

Natalia Lüsebrink
Dr. med.

Untersuchungen zur Funktion von Dynamin1 in *Plasmodium berghei*

Promotionsfach: Hygiene Institut, Parasitologie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Lanzer

Apikomplexa sind weit verbreitete Parasiten, deren Vertreter unter anderem Malaria und Toxoplasmose verursachen. *Toxoplasma gondii* wird aufgrund seiner guten Zugänglichkeit für genetische Analysen als ein Modellsystem für Apikomplexa betrachtet und hat daher in der Grundlagenforschung einen festen Platz.

Die GTPase Dynamin wurde kürzlich in *Toxoplasma gondii* analysiert und hat einen interessanten Phänotyp gezeigt. Die Expression der GTPase in einem trunkierten Zustand während der Replikationsphase führte zu bewegungsunfähigen Parasiten, denen die sekretorischen Organellen fehlten. Die Biosynthese letzterer ist bis heute wenig bekannt, wegen ihrer Phylum bezogenen Spezifität jedoch von großem Interesse. In dieser Arbeit sollte daher Dynamin in *Plasmodium berghei* (PbDYN1) untersucht werden.

Hierzu wurde ein Vektorensystem konstruiert, welches eine Untersuchung von bedeutenden Genen bzw. Proteinen aus *Toxoplasma gondii* in *Plasmodium berghei* erlauben würde. Durch die Wahl von Restriktionsschnittstellen, die zugleich in Vektoren für Untersuchungen an *Toxoplasma gondii* Verwendung finden, wurde die Klonierung der zu untersuchenden Gene vereinfacht und für zukünftige Arbeiten zeitsparend durchführbar. Durch die Konstruktion mehrerer Vektoren mit Promotor-Expressionsaktivität zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten während des Lebenszyklus, konnten einzelne Stadien spezifisch untersucht werden.

Die Vektoren wurden auf der Basis des b3D+ Vektors konstruiert; PbDYN1 wurde dabei als Wild Typ und GTPase defiziente Mutante unter Stadien spezifischen sowie konstitutiv aktiven Promotoren kloniert. Mit einer Ausnahme konnten alle Konstrukte in das Plasmodiumgenom integriert werden. In den folgenden Experimenten, die *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur Parasitenentwicklung- und Beweglichkeit, sowie Proteinlokalisierung umfassten, zeigte sich für keines der dominant-negativen Konstrukte eine signifikante Beeinträchtigung der Bewegungsfähigkeit oder ein Abbruch des Lebenszyklus. Es fand sich somit keine Übereinstimmung im Phänotyp von *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium berghei*.

Erklärungen der beobachteten Divergenzen sind vielfältig, und einerseits möglicherweise in den nicht zu vernachlässigenden Unterschieden innerhalb des Phylums zu finden: so ist folglich nicht auszuschließen, dass sich die Mechanismen der Organellenbiosynthese innerhalb der *Apikomplexa* grundsätzlich unterscheiden und Dynamin demzufolge in den verschiedenen *Apikomplexa* eine prinzipiell andere Funktion erfüllt. Es existieren hierbei durchaus Hinweise auf eine Beteiligung des Homologs von DYN1 am Wachstumsstoffwechsel in *Plasmodium Spezies* und, dem entgegengestellt, am Reproduktionszyklus in *Toxoplasma gondii*. Andererseits ist es denkbar, dass der eigentliche, bisher nicht abschließend geklärte Expressionszeitpunkt, der möglicherweise ausschließlich in den Blutstadien liegt, durch die gewählten Promotoren nicht ausreichend erfasst wurde, und somit der dominant-negative Effekt nicht greifen konnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass sich die durchgeführten Untersuchungen vor allem auf die Mücken und Leberstadien beziehen, und dass sich das einzige

Konstrukt, das in Blutstadien zu einer starken Expression der Dynamin Mutante geführt hätte, allen Integrationsversuchen entzogen hat. Beobachtungen aus dieser Arbeit sprechen daher für eine essentielle Funktion von DYN1 in den Blutstadien von *Plasmodium berghei*. Sollte sich in Zukunft herausstellen, dass PbDYN1 einzig in den Blutstadien die Organellenbiosynthese entsprechend dem Vorbild von *Toxoplasma gondii* beeinflusst, würde dies weitere Fragen zur Konservierung dieser, sich innerhalb eines Lebenszyklus mehrfach wiederholenden Prozesses aufwerfen.

Schließlich muss angemerkt werden, dass die Anwendung des Vektorensystems im Falle von DYN1 zwar eine erfolgreiche, stadienspezifische Expression bewirkt hat, jedoch bisweilen auch nicht klar zu deutende Resultate ergeben hat, die in dieser Arbeit insbesondere die, als Kontrolle gedachten Wild Typ Konstrukte betrafen. Die Interpretation ihres Phänotyps kann nur mit Vorbehalt erfolgen.

Die Untersuchung homologer Proteine in *Plasmodium berghei*, die dem *Toxoplasma gondii* Genom entstammen, erscheint unrealistisch, jedoch wird eine definitive Bewertung erst in Zukunft, nach Untersuchung weiterer Proteine erfolgen können.

Die Funktion von DYN1 in *Plasmodium berghei* bleibt gegenwärtig noch unverstanden. Allerdings sind die Anhaltspunkte, auf unter Umständen divergierende Funktionen innerhalb des Phylums der Apikomplexa, mit Implikation grundsätzlich gegenteiliger Lebensprozesse (Wachstums/Ernährungs- vs. Reproduktionsstoffwechsel) von großem Interesse, und lassen weitere Fragen zur Organellenbiosynthese, speziell aus evolutionsbiologischer Sicht, aufkommen. Erst die weitere, separate Erforschung dieses Prozesses, sowohl in *Toxoplasma gondii* als auch in *Plasmodium berghei* wird es erlauben, die jeweils beteiligten Proteine zu identifizieren, sowie diesbezüglich den Grad der Konservierung zu beurteilen.