

5. Zusammenfassung

Protozoen der Gattung *Leishmania* zeichnen sich durch eine hohe basale Thermotoleranz aus. Im Verlauf ihres biphasischen Lebenszyklus werden sie bei der Übertragung von einem poikilothermen Insektenvektor in die Haut eines homiothermen Säugetierwirts mit einem unmittelbaren und drastischen Anstieg ihrer Umgebungstemperatur konfrontiert, der ihnen keine Gelegenheit gibt, Thermotoleranz zu induzieren. Dennoch sind sie in der Lage ihre zellulären Funktionen aufrechtzuerhalten, in die amastigote Form zu differenzieren und sich im Wirt zu etablieren. Die Temperatur-Toleranz dermatroper und viszeralisierender *Leishmania*-Spezies entspricht sich jedoch nicht. Der permissive Temperatur-Bereich dermatroper Spezies geht nicht über die bei ca. 35°C liegenden Temperaturen ihres Zielorgans im Säugetierwirt, der Haut, hinaus. Viszeralisierende *Leishmania*-Spezies dagegen tolerieren auch *in vitro* die in den inneren Organen vorherrschenden höheren Temperaturen (Berman und Neva, 1981; Biegel *et al.*, 1983; Sachs *et al.*, 1983; Callahan *et al.*, 1996). Diese Korrelation zwischen der Temperatur-Toleranz verschiedener *Leishmania*-Spezies und ihrem jeweiligen Tropismus im Säugetierwirt könnte einen ursächlichen Zusammenhang widerspiegeln. Die molekularen Grundlagen der höheren Thermotoleranz viszeralisierender *Leishmania*-Spezies sind jedoch weitgehend unbekannt. Überdies ist bislang noch unklar, ob die Thermotoleranz viszeralisierender *Leishmania*-Spezies tatsächlich für die Ausbreitung der Parasiten in den inneren Organen mitverantwortlich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch einen genetischen Komplementations-*screen* basierend auf einem übertragenen Phänotyp Determinanten erhöhter Thermotoleranz aus *L. donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniase, identifiziert, sowie deren Einfluss auf den Tropismus des Temperatur-empfindlicheren Erregers der kutanen Leishmaniase, *L. major*, analysiert werden. *L. major* wurde zu diesem Zweck mit einer Cosmid-Genbank aus dem *L. donovani*-Genom transfiziert. Nachfolgende *in vitro*-Selektionen bei für *L. major* nicht-permissiven Temperaturen dienten zunächst der Identifizierung von Cosmiden, die rekombinanten *L. major* ein Überleben bei den höheren Temperaturen ermöglichen.

Die Analyse der aus überlebenden Leishmanien isolierten Cosmid-DNA zeigte, dass die Vielfalt der rekombinanten Parasiten drastisch eingeschränkt wurde und nur Parasiten mit bestimmten Cosmiden aus den primären Temperatur-Selektionen hervorgegangen sind. In den verschiedenen Ansätzen dominierten jeweils nur ein bis zwei Cosmide. Insgesamt wurden 10 unterschiedliche Cosmide isoliert. Die Tatsache, dass diese Cosmide keine überlappenden Sequenzen aufweisen spiegelt den offensichtlich multifaktoriell determinierten Charakter des Merkmals Thermotoleranz wider.

Die nach Transfektion von *L. major* mit den jeweiligen Cosmiden erhaltenen definierten rekombinanten Stämme wurden sekundären Temperatur-Selektionen unter konkurrierenden Bedingungen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche machten deutlich, dass *L. major* insbesondere durch die Cosmide pcos11.3, pcos13.12 und pcos14.4 ein Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen vermittelt wird.

Das Cosmid pcos11.2 ist ebenfalls eines der dominierenden Cosmide, die aus überlebenden Parasiten der sekundären Temperatur-Selektionen isoliert wurden. Dieses Cosmid ist jedoch nicht vorrangig für einen Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verantwortlich, sondern ermöglicht *L. major*, einen Wachstumsarrest schneller zu überwinden. Auch die mit *L. donovani* [pcos11.2] durchgeführten Versuche ergaben entsprechende Ergebnisse. Dies deutet auf einen Gendosis-abhängigen Effekt hin. Der Einsatz von Plasmid-Genbanken bei

nachfolgenden Selektionen führte zur Identifizierung von zwei Plasmiden mit pcos11.2-Sequenzen, durch die der für den Wachstumseffekt verantwortliche ORF identifiziert werden konnte. Dieser ORF kodiert für ein hypothetisches Protein von 33 kDa. In der Sequenz-Datenbank ergab sich eine signifikante Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein aus *L. major*.

