

**Die Kontrolle der monoallelen Expression,
antigenen Variation und Entwicklung in
*Trypanosoma brucei***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christopher Batram

geboren in Hamburg

Würzburg, 2013

Eingereicht am: 30.10.2013

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Engstler

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Engstler

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rudel

Tag des Promotionskolloquiums: 19.12.2013

Doktorurkunde ausgehändigt:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	1
2	Abkürzungen	3
3	Einleitung	5
3.1	Afrikanische Trypanosomen	5
3.1.1	Die verschiedenen Arten afrikanischer Trypanosomen	5
3.2	<i>Trypanosoma brucei</i>	6
3.2.1	Die Zellarchitektur und der Zellzyklus	6
3.2.2	Der Lebenszyklus	8
3.2.3	Die Antigene Variation	12
3.3	Monoallele Genexpression	16
3.3.1	Die monoallele VSG Expression in <i>T. brucei</i>	18
4	Materialien und Methoden	22
4.1	Materialien	22
4.1.1	Enzyme und Kits	22
4.1.2	Oligonukleotide	22
4.1.3	Antikörper	24
4.1.4	Chemikalien	25
4.1.5	Kulturmedien	25
4.1.6	Puffer und Lösungen	26
4.1.7	Besondere technische Geräte	28
4.1.8	Computerprogramme	28
4.1.9	Plasmide	29
4.1.10	Trypanosomen	30
4.2	Methoden	31
4.2.1	Arbeiten mit <i>T. brucei</i>	31
4.2.2	Arbeiten mit <i>E coli</i>	34
4.2.3	Molekularbiologische Arbeiten	35
5	Ergebnisse	44
5.1	Die Regulation der VSG Expression	44
5.1.1	Induzierbare Expression des ektopischen <i>VSG121</i>	45
5.1.2	Das ektopische <i>VSG121</i> reprimiert das endogene <i>VSG221</i>	47
5.1.3	Das ektopische <i>VSG121</i> wird gleichmäßig in der Population exprimiert	49
5.2	Die Regulation der aktiven VSG Expressionsstelle	51

5.2.1	Die aktive BES wird durch eine <i>VSG</i> Überexpression inaktiviert	51
5.2.2	Die aktive BES wird graduell inaktiviert	53
5.3	Der Einfluss der BES Aktivität auf den Zellzyklus	57
5.3.1	Die BES Attenuierung führt zu einer verlängerten G1-Phase	57
5.3.2	Die globale RNA-Syntheserate wird reduziert	61
5.4	Der Einfluss der BES-Aktivität auf die Entwicklung der Trypanosomen	65
5.4.1	Die BES Attenuierung führt zur Expression eines <i>Short Stumpy</i> Reporters	66
5.4.2	Das native PAD1 wird stadienspezifisch in der G1-Phase exprimiert	70
5.4.3	Die ruhenden Trypanosomen sind differenzierungskompetent	72
5.5	Die Aktivität der BES wird durch <i>ESAG1</i> und <i>ESAG2</i> gemessen	78
5.5.1	Die Depletion von <i>ESAG1</i> und <i>2</i> führt zu Wachstumsdefekten und induziert den <i>Short Stumpy</i> -Marker GFP:PAD _{utr}	78
5.6	Die Funktion der <i>VSG</i> 3'UTR bei der Regulation der BES Aktivität	82
5.6.1	Das konservierte 16mer ist notwendig für die Initiation der BES Attenuierung	84
5.6.2	Die Expression eines Reporter-Gens mit <i>VSG121</i> 3'UTR führt zur Depletion der endogenen <i>VSG</i> mRNA	86
6	Diskussion	91
6.1	Eine negative Rückkopplung kontrolliert die BES Aktivität	91
6.2	Wodurch wird die negative Rückkopplung ausgelöst?	95
6.3	Welche Rolle spielt die Chromatinstruktur bei der BES Attenuierung?	103
6.4	Welche Rolle spielen die <i>ESAGs</i> bei einem <i>in situ</i> Wechsel?	111
6.5	Antigene Variation und Entwicklung in <i>T. brucei</i> : Ein integratives Modell	117
7	Ausblick	121
8	Literaturverzeichnis	123
9	Anhang	135
9.1	Eidesstattliche Erklärung	135
9.2	Publikationsliste	136
9.3	Lebenslauf	137
9.4	Danksagungen	138

1 Zusammenfassung / Summary

The exclusive expression of only one gene from a gene family is a common phenomenon, known as monoallelic expression. The blood parasite *Trypanosoma brucei* evades the host immune system by expressing only one variant surface glycoprotein (VSG) from a repertoire of hundreds of different VSG genes. By periodically switching VSG expression (antigenic variation) the parasites evade the host antibody response. The VSG genes are transcribed from specialized telomeric bloodstream form expression sites (BESs), of which only one is active at any given time. Thus, monoallelic VSG expression is one of *T. brucei*'s most important virulence factors.

The aim of this work was to describe the processes occurring while transcription switches from one BES to another. The depletion of the active VSG by RNA interference (RNAi) was shown previously to have no effect on switching frequency. It was therefore investigated here, which influence the activation of a new BES would have on monoallelic expression. So far, it has not been possible to specifically activate a silent BES. Therefore, an artificial system was chosen which allows for inducible expression of a particular gene. The BESs differ in number and composition of expression site associated genes (ESAGs), but all contain a telomeric VSG gene. Thus, activation of a new BES will inevitably lead to expression of a second VSG. To simulate - in the most straightforward manner - the activation of a new BES, a second VSG was inducibly expressed. Using this system, it was shown that the VSG itself controls its own monoallelic expression. The ectopic overexpression of a second VSG led to a gradual inactivation of the BES. This, in turn, led to a prolonged cell division cycle and the cells remained in a dormant stage for up to 5 days. Further analyzes of this stage revealed a new, reversible intermediate stage between proliferating *long slender* and arrested *short stumpy* forms. The results of this work led to a new model that mechanistically links the control of monoallelic VSG expression and development in trypanosomes.

Zusammenfassung

Die ausschließliche Expression von nur einem Gen aus einer großen Genfamilie ist ein weit verbreitetes Phänomen, das als monoallele Expression bezeichnet wird. In dem Blutparasiten *Trypanosoma brucei* stellt die Expression eines einzigen variablen Oberflächenglykoproteins (VSG) aus einem Repertoire von über 1000 verschiedenen Genen die Grundlage für die Immunevasion dar. Durch einen periodischen Wechsel der VSG Expression (Antigene Variation) bleibt der Parasit vom Immunsystem des Wirtes unerkant. Die VSG Gene werden aus telomerischen Blutstromform Expressionsstellen (BES) transkribiert, von denen nur eine zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv ist. Die Kontrolle der monoallelen VSG Expression ist somit einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *T. brucei*.

Ziel dieser Arbeit war es, die Vorgänge eines transkriptionellen Wechsels zwischen zwei BESs zu beschreiben. Das Ausschalten des aktiven VSGs durch RNA-Interferenz hatte zuvor gezeigt, dass dies nicht zu einer erhöhten Wechselrate führt. Es wurde daher untersucht, welche Auswirkungen das Anschalten einer zweiten BES auf die monoallele Expression hat. Da es bisher keine Möglichkeit gibt, eine inaktive BES gezielt zu aktivieren, wurde ein artifizielles System gewählt, das die gezielte induzierbare Expression eines Gens ermöglicht. Die BESs unterscheiden sich in der Anzahl und Zusammensetzung der Expressionsstellen-assoziierte-Gene (ESAGs), jedoch besitzt jede BES ein telomernahes VSG. Somit wird, bei einer BES Aktivierung, in jedem Fall ein neues VSG exprimiert. Durch die induzierbare Expression eines zweiten VSGs wurde so das Anschalten einer neuen BES simuliert. Mithilfe dieses Systems konnte gezeigt werden, dass das VSG selbst für die Kontrolle der monoallelen Expression verantwortlich ist. Die ektopische Überexpression eines zweiten VSGs führte zu einer graduellen Inaktivierung der BES. Infolge dessen verlangsamte sich der Zellzyklus und die Zellen verblieben bis zu fünf Tage in einem ruhenden Zustand. Genauere Analysen dieses Zustandes zeigten, dass es sich hierbei um ein bisher unbekanntes, reversibles Zwischenstadium zwischen proliferierenden sogenannten *Long Slender* und arretierten sogenannten *Short Stumpy* Formen handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu einem neuen Modell, das die Kontrolle der monoallelen VSG Expression mit der Entwicklung der Trypanosomen mechanistisch verbindet.

2 Abkürzungen

AMCA-Sulfo-NHS	Sulfosuccinimidyl-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetat
bp	Basenpaare
BES	Blutstromform Expressionsstelle
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BrUTP	5-Bromouridine 5'-Triphosphat
BSF	Blutstromform
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	desoxy ribonucleic acid (Engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
FKS	fötales Kälber Serum
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
kbp	Kilobasenpaare (1000 bp)
LS	Long Slender (Engl.)
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
MITat	Molteno Institute Trypanozoon antigen type (Engl.)
mRNA	messenger RNA (Engl.)
PCR	polymerase chain reaction (Engl.)
PFR	paraflagellar rod protein (Engl.)
PZF	Prozyklenform
RLU	relative light units (Engl.)
RNA	ribonucleic acid (Engl.)

RNAi	RNA Interferenz
SD	standard deviation (Engl.)
SEM	standard error of the mean (Engl.)
ST	Short Stumpy (Engl.)
VSG	variant surface glycoprotein (Engl.)
wt	Wildtyp

3 Einleitung

3.1 Afrikanische Trypanosomen

3.1.1 Die verschiedenen Arten afrikanischer Trypanosomen

Afrikanische Trypanosomen sind eukaryotische, parasitäre Einzeller, die ein breites Spektrum an Säugetieren befallen. Ihre Verbreitung ist dabei beschränkt auf das Vorkommen der Tsetsefliege *Glossina spp.*, die als natürlicher Vektor und somit als Überträger der Parasiten dient. Am epidemiologisch bedeutsamsten sind die Arten und Unterarten der *Vivax-* (*Trypanosoma vivax*), *Congolense-* (*Trypanosome congolense*) und *Brucei-*Gruppe (*T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense*). Neben verschiedenen Gruppen von Wildtieren, die als natürliches Reservoir für Trypanosomen dienen, werden auch domestizierte Tiere wie Rinder, Ziegen, Schweine, Schafe und Hunde infiziert. In den betroffenen Gebieten haben insbesondere die Infektionen von Rindern mit *T. congolense* und *T. vivax*, zum Teil aber auch mit *T. b. brucei*, eine wirtschaftliche Bedeutung. Diese Arten lösen die als Nagana bekannte Krankheit in den Nutztieren aus, was zur Folge hat, dass ein Großteil der zur Verfügung stehenden Weideflächen nicht als solche genutzt werden können. Die Unterarten der *Brucei-*Gruppe üben zudem einen direkten Einfluss auf die Menschen in der Sub-Sahara Region aus. Während die Unterarten *T. b. rhodesiense* und *gambiense* humanpathogen sind, besitzt der Mensch eine natürliche Immunität gegen *T. b. brucei* Infektionen. Ein sogenannter trypanolytischer Faktor (TLF) im Serum, das Apolipoprotein L1, führt zu einer sofortigen Lyse des Parasiten (Wheeler, 2010). Die Unterarten *T. b. rhodesiense* und *gambiense* haben allerdings Resistenzen gegen den TLF entwickelt und lösen beim Menschen die sogenannte humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT) aus, besser bekannt als Schlafkrankheit. Die Resistenz von *T. b. rhodesiense* beruht auf einem einzigen Gen, dem Serum-Resistenz-assoziierten Gen *SRA* (Xong et al., 1998). *T. b. gambiense* scheint dagegen unterschiedliche Mechanismen der TLF-Resistenz entwickelt zu haben, die jedoch noch nicht vollständig geklärt sind (Wheeler, 2010). Auch der Verlauf und die Ausprägung der Krankheit unterscheiden sich zwischen beiden Arten. Bei einer *T. b. rhodesiense* Infektion kommt es zu einem akuten Verlauf der

Krankheit. Nach einigen Wochen ist bereits das Zentralnervensystem befallen, was innerhalb von Monaten zum Tod führt. Dagegen verläuft eine Infektion mit *T. b. gambiense* wesentlich langsamer. Erst nach 1-2 Jahren kommt es zu ersten Anzeichen eines Befalls des Zentralnervensystems, mit Persönlichkeitsveränderungen, gestörtem Tag-Nacht-Rhythmus und Koordinationsstörungen. Unbehandelt führt auch diese Infektion innerhalb von 3-7 Jahren zum Tod. Die Zahl der registrierten Neuerkrankungen lag im Jahr 2012 bei 7200, wovon *T. b. gambiense* Infektionen etwa 98 % ausmachten (WHO, 2013). Die Dunkelziffer der Erkrankungen dürfte jedoch aufgrund der schlechten Infrastruktur der betroffenen Gebiete weitaus höher liegen.

3.2 *Trypanosoma brucei*

3.2.1 Die Zellarchitektur und der Zellzyklus

Trypanosoma brucei ist ein einzelliger, elongierter Parasit mit einem Korsett aus Mikrotubuli. Dieses Zytoskelett bestimmt die Zellform und bleibt über den gesamten Zellzyklus intakt. Das posteriore Ende der Zelle wird durch den Austrittspunkt des Flagellums bestimmt, der flagellaren Tasche (Abbildung 1A). Von dort aus zieht sich das Flagellum, angeheftet an den Zellkörper, über die gesamte Länge der Zelle. Die flagellare Tasche ist der einzige Ort, an dem die gesamte Endo- und Exozytose stattfindet (Overath & Engstler, 2004). Besonders in der Blutstromform (BSF) ist dies von großer Bedeutung; die Zelloberfläche ist in diesem Lebenszyklusstadium dicht gepackt mit dem Variablen Oberflächenglykoprotein (*Variant Surface Glycoprotein*, VSG), welches invariante Bestandteile der Zelloberfläche vor dem Immunsystem abschirmt (Schwede et al., 2011). Diese dichte Packung erfordert eine enorme Aufkonzentrierung auf dem Weg vom Syntheseort, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), bis hin zur Zelloberfläche (Grünfelder et al., 2002). Die flagellare Tasche macht nur etwa 5 % der gesamten Zelloberfläche aus, dennoch wird ein Oberflächen-Äquivalent in nur 12 Minuten an diesem Ort umgesetzt (Engstler et al., 2004).

