertet. Außerdem wurden Isolate von verschiedenen Krankheitsbildern ausgewählt. Von den Patienten waren 43 an VL, 7 an PKDL und einer an CL erkrankt. Ein Stamm (Inf-37) wurde von einem HIV/*Leishmania* koinfizierten Patienten isoliert. Das Isolat Don- 49 stammt von einer caninen Leishmaniose.

4.2 Nachweis der Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen

Mikrosatellitenfragmente lassen sich mittels verschiedener Verfahren nachweisen.

Eine Möglichkeit sind Polyacrylamidgel- oder MetaPhor-Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Bestimmung der Fragmentgröße mit Hilfe von Softwareprogrammen wie BioNumerics. Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse mit dem Kapillarsequenzierer unter Nutzung des Fragment-Analyse-Tools. Die Vorteile der Kapillarsequenzierer gegenüber der PAGE sind vielfältig. Neben der enormen Zeitersparnis zählen dazu vor allem die Möglichkeit, einen großen Satz an Mikrosatelliten zur gleichen Zeit zu analysieren, und der im Vergleich zur PAGE geringere Arbeitsaufwand. Um Kosten zu reduzieren, können pro Kammer einer 96-Well-Platte unterschiedlich große Marker und zusätzlich verschiedenfarbig markierte Fragmente eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu kann pro Geltasche eines Polyacrylamidgels nur ein PCR-Produkt aufgetragen werden. Des Weiteren können die erhaltenen Daten der Kapillarelektrophorese direkt gespeichert werden. Die Aufbewahrung der Gele entfällt somit. Ist die Methode erst einmal etabliert, fällt auch die Auswertung der Daten leicht. Ein Problem bei der Auswertung der Daten nach Auftrennung sowohl in der PAGE als auch in der Kapillarelektrophorese ist das Auftreten von A'-Überhängen und Stotterbanden. A'-Überhänge entstehen durch die Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, die häufig während der PCR-Reaktion einen Adeninrest an das PCR-Produkt anlagert und zwar unabhängig von der Sequenz am 3'-Ende des Amplifikats.

Die Stotterbanden entstehen durch Slippage, wobei es zu einer kurzen Dissoziation des Templatestranges und des 3' Ende des Primers und einer anschließend versetzten Anlagerung der Polymerase kommt. Das Ergebnis ist eine extra Schleife im Template- oder Primerstrang, was zu einem Repeatverlust oder Repeatzugewinn führt und entsprechend sichtbar wird. Ein weiterer Nachteil des Kapillarsequenzierers ist die

begrenzte Möglichkeit der Auftrennung von sehr kleinen Fragmenten. Einerseits ist es gut, die flankierenden Sequenzen so klein wie möglich zu halten, weil dann die Gefahr, dass Insertionen bzw. Deletionen in diesen Bereichen das Ergebnis verfälschen, minimiert wird. Andererseits stößt man mit sehr kleinen Fragmenten an die Grenzen der Auftrennung im Kapillarsequenzierer, was zumindest teilweise durch den Einsatz geeigneter Standards verbessert werden könnte. Die aufwendige Herstellung der Polyacrylamidgele und deren Auswertung mittels BIONUMERICS-Software konnte somit nicht vollständig umgangen werden.

4.3 Sicherung der Ergebnisse

Die Polymorphismen in den Mikrosatellitensequenzen wurden für alle in dieser Studie untersuchten Stämme unter Anwendung der Bayesischen Statistik (Structure) sowie mit unterschiedlichen distanzbasierten Methoden (Microsat, Genetix) ausgewertet und sechs Populationen zugeordnet. Bei allen drei Analysen, wurden die Stämme in dieselben definierten Populationen gruppiert. Die statistische Relevanz wird durch den niedrigen p-Wert ($<0,01$) und die sehr hohen F_{st} Werte ($>0,25$) gestützt.

F_{st} ist ein Maß zur genetischen Differenzierung zwischen Subpopulationen. Er beschreibt als Fixierungsindex den Grad der Homozygotie, als Folge von Inzucht, innerhalb einer Subpopulation. Dabei werden folgende Richtlinien zur Wertung des F_{st} zugrunde gelegt (Hartl et al. 1997).

- 0 – 0,05: Geringe genetische Divergenz
- 0,05 – 0,15: mittlere genetische Divergenz
- 0,15 – 0,25: große genetische Divergenz
- $F_{st} > 0,25$: sehr große genetische Divergenz

$F_{st} = 0$ alle Subpopulationen weisen die gleichen Allelfrequenzen auf.

$F_{st} = 1$ alle Subpopulationen weisen unterschiedliche Allele auf.

4.4 Beziehungen zwischen den afrikanischen und indischen Stämmen

Während in Asien die Übertragung von *L. donovani* rein anthroponotisch mit dem Menschen als alleinigem Reservoir zu erfolgen scheint, wird diese Frage in Afrika kontrovers diskutiert. Der eigentliche Reservoirwirt wurde bislang nicht gefunden. Es besteht jedoch eine hohe Ansteckungsgefahr in sudanesischen Nationalparks und infizierte Sandfliegen wurden auch in unbesiedelten Gebieten gefunden, was für eine zoonotische Übertragung spricht. Eine rein anthroponotische Transmission wurde auch kürzlich durch Untersuchungen an sudanesischen Hunden in Frage gestellt, bei denen Dereure (2003) die gleichen Isoenzymmuster wie bei Menschen fand. In Indien wird *L. donovani* vom synanthropen Vektor *Phlebotomus argentipes* übertragen. Im Sudan ist *Phlebotomus orientalis* Vektor von *L. donovani* und in Kenia und Äthiopien erfolgt die Übertragung von *L. donovani* durch *Phlebotomus martini*.