Eine konkurrierende Selektion der *L. major* [pcos]-Stämme in BALB/c-Mäusen zeigte, dass bestimmte Cosmide, die im Verlauf der Temperatur-Selektionen identifiziert worden waren, auch im Säugetierwirt einen Selektionsvorteil auf *L. major* übertragen. Aus den Parasiten der Milzen wurden hauptsächlich pcos13.12 und pcos8 isoliert. Diese Cosmide enthalten möglicherweise *L. donovani*-Sequenzen, die eine Viszeralisierung fördern. Nach den Ergebnissen der sekundären *in vitro*- und *in vivo*-Selektionen war für das Cosmid pcos13.12 auch ein Zusammenhang von Thermotoleranz und Tropismus für die inneren Organe denkbar. Hinsichtlich des Cosmids pcos8, das nach den sekundären Temperatur-Selektionen nur vereinzelt aus überlebenden Parasiten isoliert worden war, schien dies jedoch nicht wahrscheinlich zu sein. Auch für pcos11.3 und pcos14.4 war ein solcher Zusammenhang nicht ersichtlich. Dass pcos11.3 aber neben pcos13.12 und insbesondere pcos8 häufig in den Parasiten der Lymphknoten vertreten war, scheint dafür zu sprechen, dass dieses Cosmid, im Gegensatz zu pcos14.4, auch *in vivo* für *L. major* von Vorteil ist.

Aus den Cosmiden konstruierte Plasmid-Genbanken ließen sich nicht erfolgreich für die Selektion auf Parasiten mit erhöhter Thermotoleranz und somit für die Eingrenzung der für den Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen verantwortlichen Sequenzen einsetzen. Desgleichen gelang es nicht, die relevanten Bereiche von pcos8 mit Hilfe von Transposon-Derivaten im Rahmen einer Negativ-Selektion zu identifizieren.

Durch Sequenzanalyse identifizierte ORF der Cosmide pcos8 und pcos13.12 wurden in den Expressions-Vektor pIR(mcs2-) subkloniert und die Konstrukte nachfolgend in *L. major* transfiziert, um durch eine vergleichende Analyse der die jeweiligen ORF überexprimierenden *L. major*-Stämme, die für den Selektionsvorteil bei hohen Temperaturen bzw. im Säugetierwirt verantwortlichen Gene zu identifizieren.

Die Thermotoleranz-vermittelnden Eigenschaften des Cosmids pcos13.12 sind im wesentlichen auf den *L. donovani*-ORF3 zurückzuführen. Bei Thermotoleranz-Versuchen zeichnete sich der den ORF3 überexprimierende *L. major*-Stamm *L. m.* (pIR/P-ORF3) durch eine deutlich bessere Überlebensfähigkeit gegenüber dem Kontrollstamm und auch im Vergleich zu den anderen rekombinanten Stämmen aus. Der *L. donovani*-ORF3 kodiert für ein Protein von 83 kDa. Datenbankrecherchen ergaben keine Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen. Im Gegensatz zum *L. donovani*-ORF3 verbesserte die Überexpression des homologen ORF3 aus *L. major* die Überlebensfähigkeit von *L. major* nicht. Ein Gendosis-Effekt ist daher auszuschließen.

Eine vergleichende *in vivo*-Selektion zeigte, dass für den Selektionsvorteil, der *L. major* während der Mauspassage durch pcos13.12 und pcos8 vermittelt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit der ORF1 des Cosmids pcos13.12 bzw. der ORF5 des Cosmids pcos8 verantwortlich sind. Dabei dominierten die entsprechenden überexprimierenden *L. major*-Stämme sowohl in den Parasiten der Lymphknoten als auch der Milzen. Für den ORF5 zeichnete sich ein wesentlich ausgeprägter Effekt ab.

Der ORF1 des Cosmids pcos13.12 kodiert für ein 168 kDa-Protein, das Übereinstimmungen

mit einer mutmaßlichen cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE) aufweist.

Für das 60 kDa-Genprodukt des ORF5 ergaben sich Übereinstimmungen zu einer *dual specificity phosphatase* (DSP). Durch die nach Immunisierung von Hühnern mit dem rekombinant exprimiertem Protein gewonnenen Anti-DSP-Antikörper war in einer Immun-Blot-Analyse ein Nachweis der mutmaßlichen DSP in Lysaten überexprimierender *Leishmania*-Stämme möglich, jedoch nicht in Lysaten der Wildtyp-Zellen. Es handelt sich anscheinend um ein auf sehr niedrigem Niveau exprimiertes Protein.

Die zur Bestimmung der Genkopienzahl durchgeführte Southernblot-Analyse zeigte, dass das *PDE*- und das *DSP*-Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit als *single copy*-Gene im haploiden *L. donovani*-Genom vertreten sind.

Vorläufige Ergebnisse eines ersten direkten Vergleichs lieferten einen Hinweis darauf, dass durch Überexpression der DSP in *L. major* möglicherweise die Proliferation der Parasiten im Säugetierwirt gefördert wird. Die Parasitenlast in den Lymphknoten der mit *L. major* (pIR/A-DSP) infizierten BALB/c-Mäuse war im Vergleich zu den mit dem Kontrollstamm infizierten Mäusen vierfach erhöht.

Für den durch pcos13.12 bei hohen Temperaturen bzw. im Säugetierwirt vermittelten Selektionsvorteil sind verschiedene ORF verantwortlich. Es ergab sich also auch in diesem Fall keine Verknüpfung von erhöhter Thermotoleranz und einem Tropismus für die inneren Organe. Somit lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen Temperatur-Toleranz und Tropismus nach meinen Ergebnissen nicht belegen.