Die meisten Organellen kommen in Trypanosomen in nur einer Kopie vor. So zum Beispiel das Mitochondrium, der Golgi Apparat, das Lysosom, und natürlich die flagellare Tasche und das Flagellum. Das Flagellum entspringt einem Basalkörper, der über die Mitochondriummembran mit der mitochondrialen DNA verbunden ist, welche aus einer konzentrierten Ansammlung von DNA besteht, dem sogenannten Kinetoplasten. Der Kinetoplast ist somit strukturell mit dem Basalkörper und dem Flagellum verbunden, wodurch die Segregation dieser Organellen ebenfalls miteinander verbunden ist. Da die Mitose des Kinetoplasten und des Nukleus zeitlich getrennt voneinander ablaufen, können einzelne Zellen einer Population einem bestimmten Zellzyklusstadium zugeordnet werden (Woodward & Gull, 1990) (Abbildung 1B). Wenn die Trypanosomen von der G1-Phase ($1K^1N$) in die S-Phase eintreten, wird zuerst die DNA des Kinetoplasten repliziert. Zeitlich versetzt beginnt dann die Replikation der nukleären DNA. Mit der Duplikation des Kinetoplasten entsteht auch der zweite Basalkörper und das neue Flagellum. Nachdem die Kinetoplasten-DNA repliziert ist, bewegen sich die Basalkörper voneinander weg, wodurch sich auch die Kinetoplasten trennen. Während der Segregation kann anhand der Morphologie zwischen v-förmigen ($1K^V1N$) und knochen(*bone*)-förmigen ($1K^b1N$) Kinetoplasten unterschieden werden. Nach abgeschlossener Segregation ist die Zelle nun durch zwei Kinetoplasten und einem Nukleus ($2K^1N$) deutlich von Zellen in der G1-Phase zu unterscheiden. Im Anschluss teilt sich nun der Nukleus, woraufhin Zellen mit zwei Kinetoplasten und zwei Nuklei entstehen ($2K^2N$), die der G2/M-Phase zuzuordnen sind. Ist die Teilung aller Organellen abgeschlossen, beginnt die Zytokinese und somit ein neuer Zellzyklus. Dieser einfache und definierte Zellaufbau macht Trypanosomen zu einem exzellenten Modellorganismus für die moderne Zellbiologie (He, 2004).

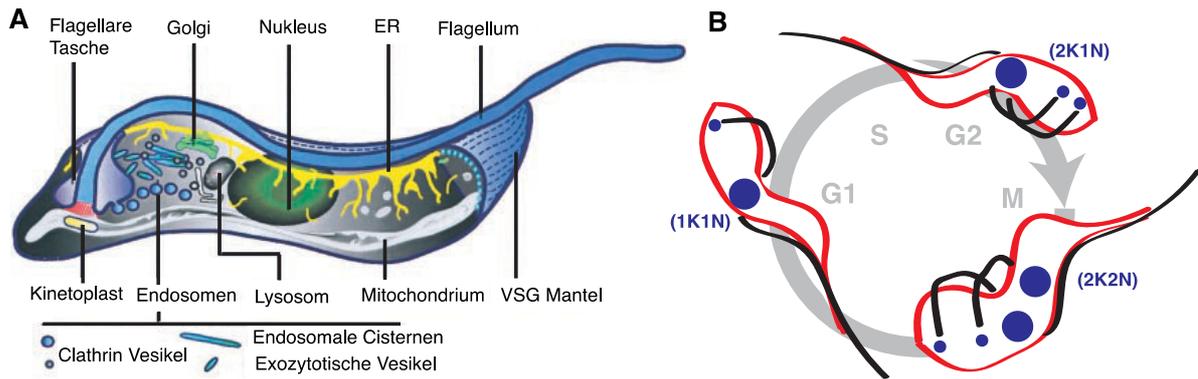


Abbildung 1 Der Zellaufbau und Zellzyklus von *T. brucei*. (A) Schematische Darstellung der Zellarchitektur (nach Grünfelder et al., 2003). Das Endoplasmatische Retikulum (ER) zieht sich entlang des Flagellums durch den gesamten Zellkörper. Die gesamte Endo- und Exozytose findet im posterioren Teil der Zelle an der flagellaren Tasche statt. (B) Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus. Die verschiedenen Zellzyklusstadien (G1, G2, M) lassen sich anhand der Kinetoplasten (K) und Nukleus (N) Konfiguration unterscheiden.

3.2.2 Der Lebenszyklus

Trypanosomen wechseln während ihres Lebenszyklus zwischen einem Säugwirt und einem Insektenwirt, der Tsetsefliege. Diese unterschiedlichen Umgebungen erfordern eine Reihe von zellbiologischen Anpassungen und Veränderungen während des Übergangs von einem Lebensstadium in das nächste (Abbildung 2). Im Säugwirt leben die Parasiten extrazellulär im Blutstrom und sind ständig dem Immunsystem ausgesetzt sind. Man unterscheidet zwischen zwei Formen, den sogenannten proliferativen *Long Slender* (LS) und nicht proliferativen *Short Stumpy* (ST) Formen. Letztere sind prä-adaptiert an den Insektenwirt und in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Der dichte Oberflächenmantel bestehend aus $\sim 5 \times 10^6$ Dimeren eines einzigen VSGs und schützt die Zellen vor einer Lyse durch das Komplement-System. Des Weiteren schirmen die dicht gepackten Proteine invariante Bestandteile der Plasmamembran ab, so dass diese nicht von Antikörpern erkannt werden können (Schwede et al., 2011). Das VSG selbst wird hingegen leicht von Antikörpern erkannt, weshalb die Parasiten eine Reihe von Strategien entwickelt haben, um in dieser Umgebung zu überleben. Die hohe Endo- und Exozytoserate ermöglicht einen raschen Austausch der antikörpergebundenen VSGs. Diese werden nach der Endozytose nicht vollständig degradiert, sondern es werden lediglich die

Antikörper entfernt und die intakten VSGs wieder exozytiert (Engstler et al., 2004). Zusätzlich werden VSGs mit gebundenen Antikörpern durch einen hydrodynamischen Fluss, gerichtet durch die Schwimmbewegung der Zellen, in Richtung der flagellaren Tasche sortiert. Dies sorgt zusätzlich für eine schnelle Entfernung der Antikörper von der Oberfläche (Engstler et al., 2007). Wird der Antikörpertiter allerdings zu hoch, reichen diese Mechanismen der Immunevasion nicht mehr aus. Die Trypanosomen besitzen zwar mehrere hundert unterschiedliche VSG Gene, von denen aber immer nur eines zu einer bestimmten Zeit exprimiert wird. Durch einen Wechsel der Expression zu einem anderen VSG bleibt die Zelle unerkant vom Immunsystem und kann auf diese Weise eine neue Welle der Parasitämie hervorrufen. Durch dieses als antigene Variation bekannte Phänomen können die Parasiten chronische Erkrankungen herbeiführen und über Monate bis hin zu Jahren in einem Wirt überleben. Die harsche Umgebung des Blutstroms bietet aber nicht nur Nachteile; die frei verfügbare Menge an Glukose im Blut ist ausreichend, um den gesamten Energiebedarf der Zellen zu decken. Die BSF besitzt zwar ein Mitochondrium, dieses ist aber metabolisch nicht aktiv. So beziehen die Zellen sämtliche Energie ausschließlich aus der Glykolyse, die in speziellen Kompartimenten, den Glykosomen, abläuft.

Um als Parasit erfolgreich zu sein, muss gewährleistet sein, dass der Wirt so lange wie möglich überlebt, um die Verbreitungschancen zu maximieren. Auch hierbei zeigt sich die erfolgreiche Anpassung der Trypanosomen. Ein bisher nicht identifiziertes Molekül sorgt bei einer hohen Zelldichte dafür, dass die Parasiten im Zellzyklus arretieren und sich zu ST Formen differenzieren. Dieser *Stumpy* induzierende Faktor (SIF) wirkt über einen cAMP-Signalweg und leitet die Differenzierung ein (Reuner et al., 1997; Vassella et al., 1997). Während der Entwicklung von LS- zu ST-Formen kommt es sowohl zu einer Veränderung der Genexpression als auch der Zellmorphologie. Sobald die Zellen das Signal SIF empfangen haben, beginnt der Prozess. Die Zellen verlassen den Zellzyklus und arretieren in der G1-Phase. Es kommt zu einer Akkumulation der mRNA eines bestimmten Oberflächentransporters, dem PAD1 (*Protein Associated with Differentiation*). Dieses Protein ist ein Transporter für Citrat und cis-Aconitat (Dean et al., 2009), die wiederum die Signale für die Differenzierung der ST zur Insektenform sind (Czichos et al., 1986). Es kommt

zwar zu einer Akkumulation der *PAD1* mRNA, nicht jedoch zur sofortigen Expression des Proteins. Zeitlich versetzt beginnt die morphologische Transformation: die Zellen runden sich ab und das Flagellum wird verkürzt. Nun beginnt die Expression des *PAD1* Proteins, wodurch die Zellen endgültig in der Lage sind, vollständig zu differenzieren (MacGregor et al., 2012). Da die ST Formen im Zellzyklus arretiert sind, sind sie nun nicht mehr in der Lage, die Expression des VSGs zu wechseln. Diese prä-adaptierten Formen können dann etwa zwei Tagen im Blut überleben, bis sie durch das Immunsystem getötet werden oder durch Seneszenz sterben. Allerdings werden nicht alle Zellen einer Population zu ST Formen. Ein kleiner Teil bleibt LS, und davon wechselt wiederum nur eine Subpopulation das VSG (MacGregor et al., 2011). Bei der Blutmahlzeit der Tsetsefliege werden somit ST und LS Formen aufgenommen. Es überleben aber nur ST Formen im Mitteldarm der Fliege. Hier angelangt, vollzieht sich die endgültige Differenzierung zur Insektenform, den sogenannten prozyklischen Formen (PZF). Durch die Carboxylate Citrat und cis-Aconitat wird die Expression PZF spezifischer Oberflächenproteine, den Prozyklinen EP und GPEET, induziert und das VSG wird abgeworfen (Gruszynski et al., 2006). Die Morphologie der Zelle verändert sich weiter und der posteriore Teil der Zelle wird elongiert. Auch die flagellare Tasche und der Kinetoplast verändern ihre Positionen und bewegen sich in Richtung Zellmitte. Während dieser Umbauphase wird auch das Mitochondrium aktiviert und die Energiegewinnung stellt sich auf ein respiratorisches System um (Matthews, 2005). Die PZF Trypanosomen treten wieder in den Zellzyklus ein und vermehren sich im Mitteldarm der Tsetsefliege. Von dort aus wandern die Parasiten in die Speicheldrüsen, wo sie sich mit ihrem Flagellum als Epimastigoten festsetzen. Hier bereiten sie sich auf den Wiedereintritt in den Säugerwirt vor. Die Zellen arretieren erneut im Zellzyklus und beginnen wieder, einen VSG Mantel zu bilden. Diese metazyklischen Formen sind die für Säuger infektiösen Stadien und gelangen mit dem Biss der Fliege in subkutanes Gewebe. Dort vermehren sie sich zunächst und verbreiten sich dann über die Lymph- und Blutbahnen im Organismus, womit der Lebenszyklus geschlossen wird.

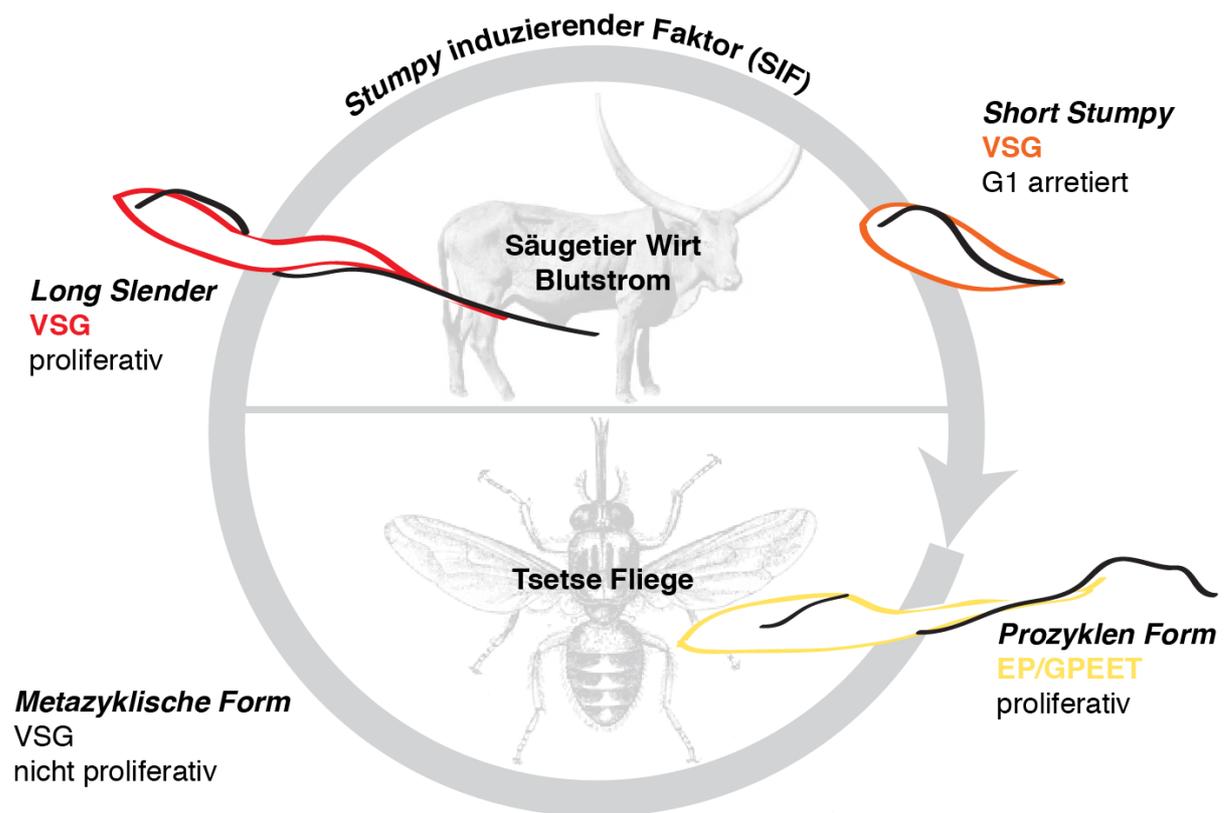


Abbildung 2 Der Lebenszyklus von *T. brucei*. Im Säugetierwirt leben die Parasiten im Blutstrom und sind bedeckt von einem dichten VSG-Oberflächenmantel. Bei hoher Zelldichte reichert sich der SIF an, woraufhin die Zellen zu *Short Stumpy* Formen differenzieren und im Zellzyklus arretieren. Bei der Blutmahlzeit der Tsetsefliege werden die Parasiten mit dem Blut aufgenommen und differenzieren sich im Mitteldarm zu prozyklischen Formen. Diese tauschen den VSG Oberflächenmantel durch die Proteine EP und GPEET aus, treten wieder in den Zellzyklus ein und wandern in die Speicheldrüsen. Dort entwickeln sich aus Epimastigoten die metazyklischen Formen. Diese arretieren erneut im Zellzyklus und beginnen wieder einen VSG Mantel zu bilden und sind somit wieder für den Eintritt in den Säugerwirt vorbereitet.