Die *L. donovani* Stämme aus Ostafrika unterscheiden sich von denen aus Indien durch eine höhere Variabilität, wie aus der größeren Anzahl von Allelen und dem häufigeren Auftreten heterozygoter Allelkombinationen deutlich wird. Die große genetische Differenz zwischen den *L. donovani* Populationen aus Afrika und Asien wird durch die hohen F_{st} -Werte gestützt (Tabelle 10 in 3.8). Auch die Bootstrap-Werte von 71% und 68% im Neighbor Joining Phylogramm und die frühe Auftrennung der beiden Populationen in der STRUCTURE Analyse ($K = 2$) sprechen für die Verschiedenheit dieser beiden Stammgruppen, was sich auch in der Klinik und der Epidemiologie der Krankheit widerspiegelt. (Zijlstra et al. 2003) (Tab.: 12). Die afrikanischen und indischen *L. donovani* Stämme unterscheiden sich in ihrem Resistenzverhalten, was Auswirkungen auf die Therapie indischer und ostafrikanischer Patienten mit VL und PKDL hat. Die medikamentöse Behandlung indischer und ostafrikanischer Patienten mit VL und PKDL unterscheidet sich aufgrund des Resistenzverhaltens. Die Resistenz bezieht sich auf die parenterale Gabe von pentavalenten Antimonprodukten, die in Nordbihar bis zu 60% beträgt. Andere zum Teil wirkungsvollere Medikamente, wie liposomales Amphotericin B, sind für die meisten Patienten dieser Regionen zu teuer. Therapeutika zweiter Wahl haben den Nachteil gefährlicher Nebenwirkungen, besonders der Nierentoxizität (Davies et al. 2003). Im Sudan wird in der Regel 0-13 Monate nach einer VL eine PKDL beobachtet. In Indien hingegen liegt das Intervall zwischen 6 Monaten und 32 Jahren, mit einem Mittelwert von 2-3 Jahren, wobei der

PKDL im Gegensatz zu Afrika nicht unbedingt eine VL-Erkrankung vorausgegangen sein muss. Ein weiterer Unterschied zwischen afrikanischer und indischer PKDL besteht in der Häufigkeit, in der die Erkrankung auftritt (s. Tabelle 12).

Bisher ist unklar, ob die PKDL das Resultat einer wiederkehrenden Infektion durch den gleichen, durch die Therapie nicht eliminierten Erregerstamm oder einer Neuinfektion mit einem anderen Stamm ist. Außerdem stellt sich die Frage, ob die veränderte Symptomatik bei der PKDL auf Änderungen in der Immunantwort des Wirtes nach einer VL oder aber auf besonders qualifizierte Erreger zurückzuführen ist. In dieser Studie wurde keine Korrelation der Mikrosatellitenmuster zu unterschiedlichen Krankheitsbildern beobachtet. Lediglich das einzelne Isolat von einer CL (Don-06) hat innerhalb der Population III eine besondere Position inne. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, sollten in einer weiteren Studie mehr Isolate von CL Patienten aus dem Sudan analysiert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten PKDL-Isolate sind genau wie die VL Isolate über die verschiedenen Populationen verteilt. Fragwürdig ist in diesem Zusammenhang die Beziehung der PKDL-Stämme DON-18 und Don-19 zueinander. Die Isolate stammen beide von demselben Patienten, jedoch aus verschiedenen Körperregionen (El Tai et al. 2001). In der Analyse gehören sie zwar zur gleichen Gruppe, sind jedoch nicht als Klon dargestellt. Dieses Ergebnis weist auf eine Mischinfektion hin.

Tabelle 12: Vergleich von Klinik und Epidemiologie der sudanesischen und indischen PKDL (nach Zijlstra et al 2003)

<i>KLINIK und EPIDEMIOLOGIE</i>	<i>SUDAN</i>	<i>INDIEN</i>
Auftreten der PKDL unter Behandlung	Ja	Nein
Ausschlag	PN>MP>microP>M	Erythema, Induration von M, P, N
Dauer	Durchschnittlich 9,7 Monate (2-28 Monate)	Nicht bekannt
Auftreten der PKDL nach VL	50-60%	5-10%
Höchste Prävalenz in Feldstudien	4,8/100	4,8/1000
Inkubationszeit zwischen VL und PKDL	0-6 Monate	2-3 Jahre
Variationsbreite der Inkubationszeit	0-13 Monate	6 Monate- 32 Jahre
Altersverteilung	Kinder (Mittel: 6 Jahre)	Adoleszente
Spontane Heilung	Ist die Regel	Nicht berichtet, alle Fälle werden behandelt

(PN= Papulonodulös; MP= Makulopapulös; microP= Mikropapulös; M= Makulös, N= Nodulös, P=Papeln)

Die Isolate Don-41 und Don-42, die aus verschiedenen Laboren stammen, aber auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgehen, erscheinen in unserer Analyse als verschiedene Stämme. In diesem Fall ist eine Verwechslung in einem der Labore wahrscheinlich. Der Stamm Don-44 (MHOM/IN/83/AG83), der in verschiedenen Studien als indischer Referenzstamm benutzt wurde, wies in unserer Arbeit bei mehreren Wiederholungen ein für sudanesische Stämme typisches Mikrosatellitenmuster auf. Eine Verwechslung kann hier nicht ausgeschlossen werden. Eine solche Verwechslung kann weitreichende Konsequenzen haben, wenn es sich um einen Referenzstamm handelt, der z.B. für die Evaluation immunologischer Testverfahren bzw. neuer Vakzine oder Chemotherapeutika verwendet wird. In diesem Fall würden diagnostische oder therapeutische Verfahren entwickelt werden, die für sudanesische Stämme, nicht aber für indische Stämme effizient wären.

