

5. Zusammenfassung

Protozoen der Gattung *Leishmania* verursachen beim Menschen ein breites Spektrum von Krankheitsformen, die von einer spontan abheilenden CL bis zur systemischen VL reichen können. Alle Leishmaniasen beginnen als kutane Infektionen, hervorgerufen durch den Biss einer infizierten Sandmücke. Während einige Infektionen lokal auf die Haut beschränkt bleiben, kommt es bei anderen zu einer Aussaat der Parasiten in die inneren Organe des Säugetierwirtes; die Ursachen dieses Organotropismus sind weitgehend unbekannt. Der Verlauf der Erkrankung hängt wesentlich von der infizierenden *Leishmania*-Spezies ab; allerdings spielt auch die Immunkompetenz des Wirtes eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit sollten die genetischen Grundlagen des Organotropismus viszeralisierender *Leishmania*-Spezies mit Hilfe einer genetischen Komplementationstrategie analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden dermatrope *L. major* mit einer Cosmid-DNA-Genbank aus viszerotropen *L. donovani* transfiziert. Durch die nachfolgende Infektion von BALB/c-Mäusen mit den rekombinanten *L. major* sollte *in vivo* eine Selektion auf Cosmide erfolgen, die den Leishmanien einen Selektionsvorteil in den inneren Organen der Mäuse verschaffen.

- Während nach zwei aufeinander folgenden Selektionsrunden und Reisolation aus den Lymphknoten eine größere Zahl z.T. identischer Cosmide aus den rekombinanten *L. major* isoliert werden konnte, dominierte nach zweimaliger Passage und Reisolation rekombinanter *L. major* aus den Milzen ein einzelnes Cosmid, pcosVL-1. Dieses Ergebnis spiegelt einen unterschiedlichen Selektionsdruck in Lymphknoten und Milz wider.
- Eine Analyse der Infektiosität von *L. major* [pcosVL-1] ergab keinen Unterschied zu rekombinanten, nur mit dem Cosmidvektor pcosTL transfizierten *L. major*. Im Gegensatz dazu ließ sich eine signifikante Erhöhung des Milzgewichts bei den mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäusen feststellen; dies war insofern von Bedeutung, als Splenomegalie ein charakteristisches Merkmal der humanen VL darstellt. Obwohl Splenomegalie im allgemeinen mit einem Anstieg der Parasitenlasten im Milzgewebe korreliert, war in den Milzen der mit *L. major* [pcosVL-1] bzw. *L. major* [pcosTL] infizierten BALB/c-Mäuse kein signifikanter Unterschied der Parasitenzahl zu verzeichnen. Signifikant erhöhte IL-12-Konzentrationen im Blut der mit *L. major* [pcosVL-1] infizierten Mäuse ließen eine verstärkte Immunantwort gegen *L. major* [pcosVL-1] vermuten.
- Die Sequenzanalyse von pcosVL-1 führte zur Identifizierung von 8 putativen ORFs; 75% der auf pcosVL-1 kodierten Proteine wiesen keine signifikanten Übereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen bzw. nur Homologien zu unbekanntem Proteinen auf.
- Zur Identifizierung des Gens bzw. der Gene, die den rekombinanten *L. major* einen Selektionsvorteil in der Milz von BALB/c-Mäusen verschafft haben, wurde eine Einengung auf relevante Bereiche von pcosVL-1 vorgenommen. Ein *screening* der *L. donovani*-Cosmid-Genbank auf pcosVL-1-Homologe lieferte 8 Cosmide, die ein günstiges Überlappungsmuster mit dem Originalcosmid aufwiesen. Nach individueller Transfektion von *L. major* mit diesen Cosmiden und einer anschließenden *in vivo*-Selektion konnte der für den Milztropismus verantwortliche Bereich auf zwei Kandidatengene, ORF2 bzw. ORF3, eingengt werden.

- Durch rekombinante Expression von ORF2 bzw. ORF3 in *E. coli* konnte Antigen gewonnen werden, das zur Immunisierung von Hühnern verwendet wurde und der nachfolgenden Isolierung von Antikörpern diente.
- Zur Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 in *L. major* wurden beide Gene einzeln in das Expressionsplasmid pIRSAT-3 kloniert. Bei der Transfektion erfolgte die stabile Integration des jeweiligen Konstrukts in den 18S rRNA-Genlocus von *Leishmania*. Die Überexpression von ORF2 bzw. ORF3 durch rekombinante *L. major* konnte im Immun-Blot unter Verwendung der spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Eine vergleichende *in vivo*-Selektion von *L. major* [pIR], *L. major* [pIR/ORF2] und *L. major* [pIR/ORF3] zeigte eindeutig, dass ORF3 für den Effekt auf den Milztropismus rekombinanter *L. major* in BALB/c-Mäusen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde im folgenden die Bezeichnung LdSTF1 (*Leishmania donovani* spleen tropism factor 1) verwendet.
- Zur Charakterisierung des LdSTF1-Genprodukts konnten Datenbankrecherchen nur einen geringen Beitrag liefern. Bei dem LdSTF1-Genprodukt handelt es sich um ein Protein von 226 kDa, das eine nicht-signifikante Übereinstimmung zu einem hypothetischen Protein aus der intergenischen Region ume3-hda 1 von *L. major* aufweist; das Gen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem der während einer Pulsfeld-Gelelektrophorese co-migrierenden Chromosomen 32 und 33 lokalisiert. Eine Bestimmung der Genkopienzahl durch Southern-Blot-Analyse ergab, dass es sich bei LdSTF1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein *single copy*-Gen handelt. Der immunelektronenmikroskopische Nachweis des LdSTF1-Genprodukts im Milzgewebe eines VL-Patienten lässt auf eine Sezernierung des Proteins durch die Parasiten schließen.
- Bei einer Analyse der Expressionskinetik wurde ein Unterschied zwischen rekombinanten *L. donovani* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. donovani* [pcosVL-1] während der *in vitro*-Differenzierung zu axenischen Amastigoten deutlich: während *L. donovani* [pcosVL-1] das LdSTF1-Genprodukt durchweg exprimierten, war in axenischen Amastigoten von *L. donovani* [pIR/LdSTF1] eine starke Reduktion der LdSTF1-Expression zu verzeichnen - ein Hinweis auf die Bedeutung der im Cosmid noch vorhandenen natürlichen flankierenden Sequenzen bei der Regulation der Genexpression.
- Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen zeigten rekombinante *L. major* [pIR/LdSTF1] im Vergleich mit *L. major* [pIR] keine Änderung in der Infektiosität; die Parasitenlasten in Milz und Lymphknoten wiesen ebenfalls keinen Unterschied zwischen den mit *L. major* [pIR/LdSTF1] bzw. *L. major* [pIR] infizierten Tieren auf. Dagegen waren die Milzgewichte der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten BALB/c-Mäuse signifikant erhöht; die absoluten Werte erreichten jedoch nicht die des auf Cosmid-Ebene, mit *L. major* [pcosVL-1] durchgeführten Experiments. Die signifikant höhere Produktion von IFN- γ und IL-2 in Milzzellen der mit *L. major* [pIR/LdSTF1] infizierten Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3 bestätigte die bereits in vorherigen Untersuchungen geäußerte Hypothese einer durch LdSTF1 hervorgerufenen, gesteigerten Immunantwort und der damit verbundenen verstärkten Elimination der Parasiten im infizierten Milzgewebe. Dieser für die Leishmanien nachteilige Effekt kann möglicherweise durch den Vorteil eines verstärkten Milztropismus rekombinanter *L. major* [pIR/LdSTF1] kompensiert werden.