3.2.3 Die Antigene Variation

Obwohl die Trypanosomen ständig dem Immunsystem ausgesetzt sind, können sie langanhaltende Infektionen mit unterschiedlichen pathologischen Auswirkungen hervorrufen (Barrett et al., 2003). Das Überleben der Trypanosomen im Blut wird durch die antigene Variation gesichert, ein Phänomen, das weit verbreitet ist unter eukaryotischen und bakteriellen Pathogenen (Tabelle 1). In Trypanosomen beinhaltet dies den Wechsel des prädominanten Oberflächenproteins, dem VSG. Dies ist ein ca. 55 kDa großes, N-glykosyliertes Protein, das durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden ist (Ferguson et al., 1985). Es wird immer nur ein VSG zur Zeit exprimiert und die Proteine bilden einen dichten, homogenen Oberflächenmantel. Die VSGs selbst sind hoch immunogen und rufen eine schnelle Immunantwort hervor, die die Population rasch dezimiert (Engstler et al., 2007). Mit einer Rate von etwa 10^{-3} /Zelle/Zellteilung (Turner & Barry, 1989) findet jedoch ein stochastischer Wechsel der VSG Expression statt, wodurch eine Subpopulation mit einem immunologisch unterschiedlichem VSG-Mantel überlebt und eine neue Welle der Parasitämie auslöst. Die Wechselrate in laboradaptierten Stämmen wurde im Gegensatz zu der *in vivo* beobachteten Rate auf 10^{-4} - 10^{-6} bestimmt (Aitchison et al., 2005). Es ist bis heute nicht bekannt, worin dieser Unterschied begründet ist.

Im Genom von *T. brucei* sind >1600 unterschiedliche VSG-Gene kodiert. Von diesen liegen ~80 % in subtelomeren Bereichen der 11 diploiden Megabasen-Chromosomen in sogenannten stillen VSG Einheiten (Berriman et al., 2005). Die VSGs können jedoch nur aus speziellen Loci transkribiert werden, den Blutstromformexpressionsstellen (BES). Diese BESs sind an den Telomeren der Megabasen-Chromosomen lokalisiert, von denen immer nur eine zu einer bestimmten Zeit transkriptionell aktiv ist. Die BESs sind ~50 kbp lange Einheiten, die, neben dem telomernahen VSG, Expressionsstellen-assoziierte-Gene (ESAGs) enthalten. Die Sequenzen der ESAGs variieren zwischen den einzelnen BESs, ebenso wie die Anzahl und Zusammensetzung dieser Gene (Hertz-Fowler et al., 2008). Die gesamte Transkriptionseinheit wird von einem einzigen Promoter gesteuert, der von einer RNA Polymerase I (Pol I) erkannt wird. Die Transkription ist somit polyzistronisch, und durch eine co-transkriptionelle *trans*- und *cis*-

Spleißreaktion wird die prä-mRNA prozessiert (Liang et al., 2003). Zusätzlich zu den Megabasen-Chromosomen besitzt *T. brucei* aneuploide Minichromosomen, die mit bis zu 100 Kopien pro Zelle vorkommen. Auf diesen liegen ebenfalls *VSG* Gene, wodurch das Repertoire für die Antigene Variation noch vergrößert wird (Wickstead, 2004).

Tabelle 1 Eukaryotische und bakterielle Pathogene mit antigener Variation.

(nach Morrison et al., 2009)

Pathogen	Infektionsstrategie	Oberflächen Antigen ^a	Anzahl der Gene im Archiv	Wechsel-Mechanismus
<i>T. brucei</i>	Extrazellulär	VSG	~1600	Rekombination und Transkription
<i>P. carinii</i>	Intrazellulär	MSG	~80	Rekombination
<i>G. lamblia</i>	Extrazellulär	VSP	~150	Transkription
<i>B. bovis</i>	Intrazellulär	VES1	~150	Rekombination und Transkription
<i>P. falciparum</i>	Intrazellulär	PfEMP1	~60	Transkription
<i>B. hermsii</i>	Extrazellulär	VLP/VSP	~60	Rekombination
<i>B. burgdorferi</i>	Extrazellulär	VLS	~150	Rekombination
<i>N. gonorrhoeae</i>	Extrazellulär	PIL	~20	Rekombination
<i>A. marginale</i>	Intrazellulär	MSP2	>10	Rekombination

^a VSG, *Variant Surface Glycoprotein*; MSG, *Major Surface Glycoprotein*; VSP, *Variant Specific Surface Protein*; VES, *Variant Erythrocyte Surface Antigen*; PfEMP1, *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 (var Gene)*; VLP/VSP, *Variable Large Protein/Variable Small Protein*; VLS, *Vmp-like Sequence*; PIL, *Type IV Pilus*; MSP2, *Major Surface Protein 2*.

Bei einem Wechsel der *VSG* Expression kann zwischen zwei basalen Mechanismen unterschieden werden: (i) rekombinatorische Wechsel, wobei neue *VSG* Gene in die aktive BES kopiert werden und (ii) transkriptionelle Wechsel, wobei die Transkription von der aktiven BES zu einer vorher inaktiven wechselt (*in situ* Wechsel) (Abbildung 3).

Bei den rekombinatorischen Wechseln kann man wiederum zwischen drei Mechanismen unterscheiden, die in einer gewissen Hierarchie im Laufe einer Infektion auftreten. Dabei werden telomerische *VSGs* in der frühen Phase der Infektion aktiviert, gefolgt von inaktiven, subtelomerischen Genen und schließlich

Pseudogene, die zu intakten neuen VSGs zusammengesetzt werden (Thon et al., 1989; Morrison et al., 2005; Marcello & Barry, 2007). Der am häufigsten auftretende Mechanismus ist die Genkonversion. Dabei wird ein funktionelles VSG in die aktive BES kopiert und das vorherige dadurch ersetzt. Als Donor für das neue VSG kann entweder ein Gen aus den stillen VSG Einheiten oder eine inaktive BES dienen. Im Falle einer inaktiven BES als Donor kann der kopierte Bereich bis zum 50 kbp stromaufwärts gelegenen Promoter reichen, was die Duplikation einer vollständigen BES zur Folge hat (Morrison et al., 2009). Der zweite Mechanismus der rekombinatorischen Wechsel ist der reziproke, telomerische VSG Austausch (Pays et al., 1985). Dabei werden ganze Chromosomenenden inklusive der Telomere zwischen einer aktiven und inaktiven BES ausgetauscht. Der dritte Mechanismus sorgt für die Entstehung neuer, funktioneller VSG Gene durch die Kombination verschiedener Pseudogene. Dabei werden kurze, homologe Bereiche innerhalb der kodierenden Sequenzen genutzt, um neue Gene zusammensetzen (Thon et al., 1989). Durch diesen Mechanismus wird somit ein nahezu unendliches Repertoire an neuen VSG Genen bereitgestellt.

Die Grundlage für die antigene Variation stellt die ausschließliche Expression eines von vielen möglichen Antigenen zur Zeit dar. In Trypanosomen gibt es etwa 15 genomische Loci, die BESs, aus denen ein VSG exprimiert werden kann (Hertz-Fowler et al., 2008). Von diesen ist immer nur eine zur Zeit transkriptionell aktiv, während alle anderen "still" sind. Bei den oben beschriebenen rekombinatorischen Mechanismen kommt es hingegen nicht zu einer Änderung des transkriptionellen Status der BESs, sondern als Empfänger für das neue VSG dient immer die aktive BES. Während eines *in situ* Wechsels muss dieser Status jedoch geändert werden und eine "stille" BES muss aktiviert, und die aktive BES inaktiviert werden. Es konnten mittlerweile eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die daran beteiligt sind, den inaktiven Status der BESs aufrechtzuhalten (siehe unten). Eine gezielte Initiation eines transkriptionellen Wechsels war bisher allerdings nicht möglich. Eine weitere offene Frage bezüglich des *in situ* Wechsels ist die nach dem Zweck dieses Mechanismus. Während durch rekombinatorische Wechsel aus einem Archiv von über 1000 Genen geschöpft werden kann, ist die Zahl bei einem *in situ* Wechsel beschränkt auf die Anzahl der BESs.

Wieso sollte dieser Mechanismus also eine Rolle spielen? Die Antwort darauf könnte in den *ESAGs* liegen. Die *ESAGs* 6 und 7 bilden einen heterodimeren Rezeptor für Transferrin, wodurch die Eisenaufnahme der Trypanosomen erfolgt (Steverding et al., 1994). Die Sequenzen variieren leicht zwischen den unterschiedlichen BESs, was zu unterschiedlichen Affinitäten für Transferrine aus verschiedenen Wirten führt. Es wurde vermutet, dass die *ESAGs* in den BESs eine Adaption an verschiedene Wirtsbedingungen ermöglichen (Bitter et al., 1998; Pays et al., 2001; Gerrits et al., 2002; van Luenen et al., 2005). Mittlerweile wurde auch *ESAG4* eine Wirts-Pathogen-Interaktion zugeschrieben (Salmon et al., 2012).

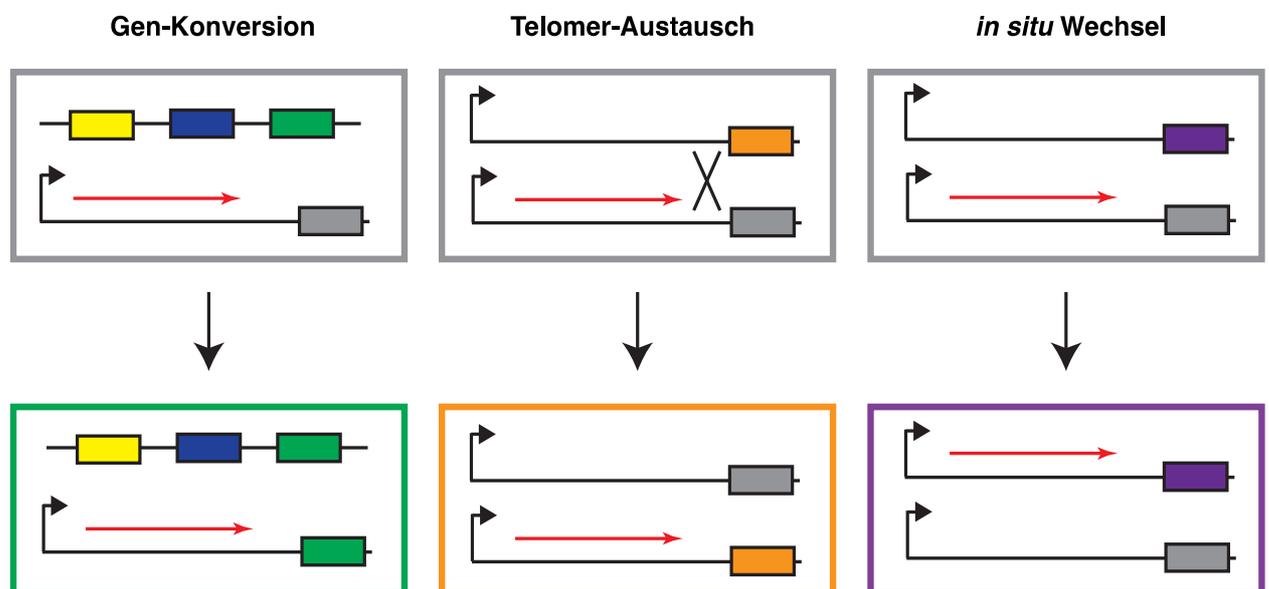


Abbildung 3 Hauptmechanismen der Antigenen Variation in *T. brucei*. Die farbigen Umrandungen entsprechen Trypanosomen, die ein bestimmtes *VSG* (farbige Boxen) aus einer BES exprimieren. Der BES Promoter ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet und die Transkription durch einen roten Pfeil. Stille *VSGs* können entweder in subtelomerischen Einheiten oder in telomerischen BESs liegen. Der Wechsel zu einem neuen *VSG* kann über verschiedene Wege laufen. Bei der Gen-Konversion (links) wird ein stilles *VSG* in die aktive BES kopiert. Bei einem Telomer-Austausch (Mitte) werden ganze Chromosomenenden zwischen einer stillen und der aktiven BES ausgetauscht. Während eines *in situ* Wechsels (rechts) wird eine neue BES aktiviert und die alte inaktiviert (nach Taylor & Rudenko, 2006).

3.3 Monoallele Genexpression

Die monoallele Expression von Oberflächenproteinen ist ein weit verbreitetes Phänomen, wenn phänotypische Variationen hervorgebracht werden müssen. Der Malaria Parasit *Plasmodium falciparum* exprimiert nur eines von ~60 *var* Genen. Jedes *var* Gen kodiert für eine andere Version des Oberflächenproteins PfEMP1, das für die Anhaftung der befallenen Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße verantwortlich ist (Baruch et al., 1995; J. D. Smith et al., 1995; Su et al., 1995; Gardner et al., 2002). Die monoallele Expression der *var* Gene beruht auf Intron Sequenzen, die sich nahe eines jeden *var* Promotors befinden. Diese DNA Elemente beeinflussen den transkriptionellen Status des entsprechenden Promotors und sind dafür verantwortlich, dass dieser inaktiviert wird (Dzikowski et al., 2006; Frank et al., 2006; Dzikowski et al., 2007). Die Paarung eines *var* Promotors mit einem Intron induziert die Inaktivierung des Promotors, das über mehrere Generationen stabil ist (Swamy et al., 2011). Dies lässt darauf schließen, dass epigenetische Markierungen für die Aufrechterhaltung der monoallelen *var* Genexpression eine Rolle spielen.