4.5 Beziehungen kenianischer und indischer Stämme zueinander

Obwohl Kenia im Norden an Sudan und Äthiopien grenzt, sind die Isolate aus Kenia (Zymodeme MON-36 und MON-37 und zwei nichtdifferenzierte Isolate) in dem Phylogramm (Abbildung 9) deutlich von den übrigen ostafrikanischen Stämmen verschieden und gehören zu der Population II. Zusätzlich finden sich in dieser Population 2 Isolate aus Indien, DON-10 (Zymodem nicht definiert) und DON-48 (MON-38). Das Cluster mit den kenianischen und indischen Isolaten ist mit Bootstrapwerten von 100% hochsignifikant. Population I und II sind verwandte Populationen und haben einen gemeinsamen Ursprung, der mit 68% Bootstrapwerten validiert ist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Isoenzymanalyse, bei der die kenianischen Stämme gemeinsam mit den indischen MON-2 (DON-39, DON-01) und MON-38 Isolaten dargestellt werden. Als Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse wurde das indische MON-2 Isolat aber der Population I zugeordnet.

Dass es sich in Kenia um eine andere *L. donovani*-Population als in Sudan/Äthiopien handelt, lässt sich auch klinisch nachvollziehen. In Kenia gibt es im Gegensatz zum Sudan Fälle, bei denen sich eine PKDL erst 30 Jahre nach einer VL entwickelt hat (Zijlstra et al. 2003). Um die Beziehung kenianischer und indischer Isolate zueinander verifizieren zu können, reicht die Zahl der untersuchten Stämme jedoch nicht aus. Es wäre dringend erforderlich, mehr Isolate aus beiden Regionen zu untersuchen. Möglicherweise sind unterschiedliche Vektoren eine Ursache für die hier aufgezeigten Unterschiede. Im Sudan ist es *Phlebotomus orientalis*, in Kenia *Phlebotomus martini*. Bei Untersuchungen zur Transmission von *L. tropica* in Israel wurden verschiedene Vektoren mit dem Vorkommen genetisch unterschiedlicher Parasiten in einem geographisch eng begrenzten Gebiet in Verbindung gebracht (Jacobson et al. 2003). Ob ähnliche Ursachen für das Auftreten distinkter *L. donovani* Populationen in Sudan/Äthiopien einerseits und Kenia andererseits verantwortlich gemacht werden können, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.6 Mikrosatellitenbasierte Taxonomie der sudanesischen *L. donovani*-Stämme

Die Analyse der Mikrosatellitenpolymorphismen zeigte, dass die Stämme aus Sudan und Äthiopien zu zwei verschiedenen Populationen, III und IV, gehören. In beiden Gruppen sind dabei sowohl *L. donovani*-, *L. archibaldi*- als auch *L. infantum*-Stämme zu finden. Unsere Ergebnisse konnten somit keine Anhaltspunkte für eine Koexistenz dieser drei Spezies des *L. donovani* Komplexes im Sudan liefern, wie es unter anderen von Pratlong (2001) vertreten wird. In allen Analysen, angefangen von den STRUCTURE- und GENETIX Analysen, bis zur Erstellung von NJ und UPGMA Dendrogrammen, basierend auf den genetischen Distanzen, bilden weder die *L. donovani*, *L. infantum* noch die *L. archibaldi* Isolate aus dem Osten Afrikas monophyletische Gruppen. Das bedeutet, dass genetisch und klinisch nicht zwischen den drei Spezies als Auslöser der viszeralen Leishmaniose und der PKDL unterschieden werden kann.

Dieses Ergebnis widerspricht dem der Isoenzymanalyse, mit der die ostafrikanischen Isolate den drei Spezies *L. donovani*, *L. archibaldi* und *L. infantum* zugeordnet wurden (Pratlong et al. 2001, Dereure et al. 2003, Rioux et al. 1990). Andere DNS-basierte Methoden, wie die PCR-RFLP-Analyse der gp63-Region, die Sequenzanalyse anonymer DNS-Marker und die Sequenzierung des ribosomalen Spacers ITS1, haben die Existenz von *L. archibaldi* als eigenständige Spezies und von sudanesischen *L. infantum* Stämmen ebenfalls in Frage gestellt (Mauricio et al. 2001, Lewin et al. 2002, Kuhls et al. 2005). Das von Castellani und Chalmers 1919 eingeführte Taxon *L. archibaldi* wurde von Rioux et al. (1990) aufgrund eines einzigen neu entdeckten Zymodems (MON-82) als Subspezies innerhalb des *L. donovani* Komplex behandelt und nach der Entdeckung zwei weiterer Zymodeme (MON-257 und MON-258) von Pratlong et al. (2001) als eigenständige Spezies angesehen. Isolate aus dem Sudan und Äthiopien wurden demnach je nach ihrem Isoenzymprofil des GOT₁ und GOT₂ Gens entweder als *L. donovani* (Profil 100), *L. infantum* (Profil 110) oder *L. archibaldi* (Profil 113) klassifiziert (Rioux et al. 1990, Pratlong et al. 2001). Jamjoom et al. (2004) fand anhand der Sequenzierung des ASAT-Gens (in der Isoenzymanalyse GOT) heraus, dass sich sudanesische *L. donovani* und *L. infantum* nur in einem einzigen Nukleotid unterscheiden, was einen Austausch der Aminosäure Tyrosin (GOT₁₀₀, *L. infantum*) durch Aspartat (GOT₁₁₃, *L. donovani*) zur Folge hat. Ashford et al. (1992) wies