Monoallele Expression findet sich aber nicht nur in Protozoen, sondern auch in Säugetieren. Die für die Antikörperproduktion zuständigen B-Zellen exprimieren nur einen funktionellen B-Zell-Rezeptor von einem der beiden Immunoglobulin (Ig)-Allelen. Während der Reifung der B-Zellen kommt es zunächst nur an einem Allel zu einem geordneten Rekombinationsprozess, der sogenannten V(D)J-Rekombination. Entsteht dabei kein funktioneller Rezeptor, so wird die Rekombination auch auf dem anderen Allel durchgeführt. Dieser Prozess wiederholt sich solange bis auf einem Allel ein funktioneller Rezeptor gebildet wird (Zusammengefasst in Jung & Alt, 2004). Die Expression dieses Rezeptors an der Zelloberfläche löst dann eine negative Rückkopplung aus, die die weitere Rekombination auf dem anderen Allel inhibiert (Hewitt et al., 2009). Die Transkription beider Allele wird hierbei allerdings nicht beeinflusst, und so kommt es zur bi-allelischen Transkription, wobei aber nur eine funktionelle mRNA gebildet wird (Sonoda et al., 1997).

Im Zentralnervensystem der Säugetiere sind olfaktorisch-sensorische Neuronen (OSN) für die Perzeption verschiedener Geruchsstoffe verantwortlich. Dabei exprimiert jedes Neuron nur einen einzigen Odorant Rezeptor (OR) aus einer Familie von etwa 1200 Genen (Buck & Axel, 1991; Chess et al., 1994; Serizawa et al., 2004).

Bestimmte DNA-Sequenzen, die H- und P-Elemente, beeinflussen die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmtes *OR* Gen ausgewählt wird, nicht aber die transkriptionelle Aktivität (Khanet al., 2011). Bevor ein *OR* Gen ausgewählt wird, sind alle Gene inaktiv und als Heterochromatin markiert (Magklara et al., 2011). Während der Entwicklung zum reifen Neuron werden durch eine limitierte enzymatische Aktivität sukzessive Histonmethylierungen stochastisch von allen Allelen entfernt bis ein *OR* Gen transkriptionell aktiv wird. Wird ein funktioneller Rezeptor exprimiert, verhindert auch hier eine negative Rückkopplung die weitere Demethylierung von Histonen, wodurch kein weiteres Allel aktiviert wird (Serizawa et al., 2003; Lewcock & Reed, 2004; Shykind et al., 2004). Wie der Odorantrezeptor die Rückkopplung auslöst ist nicht bekannt. Allerdings wurde die Histon-Demethylase LSD1 als limitierendes Enzym identifiziert, das durch die Aktivität der Adenylatcyclase *Adyc3* inhibiert wird (Lyons et al., 2013).

Diese Beispiele zeigen, wie unterschiedlich die regulatorischen Mechanismen zur Kontrolle monoalleler Genexpression sind. Während in B-Zellen die Rekombination von DNA-Abschnitten und auf diese Weise die Bildung eines funktionellen Gens verhindert wird, spielt die Chromatinstruktur bei der Kontrolle der Odorantrezeptoren und der *var* Gene eine entscheidende Rolle. Die *var* Gene unterliegen zudem einer transkriptionellen Kontrolle, wobei DNA-Sequenzen die Aktivität eines Promoters inhibieren. Die Wahl eines Odorantrezeptors und eines Ig-Allels ist eine finale Entscheidung. Unter normalen Umständen findet kein Wechsel zu einem anderen Allel mehr statt. Die *var* Genexpression jedoch ist ein dynamischer Prozess, so dass stochastisch eines der Allele der Repression entkommen muss.

3.3.1 Die monoallele VSG Expression in *T. brucei*

Die monoallele Expression eines Oberflächenproteins wurde zuerst in Trypanosomen beschrieben (Hoeijmakers et al., 1980). Trypanosomen exprimieren nur ein VSG zur Zeit aus einer von 15 telomerischen BESs. Gene in der Nähe von Telomeren sind oft einer Repression ausgesetzt, ein Phänomen bekannt als Telomer- Positionseffekt (TPE). Dieser wurde zuerst in Hefe entdeckt, mittlerweile aber in einer Vielzahl von Organismen beschrieben, darunter auch Trypanosomen (Gottschling et al., 1990; Glover & Horn, 2006; Yang et al., 2009). Der Verlust des Telomer-Bindeproteins RAP1 führt in Trypanosomen zu einer schwachen Derepression aller inaktiven BES-assoziierten VSGs, nicht aber von VSGs in den stillen Archiven. Es konnte allerdings keine vollständige Aktivierung stiller BESs erreicht werden (Yang et al., 2009). Dies deutet vielmehr darauf hin, dass die Telomerstruktur auch bei der monoallelen VSG Expression eine wichtige Rolle spielt, allerdings nicht die alleinige Erklärung dafür ist. Eine der 15 BESs muss zudem dieser Repression entgehen, um eine homogene VSG Expression zu gewährleisten. Wie diese monoallele Expression kontrolliert wird, ist nicht bekannt. Obwohl an allen BES Promotoren die Transkription gleichermaßen initiiert wird, ist sie nur in der aktiven BES vollständig prozessiv (Vanhamme et al., 2000). Die Kontrolle erfolgt somit nicht, wie bei der *var* Genexpression in *P. falciparum*, durch die Transkriptionsinitiation, sondern durch eine Inhibition der Prozessivität.

Die aktive BES ist mit einer extranukleolären Akkumulation der Pol I assoziiert, die als *Expression Site Body* (ESB) bezeichnet wird (Navarro & Gull, 2001). Ob der ESB sich um die aktive BES herum bildet, oder ob er alle bis auf eine BES ausschließt, ist nicht bekannt, ebenso wie seine molekulare Zusammensetzung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Schwesterchromatiden der aktiven BES nach der Replikation in einem einzigen ESB verbleiben. Dort werden sie von einem Cohesin-Komplex zusammengehalten und trennen sich erst kurz vor der Mitose. Die partielle Depletion dieses Komplexes durch RNAi führt zu einer verfrühten Trennung der Chromatiden, wodurch eine der beiden BES nicht länger mit dem ESB assoziiert bleibt. Dies wiederum führt zu einer erhöhten *in situ* Wechselrate (Landeira et al., 2009). Der ESB spielt also eine wichtige Rolle bei der Weitergabe der aktiven BES an die Tochterzelle.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der aktiven und den inaktiven BES besteht in der Chromatinstruktur. Während die aktive BES nahezu frei von Nukleosomen ist, weisen alle anderen eine kompakte Heterochromatinstruktur auf (Figueiredo & Cross, 2010; Stanne & Rudenko, 2010). Es wurden mittlerweile eine Reihe von chromatinmodifizierenden Enzymen identifiziert, die eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des inaktiven Status der BES spielen. Das chromatinumformende Enzym TbISWI gehört zur ISWI Familie der SWI2/SNF2-verwandten Proteine und wurde als erstes Protein im Zusammenhang mit der BES Inaktivierung identifiziert (Hughes et al., 2007). Die Depletion dieses Enzyms durch RNAi führt zu einer 30-60-fachen Derepression von stillen BES in BSF und zu einer 10-17-fachen Derepression in PZF. Allerdings konnte nur eine Derepression von stillen BES Promotoren beobachtet werden, jedoch keine prozessive Transkription bis hin zum Telomer und somit auch keine Derepression von *VSGs*.

Die Histon-Methyltransferase TbDot1b scheint dagegen einen stärkeren Einfluss auf die monoallele Expression zu haben. Dieses Enzym katalysiert Trimethylierungen an dem Histon H3 am Lysin 76 und ist nicht essentiell in *T. brucei*, jedoch notwendig für die vollständige Differenzierung zur PZF (Janzen et al., 2006). TbDot1b depletierte BSF Trypanosomen (Δ dot1b) weisen eine 10-fache Derepression von BES-assoziierten *VSGs* auf (Figueiredo et al., 2008). Ferner wurde gezeigt, dass TbDot1b bei der Kinetik von *in situ* Wechseln eine Rolle spielt. Dazu wurde in den Δ dot1b Zellen auf den Wechsel zu einer bestimmten BES selektiert und beobachtet, dass die alte BES noch bis zu 50 Tage aktiv blieb. In den Kontrollzellen war der Wechsel bereits nach 9 Tagen vollständig abgeschlossen. Zudem wurde keine erhöhte Wechselrate in den Δ dot1b Zellen beobachtet. TbDot1b ist somit ebenso für die Aufrechterhaltung der *VSG* Repression verantwortlich wie für die Kinetik eines transkriptionellen Wechsels. Das chromatinumbauende Enzym TbSpt16 konnte ebenfalls mit der Kontrolle der monoallelen Expression in Zusammenhang gebracht werden. Es bildet eine Untereinheit des FACT Komplexes, dessen Funktion, anders als TbISWI, ATP-unabhängig ist. Der FACT (*facilitates chromatin transcription*)-Komplex ist ein Histon-Chaperon und lagert entweder Kernhistone an DNA an oder entfernt ein H2A-H2B Dimer aus den Nukleosomen (Belotserkovskaya et al., 2004). RNAi gegen TbSpt16 führt neben einer Derepression von inaktiven BES Promotoren

auch zu einer Repression der aktiven BES. Es konnte aber auch hier keine prozessive Expression von inaktiven VSGs beobachtet werden (Denninger et al., 2010).

Ebenfalls zu einer nicht prozessiven BES Derepression führt die Depletion von den Histon-Chaperonen TbCaf1-1b und TbAsfa1, sowie dem Histon H3 (Alsfor & Horn, 2012). In allen drei Fällen führt die Depletion zu einer Akkumulation von Zellen in der S-Phase, wobei sich jedoch Unterschiede in der BES Derepression zeigen. H3 und Caf-1b depletierte Zellen zeigen eine 10-fache Derepression eines stillen BES Promotors, sobald sie über die S-Phase hinausgehen. Nach Asfa1 RNAi weisen dagegen alle Zellzyklusstadien eine Derepression auf. Dies lässt vermuten, dass die Aufrechterhaltung der reprimierenden Chromatinstruktur ebenfalls zellzyklusabhängig ist und insbesondere mit der DNA-Replikation in Zusammenhang steht. Belege dafür liefern Untersuchungen am sogenannten *Origin Recognition Complex* (ORC) in *T. brucei*. Dieser Heterohexamer-Komplex bindet an DNA-Replikationsursprünge und rekrutiert weitere Proteine, die die DNA Replikation initiieren (Bell, 2002; DePamphilis et al., 2006). Hierbei zeigte sich, dass TbOrc1 sowohl für die nukleäre DNA Replikation als auch für die Repression BES assoziierter VSGs wichtig ist (Benmerzouga et al., 2012). Nach der RNAi konnte ein Anstieg an inaktiven VSG mRNAs beobachtet werden, und sogar die Expression mehrerer VSGs auf der Zelloberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass TbOrc1 zwar an Telomeren bindet, allerdings unabhängig von den bekannten *T. brucei* Telomer-Bindeproteinen RAP1 und TRF. Interessanterweise wurde zudem eine erhöhte *in situ* Wechselrate beobachtet, was für eine Beteiligung von TbOrc1 an der Kontrolle der monoallelen Expression spricht. Ob diese Funktion jedoch unabhängig von der DNA Replikation ist, ist bisher unklar. Eine Derepression von telomerischen, stillen VSG Genen konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn ein *Mini-Chromosome Maintenance* (MCM) Bindeprotein, TbMCM-BP, ausgeschaltet wurde. Das TbMCM-BP bindet an Proteine des MCM-Komplexes, der ebenfalls Teil des DNA Replikationkomplexes ist (H.-S. Kim et al., 2013). Die Derepression beschränkt sich in diesem Fall jedoch nicht nur auf VSGs; Pol I transkribierte, PZF-spezifische Gene wurden ebenfalls dereprimiert. Die unterschiedliche Chromatinstruktur zwischen den inaktiven und der aktiven BES scheint eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des stillen Zustandes der

BES spielen. Zusätzlich scheint ein Zusammenspiel von DNA-Replikation, Zellzyklus und Chromatinveränderungen unabdingbar für die monoallele Expression zu sein. Trotz der vielen identifizierten Faktoren ist es bisher jedoch nicht gelungen den Mechanismus der Initiation der BES Inaktivierung aufzuklären.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Enzyme und Kits

Enzyme

Die verwendeten Endonukleasen, DNA-modifizierenden Enzyme, DNA-Polymerasen und Ligasen wurden von Thermo Scientific bezogen. Die Hersteller von besonderen Enzymen sind im Text angegeben.

Kits

Basic Parasite Kit 2	Lonza
Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit	Life Technologies
DecaLabel DNA labeling Kit	Thermo Scientific
NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit	Macherey-Nagel
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific

4.1.2 Oligonukleotide

In Tabelle 2 sind die verwendeten Oligonukleotide mit Namen, Sequenz und dem entsprechenden Produkt und dem Hersteller aufgelistet. Die Verwendung der einzelnen Oligonukleotide ist in den entsprechenden Textabschnitten in Kapitel 5 aufgeführt.

Tabelle 2 In dieser Arbeit für Klonierungen verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Produkt	Hersteller
CFP_U.HindIII ^a	TTGAAGCTTAATGGTGAGCAAGGGCGAG		MWG
04GFP_BamHI_L ^a	GACCCTGGATCCAATTACTTGTACAGCTC		MWG
M1.63'UTRBgIII_U	GGCCTTGAGATCTTAATTTTCCCC		MWG
M1.6_full Lower	CTGGATCCCTCCTACCTAGCTACC	GFP-198	MWG
ESAG1_fw	TTGTGTTGATGCATG		Sigma Aldrich
ESAG1_rev	TCGGTCTTGGTTTAG	ESAG1	Sigma Aldrich
ESAG2_fw	GAAATAGTGATTGCCG		Sigma Aldrich
ESAG2_rev	CAAACCTCAGCTAATGC	ESAG2	Sigma Aldrich
ESAG3_fw ^b	AAAAGCTTTCCTTCAAGATGAAGAAGC		Sigma Aldrich
ESAG3_rev ^b	AAGGATCCAAACAAGTCATTCTCCTTGACC	ESAG3	Sigma Aldrich
ESAG6/7_fw ^b	AAAAAGCTTGTTTTGGTTTGTGCTGTTGG		Sigma Aldrich
ESAG6/7_rev ^b	AAAGGATCCATACTTCCGCACCCAAGC	ESAG6/7	Sigma Aldrich
ESAG8_fw	GCACTACGTGATCTGGAAGC		Sigma Aldrich
ESAG8_rev	CATAGAGCACCCCTCAAGTGG	ESAG8	Sigma Aldrich
ESAG12_fw	AGCGGTGTCAATATTC		Sigma Aldrich
ESAG12_rev	AGGAGGAAGGAGTTTG	ESAG12	Sigma Aldrich
tubulin_fw	GTA AACACTAGTTTAAGC		MWG
tubulin_rev	ATAAGCTTTAAATAAATAGAAGTG	β-Tubulin	MWG
tbRAP1_fw	TAGGATGACCGACGTTGACG		MWG
tbRAP1_rev	TTATTGTGGCGCTTTCGAAG	RAP1	MWG

^aOligonukleotide aus der Arbeit von Jamin Jung (Doktorarbeit).