bereits darauf hin, dass die Zymodeme MON-30 (*L. infantum*), MON-18 (*L. donovani*) und MON-82 (*L. archibaldi*) aus dem Sudan vermutlich einer einzigen Population angehören und eine biologische Trennung in verschiedene Spezies oder Subspezies nicht gerechtfertigt ist. Bisher konnten keine epidemiologischen und klinischen Unterschiede für die drei Spezies im Sudan festgestellt werden. Im Rahmen der Mikrosatellitenstudie dieser Studie wurden allerdings zwei unterschiedliche genetisch isolierte Populationen in der Region gefunden.

Alle Isolate, die zu den Zymodemen MON-30 (*L. infantum*) und MON-18 (*L. donovani*) gehören, bilden zusammen mit einigen MON-82 (*L. archibaldi*) und dem einzigen MON-81 Isolat die Population III. Die neueren Zymodeme MON-257 und MON-258 (*L. archibaldi*), MON-267 (*L. infantum*) und MON-274 (*L. donovani*) (Pratlong et al. 2001) sind mit einem einzigen MON-82 Isolat in der Population IV zusammengefasst. Die Analyse der genetischen Distanz ergab ein ostafrikanisches Cluster, das mit 71% Bootstrapwerten von den anderen *L. donovani* Populationen klar differenziert ist und seinerseits aus zwei Populationen III und IV besteht. Die Unterteilung der Stämme aus dem Sudan und aus Äthiopien ist mit Werten von 72% für die Population III und mit Werten von 50% für die Population IV gut unterstützt. Auch die Ergebnisse der Bayesischen Statistik und der F-Statistik beweisen die Existenz zweier genetisch isolierter Populationen in Ostafrika.

Die Studie unterstützt daher die Forderung anderer Autoren (Jamjoom et al. 2004, Mauricio et al. 2001) nach einer Überprüfung der Taxonomie für die ostafrikanischen Vertreter des *L. donovani*-Komplexes. Dabei sollte auch untersucht werden, inwieweit die klinischen und biologischen Charakteristika der analysierten Stämme - unterschiedlicher geographischer Herkunft - mit den von uns gefundenen Populationen korrelieren.

4.7 Genetische Homogenität der indischen Population I

Die große Mehrzahl der indischen Isolate gehört zu der Population I, mit Ausnahme von zwei Isolaten, die zu der Population II gehören. 15 der 19 Isolate der Population I sind in der endemischen Region Nordbihar isoliert worden. Es ist davon auszugehen, dass 50% von den weltweit angenommenen 500.000 Neuerkrankungen an VL pro Jahr in Indien auftreten. 90% dieser Fälle werden wiederum im Norden der Region Bihar

registriert. Diese Region ist durch eine alarmierend hohe Resistenzrate auf pentavalente Antimonpräparate von 60% gekennzeichnet (Sundar et al. 2000).

In unserer Studie stellten sich die Isolate aus Bihar als eine sehr homogene und wenig polymorphe Population dar. Nur mit den zwei Markern GA6 und LIST7033 konnten bei dieser Stammgruppe Polymorphismen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob es sich bei den Biharisolaten um einen einzigen Klon handelt, was besonders im Hinblick auf die Verbreitung der Therapieresistenz von Bedeutung wäre, oder ob die Marker, die basierend auf Sequenzen eines sudanesischen Stamms entwickelt wurden, indische Stämme nicht ausreichend diskriminieren. Um dieser Frage nachzugehen, werden in unserem Labor bereits neue Marker auf der Grundlage eines indischen Stamms erprobt. Die Ergebnisse dazu stehen noch aus. Sollte die genetische Homogenität der Bihar-Stämme durch diese neuen Marker bestätigt werden, so ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Stämmen um einen aus einem „Bottleneck“ hervorgegangenen Klon und somit um eine evolutionär junge Subspezies von *L. donovani* handelt.

4.8 Ursprung und Verbreitung von *L. donovani*

Die *L. donovani* Populationen III und IV aus Ostafrika (Sudan und Äthiopien) zeichnen sich im Vergleich zur indischen Population I, die durch Stämme aus dem Endemiegebiet in Bihar gebildet wird, durch eine deutlich größere Anzahl an Allelen und eine höhere durchschnittliche Heterozygotie aus. Bei den indischen Stämmen konnte fast ausschließlich nur ein einziges Allel (99,6%) gefunden werden. Die genetische Differenz zwischen den *L. donovani* Populationen aus Afrika und Asien wird zudem, wie bereits unter Punkt 4.4 besprochen, durch die angegebenen statistischen Werte gestützt.

Diese Beobachtung, die auch schon von anderen Autoren geäußert wurde (Ashford 2000, Ibrahim 2002), weist auf einen gemeinsamen afrikanischen Ursprung von *L. donovani* hin.