^bOligonukleotide aus der Arbeit von Sebastian Markert (Masterarbeit).

4.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper für Western und Protein Dot Blot Analysen

anti-VSG121

Kaninchen, polyklonal, 1:1000 (M. Carrington, Cambridge, UK)

anti-VSG221 C-Terminus

Kaninchen, polyklonal, 1:5000 (M. Carrington, Cambridge, UK)

anti-PFR L13D6

Maus, monoklonal, 1:20 (P. Bastin, Paris, Frankreich)

anti-GFP

Kaninchen, polyklonal, 1:1000 (Roche)

Sekundäre Antikörper für Western und Protein Dot Blot Analysen

anti-Kaninchen IgG IRDye800-Konjugat

Ziege, polyklonal, 1:10.000 (LI-COR Biosciences)

anti-Maus IgG IRDye700-Konjugat

Ziege, polyklonal, 1:10.000 (LI-COR Biosciences)

Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz Analysen

anti-VSG121

Maus, monoklonal, 1:100 (M. Navarro, Granada, Spanien)

anti-VSG221

Kaninchen, polyklonal, 1:100 (M. Engstler, Würzburg, Deutschland)

anti-EP TRBP1/247

Maus, monoklonal, 1:500 (Cedar Lane Laboratories)

anti-PAD1

Kaninchen, polyklonal, 1:100 (K. Matthews, Endinburgh, UK)

anti-BrdU

Maus, monoklonal, 1:500 (Sigma Aldrich)

Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz Analysen

anti-Maus IgG Alexa488-Konjugat

Ziege, polyklonal, 1:500 (Life Technologies)

anti-Kaninchen IgG Alexa488-Konjugat

Ziege, polyklonal, 1:500 (Life Technologies)

anti-Kaninchen IgG Alexa594-Konjugat

Ziege, polyklonal, 1:500 (Life Technologies)

4.1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt) bezogen. Die Hersteller von speziellen Reagenzien und Feinchemikalien sind im Text angegeben.

4.1.5 Kulturmedien

HMI9 zur Kultivierung von Trypanosomen (nach Hirumi und Hirumi, 1989)

Mengen für 1 l Medium: 17,66 g Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM), 3,024 g NaHCO₃, 136 mg Hypoxanthin, 82,2 mg Bathocuproinsulfonat, 14 µl β-Mercaptoethanol, 39 mg Thymidin, 100.000 U Penicillin, 100 mg Streptomycin, 182 mg Cystein, 10 % (v/v) fötales Kälber Serum (FKS; Sigma Aldrich)

Luria-Bertani (LB) Medium zur Kultivierung von E. coli

Mengen für 1 l Medium: 10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7

4.1.6 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei Prozentangaben um das Verhältnis von Masse zu Volumen. Volumenprozent sind durch das Kürzel (v/v) gekennzeichnet.

DNA Analysen

TAE

40 mM Tris-HCl, 40 mM Essigsäure, pH 8,0, 1 mM EDTA

DNA Auftragspuffer (10x)

0,1 M EDTA, pH 8,0, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 40 % Saccharose

RNA Analysen

Denhardts Lösung (DEN, 50x)

1 % Ficoll 400, 1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % BSA

RNA Puffer (50x)

0,5 M NaH₂PO₄, pH 6,9

SSC (20x)

3 M NaCl, 0,3 M tri-Natrium-Citrat, pH 7,0

Northern Blot Hybridisierungslösung

5xSSC, 5xDEN, 0,1 % SDS, 0,1 % tetra-Natrium-Pyrophosphat, 0,01 % Heparin

Northern Blot Waschlösung

0,1 % SDS, 0,1xSSC

Glyoxal-Lösung

75,4 % (v/v) DMSO, 21,5 % (v/v) Glyoxal (deionisiert), 15 mM NaH₂PO₄, pH 6,9

Protein Analysen

PBS

137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,14 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM HK₂PO₄, pH 7,4

TDB

5 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 20 mM Glucose

2x Lämmli-Probenpuffer

120 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Lämmli-Laufpuffer

25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Trenngel (12,5 %)

2 ml Acrylamid-Lösung (30 %; 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid), 1,5 ml Trenngel Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS), 2,5 ml H₂O, 20 µl 10 % APS, 5 µl TEMED

Sammelgel

1 ml Acrylamid-Lösung, 1,8 ml Sammelgel Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS), 4,5 ml H₂O, 37 µl 10 % APS, 7 µl TEMED

Towbin Western Blot Puffer

25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % (v/v) Methanol

Coomassie Färbelösung

0,25 g/l Coomassie R250, 10 % (v/v) Isopropanol, 5 % (v/v) Essigsäure

Coomassie Entfärbelösung

10 % (v/v) Isopropanol, 5 % (v/v) Essigsäure

4.1.7 Besondere technische Geräte

AMAXA Nucleofector II	Lonza
Bioruptor plus	Diagenode
FACScalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
iMIC	Till Photonics
Infinite M200 Plate Reader	Tecan
Odyssey Infrarot Scanner	LI-COR Biosciences
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems

4.1.8 Computerprogramme

4Peaks	Macentosj
CellQuest Pro	BD Biosciences
CLC Main Workbench 6	CLC bio
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging
iControl	Tecan
ImageJ 64	rsbweb.nih.gov/ij/
LA Aquisition	Till Photonics
Odyssey	LI-COR Biosciences
Papers	Macentosj
Prism 5	GraphPad Software

4.1.9 Plasmide

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten trypanosomalen Expressionsvektoren, deren Bezeichnung, Herkunft, genomischer Integrationslocus, Expression und das Resistenzgen aufgelistet. Die Klonierungen zur Herstellung der einzelnen Konstrukte aus diesen Ausgangsvektoren sowie die Generation der entsprechenden Zelllinien, ist im jeweiligen Abschnitt von Kapitel 6 beschrieben.

Tabelle 3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren.

Vektor	Bezeichnung	Herkunft	Locus	Expression	Resistenz
pLew82v4	pRS	G. Cross	RS	induzierbar	<i>BLE</i>
pkD4	pEStel	Muñoz-Jordán et al., 1996	221 BES, Tel	konstitutiv	<i>NEO</i>
p3845	pESprom	A. Schwede	221 BES, Prom	konstitutiv	<i>BLAS</i>
p4231	p4231	J. Sunter und M. Carrington	β -Tubulin	konstitutiv	<i>BLAS</i>
pTsarib(puro)	pRib	M. Günzel	rDNA Promoter	konstitutiv	<i>PUR</i>
pTub(puro)	pTub	M. Günzel	β -Tubulin	konstitutiv	<i>PUR</i>
p2T7-177	p2T7	Wickstead et al., 2002	177bp-Region, MC	induzierbar	<i>BLE</i>

RS, ribosomale Zwischenregion; Tel, Telomer-proximal; Prom, Promoter-proximal; MC, Minichromosomen; *BLE*, Phleomyzin Resistenz; *BLAS*, Blastizidin Resistenz; *NEO*, Neomycin Resistenz; *PUR*, Puromycin Resistenz.

Bakterielle Klonierungsvektoren

pBluescript SK(+) Stratagene
pJet1.2 Thermo Scientific

4.1.10 Trypanosomen

Wildtyp Stämme

MITat1.6 (im Folgenden als 121^{wt} bezeichnet)

Molteno Institut Trypanozoon Antigen Typ 1.6, Bestand 427, Klon 121, Blutstromform (G. Cross, 1975).

Transgene Stämme

MITat1.2 13-90 (im Folgenden als 221^{ES} bezeichnet)

Diese Zelllinie basiert auf MITat1.2 Blutstromformen (G. Cross, 1975) und exprimiert konstitutiv eine T7 RNA-Polymerase und einen Tetrazyklin-Repressor (Wirtz et al., 1999). Dadurch wird es ermöglicht, T7 Promoter gesteuerte Vektoren Tetrazyklin-induzierbar zu exprimieren. Die Zelllinie wurde kontinuierlich mit 5 µg/ml Hygromycin und 2,5 µg/ml Neomycin (G418) kultiviert.

MITat1.2 Dot1b^{-/-} (im Folgenden als Δdot1b bezeichnet)

Diese Zelllinie basiert auf 221^{ES}, wobei das Hygromycin Resistenzgen deletiert wurde (Wirtz et al., 1999). Zusätzlich wurden beide Allele des Gens *tbDOT1B* (Tb927.1.570) deletiert und durch Resistenzgene gegen Phleomycin und Hygromycin ersetzt (Janzen et al., 2006). Die Zelllinie wurde kontinuierlich mit 2,5 µg/ml G418 kultiviert.

MITat1.6 SMOX (im Folgenden als 121^{ES} bezeichnet)

Diese Zelllinie basiert auf 121^{wt} und exprimiert konstitutiv eine T7 RNA Polymerase und einen Tetrazyklin-Repressor durch die Integration des Plasmids pSMOX (Poon et al., 2012). Diese Zelllinie wurde von C. Goos im Rahmen einer Masterarbeit hergestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit *T. brucei*

Kultivierung von Blutstromformen

BSF Trypanosomen wurden in HMI-9 bei 37° C unter 5 % CO₂ Atmosphäre mit H₂O-Sättigung kultiviert. Dabei wurde die Zelldichte regelmäßig mit Neubauer-Zählkammern bestimmt und durch Verdünnung unter 1x10⁶ Zellen/ml gehalten. Benötigte Antibiotika wurden nach Verdünnung ergänzt. Grundsätzlich wurden BSF Trypanosomen für 10 min bei 1.400 x g und 4° C zentrifugiert.

Einfrieren und Auftauen von Trypanosomen

4x10⁶ Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl gekühltem HMI-9 resuspendiert und mit 500 µl- gekühltem 2x-Einfriermedium (80 % HMI-9, 20 % Glycerol) gemischt und bei -80° C eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die Stabilate bei -150° C gelagert. Das Auftauen der Stabilate erfolgte in einem 37° C Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml HMI-9 überführt und für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in dem gewünschten Volumen an Medium aufgenommen und kultiviert. Nach 1 h wurde die Zellzahl bestimmt und benötigte Antibiotika hinzugegeben.

Transfektion von BSF

Die Transfektion von BSF erfolgte mit dem *AMAXA Nucleofector II* und der *Basic Parasite Solution 2* mit dem Programm X-001. Dazu wurden 3x10⁷ Zellen bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 100 µl Transfektionslösung resuspendiert. Die Zellen wurden mit 10 µg linearisierter Plasmid- DNA gemischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und transfiziert. Die Zellen wurden dann in 30 ml vorgewärmtes Medium überführt, seriell 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und in Mikrotiter-Platten kultiviert. Nach 6 bis 12 h wurde die finale Antibiotikaselektion hinzugefügt und klonale Populationen konnten nach 5 bis 7 Tagen isoliert werden.

Immunofluoreszenz Analysen

Für die Detektion von VSG wurden 1×10^7 Trypanosomen zentrifugiert und in 1 ml TDB gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und mit 1 ml 4 % Formaldehyd/0,1 % Glutaraldehyd gemischt und bei 4° C für mindestens 2 h fixiert. Die fixierten Zellen wurden 2x mit 1 ml PBS gewaschen und in 100 μ l PBS resuspendiert. Davon wurden 20 μ l auf poly-L-Lysin- beschichtete Objektträger (Polysin Objektträger, Menzel-Gläser) gegeben und für 1 h setzen gelassen. Alle Inkubationsschritte wurden in einer abgedeckten Feuchtkammer durchgeführt. Die Objektträger wurden dann mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 % BSA/PBS für 1 h inkubiert. Nach 2x5 min waschen in PBS wurden die Primärantikörper in 0,1 % BSA/PBS auf die Proben gegeben und 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen für 2x5 min in PBS wurden die Sekundärantikörper auf die Proben gegeben. Nach 1 h wurden die Proben erneut gewaschen, mit einer DAPI-Lösung (10 μ g/ml) für 5 min inkubiert und anschließend mit 80 % Glycerin/PBS eingebettet.

Für die Detektion von PAD1 wurden 3×10^6 Trypanosomen zentrifugiert und in 1 ml TDB gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100 μ l vPBS (PBS mit 45,9 mM Saccharose und 10 mM Glukose) resuspendiert, mit 100 μ l 6 % Formaldehyd in 0,1 M HEPES gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde die Suspension auf 5 ml mit vPBS aufgefüllt, für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 100 μ l vPBS resuspendiert und auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger für 20 min gegeben. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,05 % Triton X-100 PBS für 20 min permeabilisiert, 2x5 min in PBS gewaschen und für 45 min mit 20 % FKS/vPBS inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 20 % FKS/vPBS verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Objektträger wieder 2x5 min in PBS gewaschen, der Sekundärantikörper wie zuvor verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Färbung mit DAPI und die Einbettung erfolgten wie bereits oben beschrieben.

Die Detektion von EP1 erfolgte in Suspension. Hierfür wurden 2×10^7 Trypanosomen zentrifugiert, 2x in TDB gewaschen und wie oben beschrieben in 2 % Formaldehyd/0,05 % Glutaraldehyd fixiert. Die Zellen wurden 2x in 1 ml PBS gewaschen, für 1 h in 1 % BSA/PBS inkubiert, mit 0,1 % BSA PBS gewaschen und in

einem möglichst kleinen Restvolumen resuspendiert. Der Primärantikörper wurde in 0,1 % BSA/PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 1 h wurden die Zellen 2x in 0,1 % BSA/PBS gewaschen und wie zuvor mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach 2x waschen in PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS bis zur weiteren Analyse lichtgeschützt bei 4° C gelagert.