Es wird eine frühe Aufspaltung der Stammgruppe aus Afrika vermutet, bei der sich ein Ast über den Rest der Welt verzweigte und der andere in Afrika verblieb (Cavalli-Sforza 2004). Die in dieser Arbeit gezeigte Populationsstruktur innerhalb des *L. donovani*-Komplexes mit einerseits klar separierten indischen und ostafrikanischen Populationen

und andererseits mit engen Beziehungen zwischen einigen indischen und kenianischen Stämmen zueinander lässt Vermutungen über die Verbreitung von *L. donovani* zu. Neben der Straße von Gibraltar gelten zwei weitere Verbreitungswege von Afrika nach Eurasien als wahrscheinlich: das Horn von Afrika und der Levantinische Korridor (Luis et al. 2004). Nach paläontologischen Vorstellungen sollen sich Afrikaner und Asiaten vor etwa 100.000 Jahren durch Migration voneinander über den Levantinischen Korridor, das ist die durch das Jordantal, Beqa´a-Ebene und Orontes-Tal gebildete nördliche Fortsetzung des afrikanischen Grabenbruchs, getrennt haben (Cavalli-Sforza 2004). Möglicherweise ist so auch *L. donovani* von Afrika nach Asien gelangt. Die Verzweigung der indischen (Population I und II) und afrikanischen (Population III und IV) Population ist mit Bootstrapwerten von 68% und 71% belegt. Die frühe Teilung der indischen Population I und II von den übrigen Populationen wird in $K = 2$ bzw. $K = 3$ des Programms STRUCTURE gestützt. Um genauere Aussagen bezüglich der Verbreitungswege von *L. donovani* treffen zu können, sollten zukünftige Studien *L. donovani* Stämme, die entlang der vermuteten Migrationsrouten isoliert wurden, einbeziehen.

Die enge Verwandtschaft der kenianischen und indischen Stämme könnte das Resultat einer Rückemigration neolithischer Farmer sein, die erst vor ca. 10.000 Jahren stattfand (Cavalli-Sforza et al. 1998). Auch zeitlich noch jüngere Ereignisse, wie Handelsbeziehungen auf afrikanischer und indischer Seite werden diskutiert (Ibrahim 2002). Im Fall der Spezies *L. infantum* wird von einer Verbreitung durch Haushunde nach Europa ausgegangen, während für *L. donovani* von einer Verbreitung durch den Sklavenhandel aus Sudan nach Indien diskutiert wird (Ashford 2000). Die in dieser Arbeit genotypisch untersuchten Stämme aus Sudan, Äthiopien und Indien unterstützen die These des afrikanischen Ursprungs und deren Verbreitung nach Indien, wobei zur Klärung der Migrationsrouten und –gründe weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

4.9 Reproduktionsmechanismus der Leishmanien

Sexuelle Reproduktion ist die typische Vermehrung in Eukaryonten. Bei Leishmanien wird aber von einer hauptsächlich klonalen Vermehrung ausgegangen, da bisher keine sexuellen Formen und Mechanismen nachgewiesen werden konnten. Es wird

allerdings immer wieder über das Vorhandensein sexueller Prozesse spekuliert, weil Leishmanien diploide Organismen sind, und sexuelle Aktivitäten unter bestimmten Bedingungen im Labor beobachtet werden konnten (Cupolillo et al. 1998). Dass sexuelle Reproduktion im Labor oder auch sporadisch *in-vivo* auftritt, ist allerdings noch kein Beweis an sich, sondern bedeutet in erster Linie, dass Leishmanien die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion noch nicht verloren haben (Tibayrenc et al. 1991). Kriterien zur Feststellung der Reproduktionsart (sexuell oder klonal) sind die Untersuchung von Assoziationen innerhalb eines Locus (Segregation) und die Untersuchung von Assoziationen zwischen den Loci (Interlokusrekombination). Reproduzieren sich Leishmanien klonal kommt es auf lange Sicht zur Anreicherung unterschiedlicher Mutationen in den einzelnen Klonen und damit zu einer Differenzierung der Klone bzw. der unterschiedlichen klinischen Ausprägungen einschließlich der Resistenz. Im Gegensatz dazu würden durch ausreichend häufige genetische Rekombinationen einzelne Mutationen im Genpool verschwinden (Tibayrenc 1998). Für die meisten Mikrosatelliten-Loci wurde jeweils nur eine einzelne Bande beobachtet, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Homozygotie in diesen Loci und damit auf eine überwiegend klonale Vermehrung von *Leishmania donovani* hindeutet. Heterozygote Allelkombinationen, die durch sexuelle Rekombination entstanden sein könnten, finden sich nur in 14% der Fälle und fast ausschließlich in den Populationen aus Ostafrika, sowie bei den mediterranen und chinesischen Stämmen. Um die Rolle klonaler und sexueller Vererbungsmechanismen klären zu können, sollten jedoch weiterführende Untersuchungen bezüglich des Reproduktionsmechanismus von *L. donovani* durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Leishmanienisolate aus Indien und Ostafrika, die mit Hilfe der Isoenzymanalyse den Arten *L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi* zugeordnet worden waren, anhand von 15 Mikrosatellitenmarkern auf ihre genetische Variabilität zu untersuchen. Zusätzlich wurden Proben von *L. infantum* aus dem Mittelmeergebiet und je ein *L. donovani* Stamm aus China und Israel in die Studie integriert. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die genetische Beziehung der Isolate im Hinblick auf die Ursprungsregion, Klinik, Taxonomie und Verbreitung geben. Zudem sollten die Relationen zwischen und innerhalb von *L. donovani* Populationen untersucht werden.

Insgesamt wurden 56 Isolate (22 aus Indien, 22 aus dem Sudan, 3 aus Äthiopien, 5 aus Kenia, 1 aus China, 1 aus Israel und 2 aus dem Mittelmeergebiet) mit 15 Mikrosatellitenmarkern nach optimierten PCR Protokollen amplifiziert. Die Isolate stammten sowohl von Patienten mit viszeraler Leishmaniose (VL) als auch von Patienten, die an der Post-Kala-Azar-dermalen Leishmaniose (PKDL) erkrankt waren. Ein Stamm wurde aus einem Patienten mit kutaner Leishmaniose (CL) isoliert und ein Patient war HIV/*Leishmania* koinfiziert. Die erfolgreiche Amplifizierung wurde mit Agarosegelen verifiziert. Anschließend wurden Längenpolymorphismen bei den Amplifikaten mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Silberfärbung oder des Kapillarsequenzierers unter Nutzung des Fragmentanalyse-Moduls sichtbar gemacht.

Die individuellen Fragmentlängen wurden je nach Distanzprogramm als Fragmentgröße in Basenpaaren oder Anzahl der Repeats in Datenmatrizen erfasst und anschließend mit den genetischen Distanzprogrammen STRUCTURE, MICROSAT und GENETIX im Hinblick auf die genetische Verschiedenheit ausgewertet. Die Nutzung des Kapillarsequenzierers für Mikrosatellitenanalysen konnte im Rahmen dieser Arbeit für *L. donovani* etabliert werden. Statistische Daten im Hinblick auf die genetische Diversität wurden mit dem Programm Microsatellite Analyser (MSA) errechnet.

Um die genetischen Beziehungen der untersuchten *Leishmania* Stämme sichtbar zu machen wurden die genetische Distanz errechnet und Phylogramme auf der Basis der Neighbor Joining Methode erstellt. Dabei zeigte sich hauptsächlich eine geographische Einteilung der Isolate in die Populationen I = Indien 1 (Region Bihar), II = Indien 2 (2 indische und 5 kenianische Isolate), III = Ostafrika 1 (Sudan und Äthiopien) IV = Ostafrika 2 (Sudan und Äthiopien), V = China/Israel und VI = *L. infantum*.

Die viel umstrittene Taxonomie in Ostafrika, wo auf der Grundlage der Isoenzymanalyse drei Spezies, *L. donovani*, *L. infantum* und *L. archibaldi*, unterschieden wurden, konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Keine der drei Spezies bildete in den Distanzanalysen einen monophyletischen Strang. Die Stämme aus Sudan und Äthiopien wurden 2 verschiedenen Populationen zugeordnet, wobei Vertreter der oben genannten Spezies in beiden Gruppen gefunden wurden. Eine Korrelation verschiedener Genotypen zur klinischen Ausprägung der Leishmaniose konnte ebenso wenig festgestellt werden. Weder PKDL noch VL Isolate bildeten eine Population. Eine Entwicklung neuer Diagnostika zur Differenzierung der drei Spezies ist somit obsolet, da sich die Spezies phylogenetisch nicht unterscheiden und bisher auch kein klinischer Unterschied festgestellt werden konnte.

L. donovani Stämme aus Ostafrika und Indien zeigen in der genetischen Distanzanalyse und in der Berechnung des MSA große genetische Unterschiede. Diese spiegeln sich auch in der Klinik und der Epidemiologie der Krankheit wider. So unterscheidet sich die medikamentöse Behandlung indischer und ostafrikanischer Patienten mit VL und PKDL vor allem aufgrund des Resistenzverhaltens gegenüber pentavalenten Antimonpräparaten der an VL erkrankten Patienten in der indischen Region Bihar. Während die VL in Indien anthroponotisch über den Vektor *Phlebotomus argentipes* übertragen wird, wird in Ostafrika von einer anthropozoonotischen Übertragung des Vektors *Phlebotomus orientalis* ausgegangen.

Die Isolate aus der Biharregion konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatellitenmarkern nur geringfügig diskriminiert werden. Es besteht in diesem Fall neben der Möglichkeit nicht ausreichend diskriminierender Marker auch die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Isolaten um einen Klon handelt, so dass alle Stämme jeweils das gleiche Allel für den jeweiligen Marker besitzen. Im Hinblick auf das große Resistenzproblem in Indien gegenüber pentavalenten Antimonprodukten sollten neue Marker entwickelt werden, um diese Stämme zu diskriminieren. Immunologisch könnte die Entscheidung, ob es sich um einen Klon handelt, entscheidend für die Entwicklung einer Vakzine sein.

Anhand der in dieser Arbeit aufgezeigten genetischen Distanz, die zwischen ostafrikanischen und indischen Stämmen besonders groß war, konnte auf einen afrikanischen Ursprung der Leishmaniose geschlossen werden. Die Verbreitung nach Indien ging somit wahrscheinlich vom afrikanischen Kontinent, vermutlich sogar aus dem Sudan, aus. Über den Weg nach Europa kann aufgrund der geringen

Stammanzahl von *L. infantum* keine Aussage getroffen werden. Auch die Verbreitung in andere Teile der Welt sollte mit größeren Datensätzen untersucht werden.

In dieser Arbeit zeigte sich auch eine enge Beziehung der kenianischen und indischen Isolate. Die Population I und II sind im NJ basierten Cladogramm als Schwesterngruppen mit Bootstrap- Werten von jeweils 100% stark unterstützt. Die Beziehung der indischen und kenianischen Stämme beruht vermutlich auf einer Wiedereinführung der Leishmanien von Indien nach Afrika vor nicht all zu langer Zeit. Die Beobachtung ähnlich hoher Intervalle vom Auftreten der VL bis zur PKDL in Kenia und Indien unterstützt die These einer Reimmigration.