5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) Markierung von DNA

Für die Markierung neu synthetisierter DNA wurde das *Click-iT Alexa Fluor 488 Imaging Kit* (Life Technologies) verwendet und dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Dazu wurden Kulturen bei einer Dichte von $5-8 \times 10^5$ Zellen/ml mit 300 μ M EdU für 4 oder 18 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, in TDB gewaschen und mit 2 % Formaldehyd bei 4° C für 2 h fixiert. Anschließend wurden sie mit 0,1 % Triton-X100/PBS für 10 min permeabilisiert und in PBS gewaschen. Der *Click-iT Reaktions-Mix* wurde nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt:

1X Click-iT Reaktionspuffer	430 μ l
CuSO ₄	20 μ l
Alexa Fluor 488 Azid	1.2 μ l
Reaktionspuffer Additiv	50 μ l
Gesamtvolumen	500 μ l

Die Zellen wurden nach dem Waschen in dem Gesamtvolumen resuspendiert und 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie erneut in PBS gewaschen, die DNA mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

5-Bromouridin 5'-Triphosphat (BrUTP) Markierung von RNA

Für die Markierung neu synthetisierter RNA wurden 1×10^7 Trypanosomen zentrifugiert und in 1 ml HMI-9 ohne FKS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Transkriptionspuffer (TP) (50 mM HEPES pH 7,9, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 10 mg/ml Leupeptin, 80 U/ml RNase Inhibitor (Roche), 0,5 mM EGTA) gewaschen und resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μ g/ml Saponin wurde die Suspension für 3 min auf Eis inkubiert und anschließend in 1 ml TP

gewaschen und in 500 μ l TP resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit 2 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP und 0,5 mM BrUTP (Sigma Aldrich) für 15 min in einem Wasserbad bei 33° C inkubiert und direkt mit 4 % Formaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Diese fixierten Zellen wurden in 12 ml vPBS überführt, zentrifugiert und in 100 μ l PBS resuspendiert. Die anschließende Detektion des eingebauten BrUTPs erfolgte durch Immunofluoreszenz mit einem BrdU-Antikörper (Sigma Aldrich).

Bestimmung der Luziferase Enzym-Aktivität

Je nach Expressionsstärke des Luziferase-Gens wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Trypanosomen zentrifugiert und in 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Währenddessen wurden 45 μ l des Luziferase-Substrates (Promega) in 96er Mikrotiterplatten vorgelegt und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 μ l Zellkultur Lyse-Puffer (Promega) resuspendiert und davon sofort 5 μ l zu dem Luziferase-Substrat gegeben und die Lumineszenz mit dem *Tecan Infinite M200* gemessen. Die geeignete Zellzahl wurde zuvor ermittelt, indem die Lumineszenz über 5 min gemessen wurde. Es wurde dann die Zellzahl für die Messungen eingesetzt, bei der die Lumineszenz über die gemessene Zeit konstant blieb.

4.2.2 Arbeiten mit *E. coli*

Verwendete *E. coli* Stämme

E. coli TG1 *recO*

Genotyp: K12 $\Delta(lac-proAB)$ *supE thi hsd D5/F' tra D36 proA⁺B⁺ lac^f Lac Z Δ M15*
recO::Tn5

E. coli TOP10

Genotyp: *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, *Phi80lacZ(del)M15*, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL(SmR)*, *endA1*, *nupG*

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln bei 37° C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht worden ist. Anschließend wurden die Bakterien bei 900 x g und 4° C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 2,5 ml TSS (LB Medium mit 10 % PEG 3350, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂) resuspendiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit der zu transformierenden DNA 30 min auf Eis inkubiert. Für die Transformation von Ligationsprodukten wurden 10 µl des Reaktionsansatzes verwendet, für die Retransformation bereits aufgereinigter Plasmid-DNA wurden 10 ng eingesetzt. Nach einem Hitzeschock von 42° C für 60 sek wurden die Bakterien auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert.

Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden, je nach benötigter Menge und Reinheit, verschiedene Methoden angewandt. Für die Präparation geringer Mengen ohne Anforderungen an die Reinheit wurden 1 ml LB-Medium beimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte dann mittels alkalischer Lyse. Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurde, je nach gewünschter Quantität, mit dem *QIAGEN Plasmid Mini* bzw. *Midi Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert.

4.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.3.1 DNA Analysen

Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proben wurden dazu im Verhältnis 9:1 mit 10x DNA-Ladepuffer gemischt und in 0,8 % (für Fragmente bis 500 bp) oder 1,5 % (für Fragmente unter 500 bp) Agarose

in TAE bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die DNA in einem Wasserbad mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht (312-350 nm) überprüft. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines Größenstandards (*GeneRuler Ladder Mix*, Thermo Scientific) bestimmt.

Extraktion von DNA aus Agarose Gelen

Um UV-induzierte Schäden der DNA zu vermeiden, wurden für die Extraktion vorgesehene Agarose Gele nur bei einer Wellenlänge von 350 nm betrachtet. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit dem *Tecan Infinite M200* bestimmt.

Modifikation von DNA

Zum Auffüllen von 5' Überhängen wurde das große Klenow-Fragment nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Dephosphorylierung von kompatiblen DNA-Enden wurde zu Beginn der Arbeit mit der *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Fermentas) durchgeführt, die später vom Hersteller durch die *FastAP* (Thermo Scientific) ersetzt wurde. Hierbei wurden in beiden Fällen die Herstellerangaben befolgt. Nach den entsprechenden Modifikationen wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese und -extraktion aufgereinigt. Für die Ligation von Vektor- und Insertions-DNA wurde die *T4 DNA Ligase* verwendet. Dabei wurden Vektor und Insertionsfragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt bei einer gesamt DNA-Menge von 100 ng. Die Ligation erfolgte für 2 bis 4 h bei Raumtemperatur und wurde ohne vorherige Aufreinigung direkt für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien verwendet.

Isopropanol-Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol. Nach mehrfachem Invertieren wurde die Probe bei 20.000 x *g* und 4° C für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in dem gewünschten Volumen an ddH₂O aufgenommen. Für die

Transfektion von *T. brucei*-linearisierte DNA wurde ein weiteres Mal mit Ethanol gewaschen, der Überstand in einer Sterilwerkbank abgenommen und das Präzipitat getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in sterilem ddH₂O aufgenommen.

Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die korrekturlesende *Phusion-DNA-Polymerase* (Thermo Scientific) verwendet. Dazu wurden 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide und 10 ng bzw. 1 μg DNA (für Plasmid- bzw. genomischer DNA als Matrize) eingesetzt. Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen wurde den Empfehlungen des Herstellers gefolgt. Die Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft und aufgereinigt. Nach erfolgreicher Ligation in einen bakteriellen Klonierungsvektor (pBlueskript oder pJet1.2) wurde das amplifizierte Fragment durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *GATC Biotech* durchgeführt.

4.2.3.2 RNA Analysen

RNA Extraktion aus *T. brucei*

Für die Extraktion von gesamt RNA wurden 1×10^8 Zellen zentrifugiert und in 1 ml FKS-freiem HMI-9 gewaschen. Der Überstand wurde bis auf ein geringes Restvolumen abgesaugt, die Zellen gut resuspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur endgültigen Präparation wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* von QIAGEN. Dazu wurde die gefrorene Probe in 600 μl RLT Puffer mit 6 μl β -Mercaptoethanol resuspendiert und mit 600 μl 70 % Ethanol gemischt. Das Lysat wurde auf eine Präparationssäule gegeben und 30 sek bei 8.000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und für die spätere Proteinfällung bei 4°C gelagert (siehe 4.2.3.3). Die Präparationssäule wurde mit 350 μl RWE Puffer und anschließend 2x mit 500 μl RPE Puffer gewaschen. Die RNA wurde mit 2x 30 μl RNase freiem H₂O eluiert, die Konzentration mit dem *Tecan Infinite M200* bestimmt und bei -80°C gelagert.

RNA Proben Vorbereitung

Für die Analyse mittels Gelelektrophorese und RNA Dot Blot wurden 3 μg gesamt RNA in 4 μl ddH₂O mit 7,2 μl Glyoxal-Mix bei 50° C für 45 min denaturiert und direkt für weitere Analysen verwendet.

RNA Gelelektrophorese

Für die Größenauftrennung von RNA-Proben wurde eine horizontale Agarose Gelelektrophorese genutzt. Dazu wurden 1,4 g Agarose (*Ambion Agarose-LE*, Life Technologies) in 98 ml ddH₂O aufgekocht und in einem Wasserbad auf 50° C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 ml 50x RNA Puffer wurde die Agarose in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurde die Gelkammer mit 1x RNA Puffer gefüllt und die denaturierten RNA-Proben mit einer Spannung von 10 V/cm Gellänge für 90 min aufgetrennt.

Immobilisierung von RNA auf Membranen

Northern Blot

Die RNA wurde aus Agarosegelen mittels Kapillarblot auf eine Nitrozellulose-Membran (*Hybond-N*, Amersham) transferiert. Als Transferpuffer diente dabei 20xSSC. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Die RNA wurde durch UV-Licht (1200x100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) und anschließend bei 80° C für 1 h auf der Membran fixiert.

RNA Dot Blot

Für die direkte Immobilisierung von RNA ohne Größenauftrennung wurde eine Dot Blot Methode angewandt. Dazu wurde eine Nitrozellulose-Membran in eine Dot Blot Apparatur (*MiniFold Dot Blotter*, Schleicher und Schuell) gespannt und die Probenvertiefungen mit 200 μl 10xSSC beladen. Ein Vakuum wurde angelegt und der Puffer durch die Membran gesaugt. Anschließend wurden die wie oben beschrieben denaturierten Proben mit 40 μl 10xSSC gemischt und in die Vertiefungen geladen. Erneut wurde ein Vakuum angelegt und die Proben so durch die Membran gesaugt. Anschließend wurden die Vertiefungen erneut mit 200 μl 10xSSC gespült und die

Membran aus der Apparatur entfernt. Die Fixierung der RNA erfolgte wie oben beschrieben.

Detektion von RNA auf Nitrozellulose-Membranen

Für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurde *das DecaLabel DNA labeling Kit* mit $^{32}\text{P}(\alpha)\text{dCTP}$ nach Herstellerangaben verwendet. Die Matrizen für die Sondensynthese wurden durch Polymerasekettenreaktion hergestellt. Die Membranen wurden zunächst in Northern Blot Hybridisierungslösung für 1 h bei 65°C in geschlossenen Glasröhren bei vertikaler Rotation prehybridisiert. Die radioaktiv markierten Sonden wurden direkt nach der Herstellung hinzu gegeben und über Nacht mit der Membran hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen 2x20 min bei 50°C mit Northern-Blot-Waschlösung gewaschen und zwischen Filterpapier für 2 h getrocknet. Die trockenen Membranen wurden für 2 Tage auf eine Phosphor-Speicherfolie gelegt und mit digitaler Radiographie dokumentiert. Für die Quantifizierung wurden die Membranen anschließend mit einer Fluorophor-gekoppelten Sonde gegen die 18s rRNA über Nacht bei 42°C hybridisiert und mit dem Odyssey Scanner dokumentiert.

Für die Detektion mit Fluorophor-gekoppelten Sonden (Sequenzen siehe Tabelle 4) wurden die Membranen 1 h in Hybridisierlösung bei 42°C prehybridisiert und anschließend mit 10 nM der entsprechenden Oligonukleotide über Nacht bei 42°C hybridisiert. Das Waschen erfolgte bei Raumtemperatur für 2x20 min mit Northern-Blot-Waschlösung. Nach dem Trocknen zwischen Filterpapier wurden die Membranen mit dem Odyssey Scanner dokumentiert und quantifiziert.

Tabelle 4 Fluorophor-gekoppelte Oligonukleotide zur Detektion von RNA.

Name	Fluorophor	Sequenz (5'→3')
VSG121	DY-682	GGCTGCGGTTACGTAGGTGTCGATGTCGAGATTAAG
VSG221	DY-682	CAGCGTAAACAACGCACCCTTCGGTTGGTCGTCTAG
GFP	DY-682	GCCGTTCTTCTGCTTGTCGGCCATGATATAGA
Tubulin	DY-782	ATCAAAGTACACATTGATGCGCTCCAGCTGCAGGTC
18s rRNA	DY-682	CAACCAAACAAATCACTCCACCGACCAAAA

Alle Sonden wurden von MWG Biotech bezogen.

4.2.3.3 Proteinanalysen

Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus *T. brucei*

Die Kulturen wurden für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden 2x in 1 ml kaltem TDB gewaschen und in PBS resuspendiert, so dass sich eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ μ l ergab. Die Suspension wurde dann mit demselben Volumen an 2x Lämmli-Proben-Puffer vermischt und das Lysat für 5 min bei 98° C aufgeköcht.

Für die Extraktion von Gesamtprotein nach der RNA-Isolierung wurde der Durchfluss aus 4.2.3.2 mit 5 ml eiskaltem Aceton gemischt und für 30 min bei -20° C inkubiert. Die Suspension wurde dann für 20 min bei 15.000 x g und 4° C zentrifugiert und das Präzipitat bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proteine wurden anschließend in 1x Lämmli-Proben-Puffer aufgeköcht, so dass sich eine Konzentration von 2×10^5 Zelläquivalenten/ μ l ergab. Die Proben wurden anschließend bei -80° C gelagert.

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit einer Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Konzentration von 12,5 % aufgetrennt. Sofern eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt wurde, wurde ein Äquivalent von 5×10^5 Zellen aufgetragen; für eine Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau 1×10^6 Zellen. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt, bis das Bromphenolblau aus dem Gel austrat. Als Größenstandard wurde der *PageRuler* (Thermo Scientific) verwendet.

Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 20 min in einer Färbelösung (10 % (v/v) Isopropanol, 5 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R250) und anschließend in einer Entfärbelösung (10 % (v/v) Isopropanol, 5 % (v/v) Essigsäure) inkubiert bis das Gel keine Hintergrundfärbung mehr aufwies. Die Gele wurden mit dem Licor Odyssey Scanner bei 700 nm Wellenlänge dokumentiert.

Immobilisierung von Proteinen auf Nitrozellulose Membranen

Western Blot

Die Proteine wurden durch einen halbtrockenen Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurden 12 passgenau zugeschnittene Filterpapiere in 1x Lämmli Laufpuffer mit 20 % Methanol getränkt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: 6 Filterpapiere, Membran, Gel, 6 Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ des Gels für 1 h.

Protein Dot Blot

Für die direkte Immobilisierung von Proteinen ohne Größenauftrennung wurden $3 \mu\text{l}$ der Proteinextrakte (entspricht einem Äquivalent von 6×10^5 Zellen) auf eine Nitrozellulose Membran gegeben und trocknen gelassen. Die Membran wurde zuvor in PBS getränkt und getrocknet.

Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose Membranen

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen wurden die Membranen zunächst für 1 h mit 5 % Milchpulver/PBS inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper entsprechend der benötigten Verdünnung in 1 % Milchpulver/0,1 % Tween-20/PBS angesetzt und die Membran darin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran für 4x5 min in PBS/0,2 % Tween-20 gewaschen und die Sekundärantikörper wie beschrieben angesetzt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut 3x5 min in PBS/0,2 % Tween-20 bei RT gewaschen und ein letztes Mal für 5 min in PBS. Die Membran wurde zwischen Filterpapier getrocknet und mit dem Licor Odyssey Scanner dokumentiert und analysiert.

4.2.3.4 Formaldehyd-assistierte Identifizierung regulatorischer Elemente (FAIRE)

Die FAIRE-Methode dient dazu, proteingebundene DNA-Abschnitte zu identifizieren. Hierfür werden zunächst Protein-DNA-Komplexe *in vivo* miteinander vernetzt und anschließend nicht-gebundene von proteingebundener DNA getrennt. Die Anreicherung von freier DNA wird mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt.

Protein-DNA Vernetzung und DNA Anreicherung

4×10^7 Trypanosomen wurden bei $3.000 \times g$ für 20 min zentrifugiert und in 2 ml HMI-9 (Raumtemperatur) resuspendiert. Die Zellen wurden auf 2×1 ml aufgeteilt, wobei ein Ansatz zwar nicht chemisch vernetzt, ansonsten aber identisch behandelt wurde. Dieser diente als Gesamt-DNA-Kontrolle (alle weiteren Angaben über Volumina beziehen sich daher ab hier auf einen Ansatz von 1 ml).

Nach Zugabe von 1 ml 2 % Formaldehyd wurde die Suspension gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei gelegentlich invertiert. Die Fixierung wurde mit 0,125 M Glycin für 5 min bei Raumtemperatur gestoppt. Die Proben wurden anschließend 2x in 1 ml kaltem TDB gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0, 1 % SDS, $400 \mu\text{g/ml}$ PMSF (Sigma Aldrich), $8 \mu\text{g/ml}$ Pepstatin A (Sigma Aldrich)) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einem Ultraschallbad für 10 min aufgeschlossen und die Proben für 10 min bei 4°C und $16.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (PCI; 24:24:1 (v/v)) gemischt und für 5 min bei 4°C und $20.000 \times g$ zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu der organischen Phase wurden $150 \mu\text{l}$ TE-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0) gegeben, gemischt und erneut zentrifugiert. Die wässrigen Phasen aus beiden Schritten wurden vereinigt und erneut mit PCI gemischt, zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat, $20 \mu\text{g/ml}$ Glykogen und 2 Volumen-Äquivalenten 95 % Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 4°C und

20.000 x *g* für 20 min wurde die DNA in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 μ l Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 1,0 % SDS) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mit 100 μ g/ml RNase A (Sigma Aldrich) für 1 h bei 37° C inkubiert, mit dem *NucleoSpin PCR clean-up Kit* aufgereinigt und in 50 μ l ddH₂O eluiert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem *Tecan Infinite M200* bestimmt.

Quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR wurden je 100 ng DNA als Matrize und 200 nM von jedem Oligonukleotid eingesetzt. Die Oligonukleotide für die Amplifikation von *VSG121*, *VSG221* und *β -Tubulin* stammen aus der Arbeit von Barbara Uhl (Diplomarbeit B. Uhl, 2009). Für die Reaktion wurde der *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktionen wurden in 96er Mikrotiterplatten mit dem *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- i. 95° C 10 min
- ii. 95° C 15 sek
- 60° C 1 min
- 40 Zyklen

Die Analyse der Daten erfolgte mit der *StepOne Plus Software* (Applied Biosystems) unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ Methode. Dabei wurden die Proben intern auf *β -Tubulin* normiert, wobei die nicht-vernetzte Gesamt-DNA Probe als Referenz diente. Die Reaktionen wurden in technischen Triplikaten unabhängig voneinander durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Die Regulation der VSG Expression

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine stabile Expression zweier VSGs aus derselben Blutstromformexpressionsstelle (BES) möglich ist (Muñoz-Jordán et al., 1996). Quantitative Analysen solcher Doppel-Expressoren (DEX) in späteren Arbeiten zeigten, dass sowohl die VSG mRNA als auch Proteinmengen streng limitiert waren. In diesen stabilen Zelllinien betrug das Verhältnis von ektoischem zu endogenem VSG im Mittel stets 50/50. Die Summe beider VSGs überschritt nie signifikant die Menge an in wildtyp (wt) Trypanosomen vorhandenem VSG, das als 100 % betrachtet wird (Smith et al., 2009; Diplomarbeit B. Uhl, 2009; Diplomarbeit K. Fey, 2011). Schaltete man nun das endogene VSG mittels RNA-Interferenz (RNAi) aus, führte dies nicht zu dem bekannten G2/M Zellzyklusarrest (Sheader et al., 2005). Die Zellen zeigten zwar ein leicht verlangsamtes Wachstum, jedoch keine morphologischen Veränderungen. Interessanterweise zeigte die Quantifizierung der VSG mRNA Mengen nach Induktion der RNAi, dass die endogene mRNA effektiv abnahm, die ektoische VSG mRNA jedoch nicht über 50 % anstieg. Erst nach 2 Tagen der RNAi-Induktion begann die ektoische mRNA anzusteigen (Diplomarbeit K. Fey, 2011). Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass die Menge an VSG mRNA streng reguliert und eine stabile Überexpression aus der aktiven BES nicht möglich ist. Darüber hinaus scheinen geringere Mengen als 100 % an VSG mRNA über einen längeren Zeitraum toleriert zu werden.

In dieser Arbeit wurde die Regulation der VSG Expression genauer untersucht. Hierzu wurden Zelllinien charakterisiert, die das ektoische *VSG121* zusätzlich zu dem endogenen *VSG221* Tetrazyklin-induzierbar aus der ribosomalen Zwischenregion exprimieren.

5.1.1 Induzierbare Expression des ektopischen *VSG121*

In den bisher betrachteten Zelllinien wurde das ektopische *VSG121* stets konstitutiv exprimiert. Die Generation dieser rekombinanten Linien setzt eine 6 bis 7-tägige Selektion mit Antibiotika voraus. Während dieser Zeit wird das zusätzlich eingebrachte *VSG* Gen bereits transkribiert, da die Expression konstitutiv aus der aktiven BES erfolgt. Im Falle negativer Auswirkungen einer *VSG* Überexpression auf das Wachstum und Überleben der Trypanosomen würden durch die lange Selektionsphase nur jene Zellen vitale Populationen hervorbringen, die die Expression beider *VSGs* bereits reguliert haben. Frühe Effekte einer möglichen, tatsächlichen Überexpression blieben somit unbeobachtet. Es wurde daher ein System ausgewählt, das die Selektion von positiven, rekombinanten Trypanosomen ohne die gleichzeitige Expression des ektopischen *VSGs* ermöglicht. Hierzu wurde das Plasmid pRS gewählt. Es besitzt einen Tetrazyklin-induzierbaren T7-Promotor, der die Transkription des gewünschten Gens steuert. Das *BLE*-Resistenz-Gen wird zusätzlich von einem eigenen, nicht regulierten T7-Promotor transkribiert. Das Plasmid pRS wurde mit *HindIII* geöffnet und der offene Leserahmen von *VSG121* mit vollständiger 3'UTR wurde ebenfalls mittels *HindIII* aus dem Donor-Plasmid pBSK.M1.6-198 (Diplomarbeit C. Batram, 2009) mobilisiert und in das Empfänger-Plasmid ligiert. Der resultierende Expressionsvektor pRS.M1.6-198 wurde mit *NotI* linearisiert und in die Zelllinie 221^{ES} transfiziert, wo er in eine ribosomale Zwischenregion integriert (Abbildung 4A). Sechs Tage nach der Transfektion konnten zwei Klone isoliert werden, die für weitere Analysen verwendet wurden. Die Funktionalität des Systems wurde getestet, indem die isolierten Klone mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin (Tet) induziert wurden und das ektopische *VSG121* mittels Westernblot nachgewiesen wurde (Abbildung 4B).

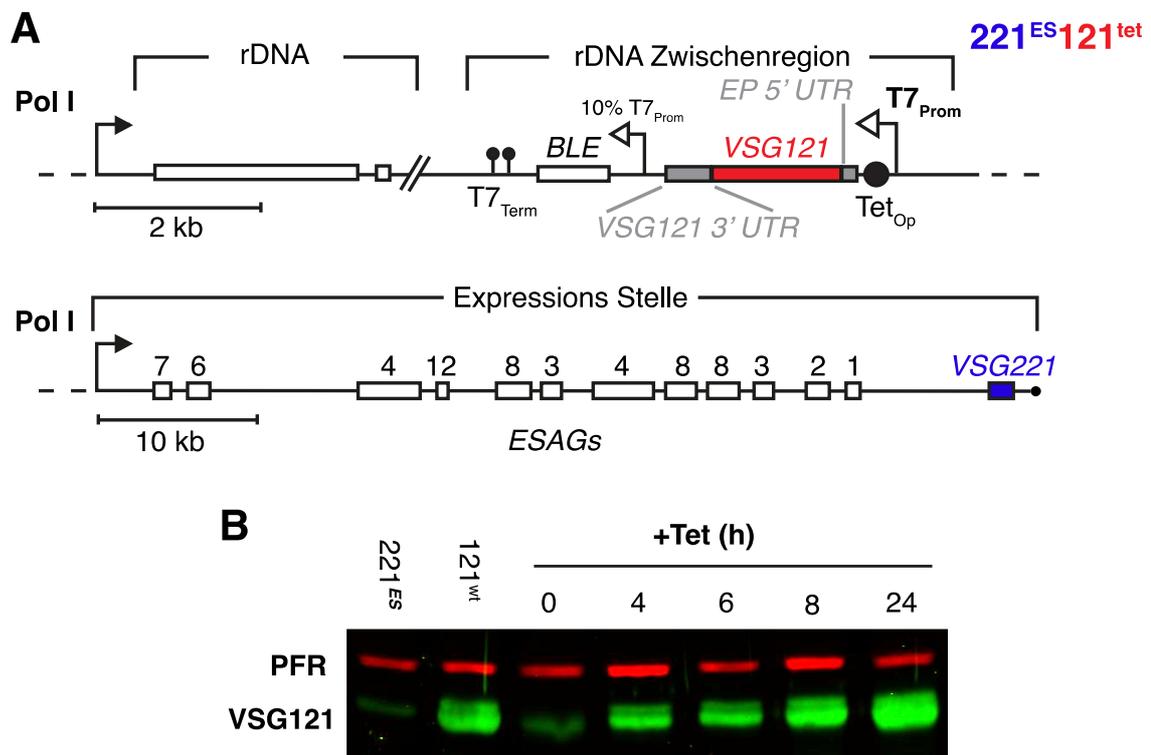


Abbildung 4 Das ektoische *VSG121* kann induzierbar aus der ribosomalen Zwischenregion exprimiert werden. **(A)** Schematische Darstellung der Expressions-Strategie. Das ektoische *VSG121* (roter Kasten) mit nativer 3' und EP1 5' UTR (grauer Kasten) wurde in die ribosomale Zwischenregion der parentalen Zelllinie 221^{ES} integriert. Die Expression wird über einen T7-Promoter ($T7_{Prom}$, weißer Pfeil) gesteuert, der durch einen Tetrazyklin-Operator (Tet_{Op} , schwarzer Kreis) reguliert wird. Ein separater, nicht regulierter T7-Promoter (10 % $T7_{Prom}$) steuert die Expression des Resistenzgens (*BLE*). Dadurch ist die Selektion rekombinanter Trypanosomen ohne die Expression des ektoischen *VSG121* möglich. **(B)** Western Blot Analyse der 221^{ES}121^{tet} Linie nach Tetrazyklin-Induktion. Nach verschiedenen Zeiten der Tetrazyklin-Zugabe (+Tet) wurden Proteinproben per Western Blot mit einem anti-VSG121-Antikörper analysiert (grün). Als Ladekontrolle diente das *Paraflagellar Rod* (PFR)-Protein (rot). Als Referenz für die Antikörperspezifität dienten die parentalen Zelllinien 221^{ES} und 121^{wt}.

Diese leichte Expression ohne die Zugabe von Tet ist ein Nebeneffekt der starken T7 Polymerase. Diese erlaubt zwar eine hohe Expression, ist dadurch allerdings nur schlecht zu regulieren. Nach Induktion stieg die Menge an VSG121 innerhalb von 24 h stark an und erreichte Mengen vergleichbar mit der 121^{wt} Linie. Das induzierbare System ist somit geeignet, um frühe Effekte einer VSG Überexpression zu untersuchen.

5.1.2 Das ektoische *VSG121* reprimiert das endogene *VSG221*

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die mRNA und Proteinmengen von dem ektoischen *VSG121* und dem endogenen *VSG221* während der induzierten Überexpression verhielten. Hierzu wurde die Expression von *VSG121* induziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten Gesamt-RNA und -Protein aus den Kulturen isoliert. Die Mengen an *VSG* mRNA und Protein wurden anschließend mittels RNA bzw. Protein Dot Blot quantifiziert (Abbildung 5). Bereits nach 8 h erreichte die *VSG121* mRNA 80 % der 121^{wt} Menge. Diese begann allerdings nach 24 h der Induktion wieder abzunehmen, bis nach 8 Tagen schließlich wieder die Ausgangsmengen erreicht waren.

Die *VSG221* mRNA verhielt sich zunächst genau gegenläufig; nach 8 h waren nur noch 25 % der Ausgangsmenge vorhanden. Während die *VSG121* mRNA nach 24 h jedoch kontinuierlich abnahm, stieg die *VSG221* mRNA während der folgenden 4 Tage nicht signifikant an. Nach 8 Tagen war die Menge an endogenem *VSG221* jedoch wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen. Die Gesamtmenge an *VSG* mRNA betrug während der ersten 24 h nicht signifikant mehr oder weniger als 100 %. Die Quantifizierung der Proteinmengen zeigte eine ähnliche Kinetik (Abbildung 5B, D). Während das ektoische *VSG121* innerhalb von 24 h auf wt Mengen anstieg, nahm die Menge an endogenem *VSG221* simultan ab. Nach 2 Tagen begannen die Proteinmengen mit einem gegenläufigen Trend, bis nach 8 Tagen auch diese wieder die Ausgangsmengen aufwiesen. Um die Änderungen der *VSG* mRNA zeitlich genauer aufzulösen, wurde zusätzlich RNA aus Kulturen 30, 60, 90 und 120 min nach Induktion isoliert und quantifiziert (Abbildung 5E). Hierbei zeigte sich, dass während der ersten 2 h keine Abnahme der endogenen *VSG221* mRNA zu beobachten war, die ektoische *VSG121* mRNA jedoch auf 90 % der wt Menge anstieg. Dies zeigt, dass die induzierte Expression eines ektoischen *VSGs* kurzfristig zu einer Überexpression mit 180 % *VSG* mRNA Gesamtmenge führt. Überschüssige Mengen werden jedoch nach 2 h durch eine Abnahme des endogenen *VSGs* ausgeglichen.