Über die Populationen V und VI kann aufgrund der geringen Stammzahlen keine Aussage bezüglich Ursprung und Verbreitung getroffen werden.

Der Anteil der Doppelbanden innerhalb der untersuchten Isolate betrug 14%. Dieser geringe Anteil an Doppelbanden lässt auf eine überwiegend klonale Reproduktion der Spezies *L. donovani* schließen.

Die in dieser Studie durchgeführte genetische Analyse geographisch unterschiedlicher Leishmanienisolate stellt eine Basis zu fortführenden epidemiologischen Studien dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agrawal, S, Rai M, Sundar S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. J Postgrad Med 2005; 51: 53-7
2. Alvar J, Gutierrez-Solar B, Pachon I, et al. AIDS and Leishmania infantum. New approaches for a new epidemiological problem. Clin Dermatol 1996; 14(5): 541-6
3. Ashford RW, Seaman J, Schorscher J, Prtlong F. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systemic position of the parasites from patients and vectors. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992 ; 86: 379-380
4. Ashford RW The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30: 1269-1281
5. Barker GC. Population genetics – Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(S1): 21-4
6. Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, et al. Human mixed infection of *Leishmania* spp. And *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian area: Identification by Polymerase Chain Reaction/hybridization and Isoenzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 255-264
7. Benett LD, Shriver M, Bowcock AM. Markers and Methods for Reconstructing Modern Human History. DNA Sequence- The Journal of Sequencing and Mapping 1998; 8: 329-341
8. Bogdan C, Schönian G, Banuls AL. Visceral Leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: a case report and review of literature. Clin Infect Dis 2001; 32: 302-6

9. Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High Resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites, *Nature* 1994; 368: 455-7
10. Budowlé B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48(1): 137-44
11. Bulle B, Millon L, Bart J-M, et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3391-7
12. Cavalli-Sforza LL. The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet* 1998; 14: 60-5
13. Cavalli-Sforza LL. Stammbäume von Völkern und Sprachen. *Spektrum der Wissenschaft*. 2004; Dossier 20-7
14. Chicharro, C., Jimenez, MI, Alvar J. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(S1): 57-64
15. Cupolillo E, Grimaldi Jr. G, Momen H, Beverly SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 145-155
16. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr. G. Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Mem Ist Oswaldo Cruz* 1998; 93(5): 663-8
17. Davies CR, Kaye P, Croft S L, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *B M J* 2003; 326: 377-382
18. Dawson K J und Belkhir K. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genet Res* 2001; 78(1): 59-77

19. Dedet JP, Pratlng F, Lanotte G, Ravel C. The Parasite. Clin Dermatol 1999; 17: 261-8
20. Deka R, Jin L, Shriver MD, et al. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)n. (dG-dT)n polymorphisms in world populations. Am J Hum Genet 1995; 56: 461-474
21. Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, et al. Visceral Leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in human and dogs; host –parasite relationships. Microbes Infect 2003; 5: 1103-8
22. Desjeux P. Leishmaniasis – Public Health Aspects and Control. Clin Dermatol 1996; 14: 417-423
23. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/ HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol 2003; 97: 3-15
24. Dujardin JC, Banuls AL, Victoir K. From population to genome: ecogenetics of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89(S1): 45-53
25. Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Mol Ecol Notes 2003; 3: 167-9
26. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Genetics 2004; 5: 435-445
27. El-Tai NO, El Fari M, Mauricio I, et al. *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. Exp Parasitol 2001; 97: 35-44
28. Estler C-J. Pharmakologie und Toxikologie, Stuttgart 2000

29. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 1985; 39(4): 783–791
30. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genomic Sciences, University of Washington, Seattle, WA, 2004
31. Goldstein DB., Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 1995; 139: 463-471
32. Gragg H, Harfe BD, Jinks-Robertson S. Base composition of mononucleotide runs affects DNA polymerase slippage and removal of Frameshift Intermediates by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Am Soc Microbiol* 2002; 22: 8756-8762
33. Grimaldi Jr, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatoriensis* sp. N. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87: 221-8
34. Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. Sunderland 1997
35. Herwaldt BL Seminar- Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9
36. Ibrahim E, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 61-8
37. Ibrahim EM Population genetics – The epidemiology of visceral leishmaniasis in East Africa: hints and molecular relevations. *Trans R S Trop Med Hyg* 2002; 96(S1): 25-29
38. Jacobson RL, Eisenberger CL, Svoboda M, et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *J Infect Dis* 2003; 188: 1065-1073

39. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA. Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *Mol Ecol* 2002a; 2: 104-6
40. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, et al. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol* 2002b; 96: 265-270
41. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, et al. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and '*L. archibaldi*' from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitol* 2004; 129: 399-409
42. Kreuzer RD, Corredor A, Grimaldi G Jr, et al. Characterization of *Leishmania colombiense* sp.n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sandflies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 662-75
43. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 2005; 7: 1224-1234
44. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, Classification and geographical distribution, 1-120. In W. Peters, R. Killick-Kendrick (eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Biology and Epidemiology. Academic Press Inc., London 1987
45. Lewin S, Schönian G, El Tai N, Oskam L, Bastien P, Presber W. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1267-1276
46. Luis JR, Rowold DJ, Regueiro M, et al. The levant versus the Horn of Africa: Evidence for bidirectional Corridors of human migrations. *Am J Genet* 2004; 74: 532-544

47. Lumsden WHR. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1975; 68: 74-5
48. Magill AJ, Grogl M, Gasser RA Jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. N Engl J Med 1993; 328 (19): 1383-7
49. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16: 188-9
50. Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitol 2001; 122: 393-403
51. Minch E, Ruiz-Linares A, Goldstein D, Feldman M, Cavalli-Sforza LL. Microsat v.1.5d : a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, 1997. (<http://lotka.stanford.edu/microsat/microsat.html>)
52. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, et al. Relapses versus Reinfections in Patients coinfecting with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus Type I. J Infect Dis 2002; 185: 1533-7
53. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol 2002; 18: 399-405
54. Moxon ER, Wills C. DNA Microsatellites: agents of evolution? Sci Am 1999; 280: 94-9
55. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian, G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for the discrimination of *leishmania infantum* MON-1 strains. J Clin Microbiol 2006; 44: 495-503
56. Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. Trop Med Int Health 2000; 5: 553-562

57. Pratlong F, Dereure J, Bucheton B, et al. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitol* 2001; 122: 599-605
58. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 2000; 155: 945-959
59. Puig L, Pradinaud R. *Leishmania* and HIV co-infection: dermatological manifestations. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(S1): 107–114
60. Quispe Tintaya KW, Jing X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC. Antigen Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis: Polymorphism of Cysteine Proteinase B and Surface Metallprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis* 2004; 189: 1035-1043
61. Rioux JA, Lanotte G, Serres E., Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of Isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 3: 111-125
62. Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Bastien P Structural organisation of microsatellite families in the genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65(2): 271-282
63. Ruzzante DE. A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 1987; 55: 1-14
64. Sacks DL, Kenney RT, Kreutzer RD, et al. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* 1995; 345 (8955): 959-961
65. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York 1989

66. Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 974-980
67. Saitou N, Nei M The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-425
68. Schallig HDFH, Oskam L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 641-651
69. Schönian G, Schweynoch C, Zlateva K, et al. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 77: 19-29
70. Schönian G, Schnur L, El Fari M, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001a 95: 217-224
71. Schönian G, Schweynoch C, Presber W. Molekulare Identifizierung und Differenzierung von Leishmanien. *Hyg Microbiol* 2001b 2: 61-6
72. Schönian G, Nasreddin A, Dinse N, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 349-358
73. Schönian G, Al-Jawabreh A, Presber W Zur Diagnostik der *Leishmania*-Infektionen. *Laboratoriumsmedizin* 2004; 28(6): 498-505
74. Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 471-8

75. Schwenkenbecher JM, Fröhlich C, Gehre F, Schnur LF, Schönian G. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 99-105
76. Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, et al. Microsatellite analysis reveal genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* 2006; 36: 237-246
77. Sneath PHA, Sokal RR: Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco, 1973
Kala-Azar dermal leishmaniasis in humans, *J. Clin. Microbiol.* 42: 1739-1741
78. Sundar S, More DK, Singh MK, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1104-7
79. Swofford DL PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Illinois Natural History Survey. Champaign 1993
80. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 1998; 28: 85-104
81. Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, et al. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5129–5133
82. Zemanova E, Jirku M, Mauricio IL, Miles MA, Lukes J. Genetic Polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 613-617
83. Zijlstra EE, El-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan: Post kala-azar dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(S1): 1-76
84. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM, El- Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 87-98

Erklärung

„Ich, Lyvia Keilonat, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *Leishmania donovani*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Danksagung

Vielen Leuten schulde ich Dank, die mir und meiner Arbeit während der ganzen Zeit Interesse und Unterstützung auf unterschiedlichste Weise entgegenbrachten.

Besonders möchte ich dafür folgenden Menschen danken:

Frau Dr. Schönian, die mich in ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Ihre und Prof. Wolfgang Presbers Anmerkungen und Anregungen haben mir sehr weitergeholfen. Danke auch für die diversen Sitzungen, in denen konstruktive Kritik geübt wurde.

Dr. Katrin Kuhls und Dr. Jan Schwenkenbecher möchte ich für die gute Betreuung während dieser Zeit danken. Dr. Jan Schwenkenbecher besonders dafür, dass er mich auf die Idee brachte, nach meinem Praktikum dort zu promovieren und die anschließende gute Einarbeitungszeit. Dr. Katrin Kuhls danke ich für die gute Betreuung, nachdem Dr. Jan Schwenkenbecher seinen Beruf in den Staaten fortführte. Dr. Kuhls brachte mir vor allem wissenschaftliches Arbeiten und die Benutzung der phylogenetischen Programme nahe, durch ihre ermutigende Art blieben mir sicher viele fruchtlose Programmiersuche erspart.

Dank gebührt auch Carola Schweynoch, die mir jederzeit gerne mit Rat im Labor zu Gerätschaften und Chemikalien behilflich war.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Bernd Keilonat und Regina Wegener-Keilonat bedanken, die mich während meines gesamten Studiums finanziell unterstützten, ohne sie wäre eine Promotion in Studienzeiten nicht möglich gewesen.

Ole Collingro mein Freund und Partner danke ich für seine emotionale Unterstützung und für Verständnis und Liebe, die er mir trotz langer Abende immer entgegenbrachte.

Vielen Dank auch an meine Mutter Regina Wegener-Keilonat und Waltraut Osche, für die grammatikalischen Tipps, die mir sehr geholfen haben.

Alexandra Buskühl und Ron Weber danke ich für ihre Formatierungkenntnisse, die sie mir bereitwillig und geduldig nahe brachten.

Tigra meiner Katze danke ich dafür, dass sie sich neben den Rechner legte und die Zeit am Schreibtisch mit mir teilte.