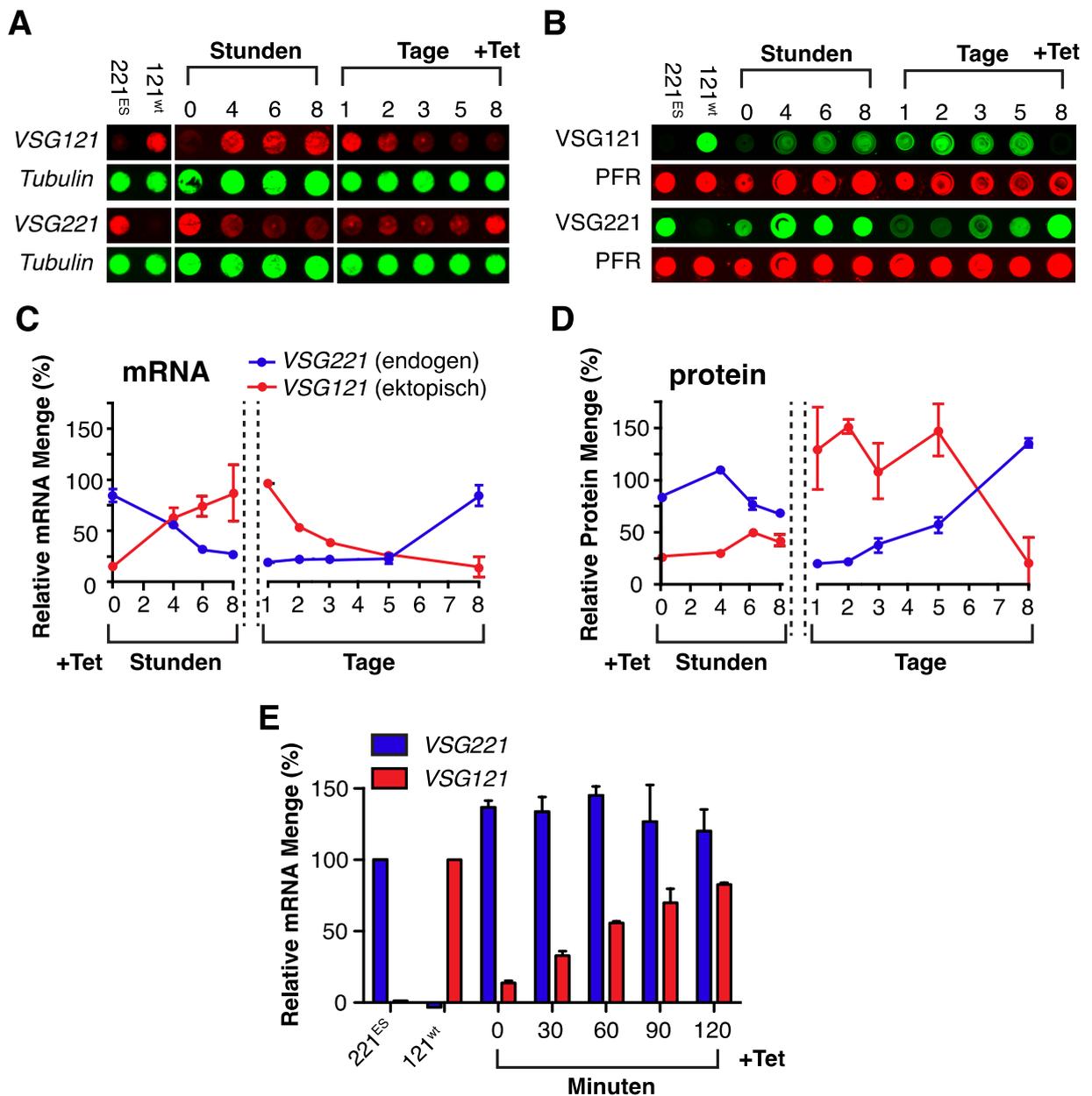


Abbildung 5 Die ektopische Expression des *VSG121* beeinflusst die Expression des BES assoziierten *VSGs*. (A,B) RNA (A) und Protein (B) Dot Blot nach Induktion der *VSG121* Expression. (A) Die RNA wurde mit fluoreszenten DNA-Sonden gegen *VSG* (rot) und *Tubulin* (grün) hybridisiert und mit dem Licor Odyssey System analysiert. (B) Protein-Dot-Blot mit Antikörpern gegen *VSG* (grün) und *PFR* (rot) (C,D) Quantifizierungen der RNA (C) und Protein (D) Dot Blots. Die mRNA und Proteinmengen wurden mit dem Licor Odyssey System quantifiziert und auf die *Tubulin*-mRNA (C) bzw. das *PFR*-Protein (D) normiert. Gezeigt sind Mittelwert \pm SD von 2 unabhängigen Klonen normiert auf die parentalen Zelllinien. (E) Quantifizierung der *VSG* mRNA Mengen in den ersten 2 h nach Tet-Induktion.

5.1.3 Das ektopische VSG121 wird gleichmäßig in der Population exprimiert

Mit den in 5.1.2 beschriebenen Experimenten wurde die VSG Expression der gesamten Population betrachtet. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass eine Subpopulation kein VSG121 exprimiert und die Menge an VSG221 unverändert bleibt und eine weitere Subpopulation das VSG221 vollständig durch das VSG121 ersetzt. Für eine Validierung der Ergebnisse war es daher nötig, die gleichzeitige Expression beider VSGs in einzelnen Zellen nachzuweisen. Dafür wurde eine Immunofluoreszenz mit Antikörpern gegen beide VSGs aus unterschiedlichen Spezies durchgeführt (Abbildung 6). Die ektopische VSG121 Expression wurde induziert und die Zellen nach 0, 12 und 24 h chemisch fixiert. Anschließend wurden die Proben gleichzeitig mit einem Maus-anti-VSG121- und einem Kaninchen-anti-VSG221-Antikörper inkubiert. Die Spezifität der Antikörper wurde mit 121^{wt} und 221^{ES} Zellen überprüft. Nach 12 h der Induktion war eine starke Zunahme des VSG121-Signals an der Oberfläche zu sehen, das nach 24 h sogar noch an Intensität zunahm. Die Expression des ektopischen VSG121 konnte in allen Zellen der Population nachgewiesen werden, ebenso wie die VSG221 Expression. Die Ergebnisse der Immunofluoreszenz bestätigten damit die Quantifizierung der VSG Mengen unter 5.1.2. Das ektopische VSG121 wird demnach von der gesamten Population gleichmäßig exprimiert und dominiert nach der Induktion die Zelloberfläche. Dabei kommt es nicht zu einem vollständigen Verlust des endogenen VSG221, sondern beide VSGs werden zeitgleich in unterschiedlichen Mengen exprimiert.

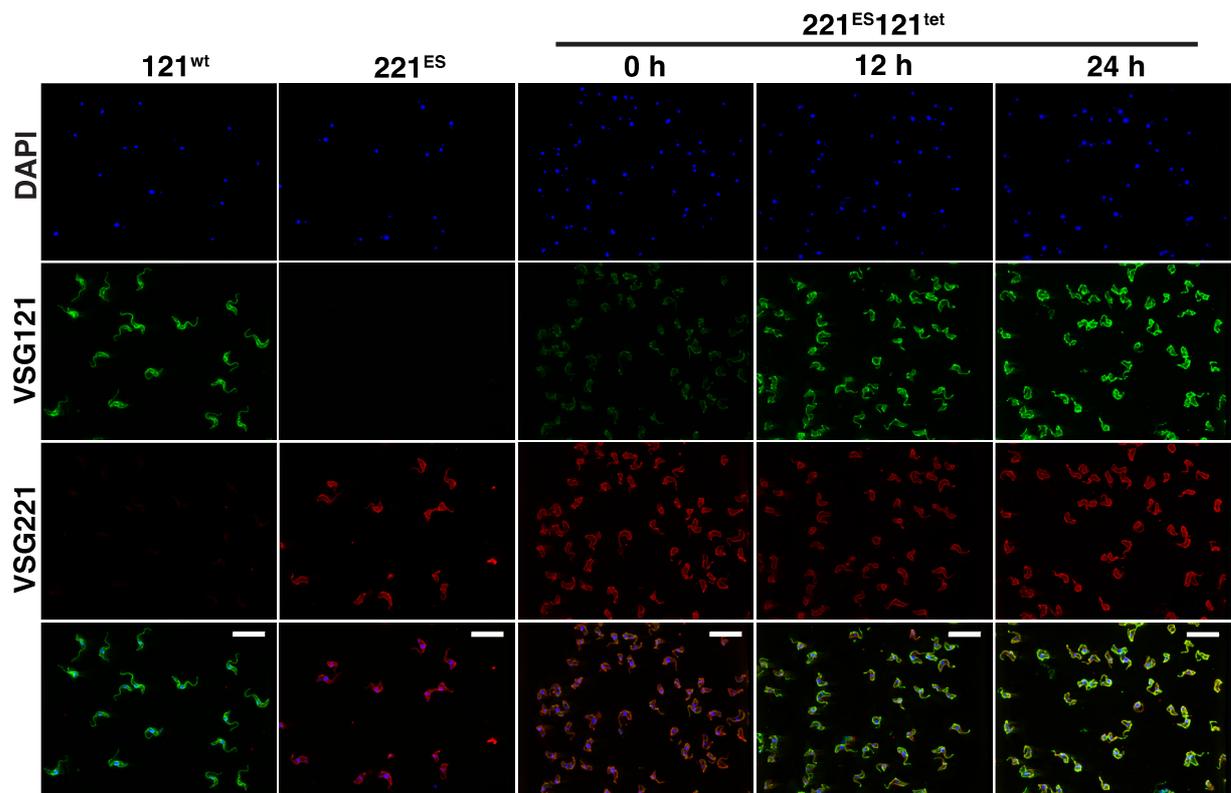


Abbildung 6 Das ektopische VSG121 wird homogen auf der Oberfläche exprimiert. Die 221^{ES}121^{tet} Zellen wurden 0, 12 und 24 h nach Induktion der VSG121-Expression chemisch fixiert und mit einem Maus-anti-VSG121- (grün) und einem Kaninchen-anti-VSG221- (rot) Antikörper inkubiert und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität dienten 121^{wt} und 221^{ES} Zellen. Abgebildet sind dekonvolvierte, maximale Intensitätsprojektionen von 3-Kanal-3D-Aufnahmen (150 Bilder mit 200 nm z-Abstand; Maßstabsbalken: 20 μ m).

5.2 Die Regulation der aktiven VSG Expressionsstelle

Wie die bisherigen Ergebnisse gezeigt haben, führt die Überexpression von VSG121 zu einer nahezu simultanen Depletion des endogenen VSG221. Da in stabilen DEX-Linien stets gleiche Mengen beider VSGs zu beobachten sind, wäre zu erwarten, dass das ektopische VSG121 zwar graduell ansteigt und das endogene VSG221 abnimmt, sich die Mengen jedoch bei einem Verhältnis von 50/50 einstellen. Der nahezu komplette Austausch der VSG mRNA Population ließ jedoch auf einen selektiven Prozess schließen. Dieser könnte durch ein Abschalten der aktiven BES begründet sein oder durch eine aktive Degradation der VSG221 mRNA. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die transkriptionelle Aktivität der aktiven VSG221 BES bestimmt. Hierzu wurde zunächst ein Luziferase-Reporter-Gen stromaufwärts des endogenen VSGs integriert, um dessen Aktivität während der VSG121 Überexpression zu messen. Darüber hinaus wurden die mRNAs von drei verschiedenen ESAGs sowie eines GFP-Reporters an verschiedenen Positionen innerhalb der BES quantifiziert.

5.2.1 Die aktive BES wird durch eine VSG Überexpression inaktiviert

Um die Aktivität des BES während der ektopischen VSG-Überexpression zu messen, wurde ein Luziferase-Gen 4 kb stromaufwärts des endogenen VSG221 in die aktive BES integriert (Abbildung 7A). Dieses Reporter-Gen kodiert für ein Enzym, das das Substrat Luziferin oxidativ umsetzt und dadurch Energie in Form von Photonen freisetzt. Diese können als relative Lichteinheiten (*Relative Light Units, RLU*) gemessen werden, woraus sich eine quantitative Aussage über die Expression des Reporter-Gens treffen lässt. Um die BES-Aktivität unabhängig von einer möglichen posttranskriptionellen Regulation der VSG mRNA zu bestimmen, wurde darauf geachtet, dass das Luziferase-Gen keine VSG-spezifischen Sequenzen besaß. Dazu wurde das Luziferase-Gen zunächst aus dem pRS mittels *HindIII* mobilisiert und die

überstehenden 5'-Enden aufgefüllt. Als Zielvektor diente der pES.M1.6-0 (Diplomarbeit C. Batram, 2009), der mit *EcoRI* geöffnet und die Überhänge ebenfalls aufgefüllt wurden. Der entstandene Transfektionsvektor pEStel.Luc wurde mit *KpnI* und *AvrII* linearisiert und in die Zelllinie 221^{ES}121^{tet} transfiziert. Von der so entstandenen Zelllinie Luc^{ES}221^{ES}121^{tet} wurden zwei Klone für weitere Analysen ausgewählt. Die Expression des ektopischen *VSG121* wurde mit Tet induziert und die Luziferase-Aktivität nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abbildung 7B). Da bei einer Inaktivierung der gesamten BES auch die Expression des *NEO*-Resistenz-Gens beeinflusst wäre, wurden die Zellen in Abwesenheit des Antibiotikums induziert und kultiviert. Bereits nach 8 h war die Aktivität der Luziferase auf 63 % reduziert und betrug nach 12 h nur noch 34 % bezogen auf die Aktivität vor der *VSG121* Expression. In den folgenden 3 Tagen sank die gemessene Aktivität weiter bis auf 10 % ab. Die Kinetik der Luziferaseaktivität entspricht ebenfalls der Kinetik, die für die Abnahme des VSG221 Proteins beobachtet wurde. Die Abnahme der *VSG221* Expression ist somit die Folge einer Deaktivierung der aktiven BES, ausgelöst durch die ektopische Expression des *VSG121*.

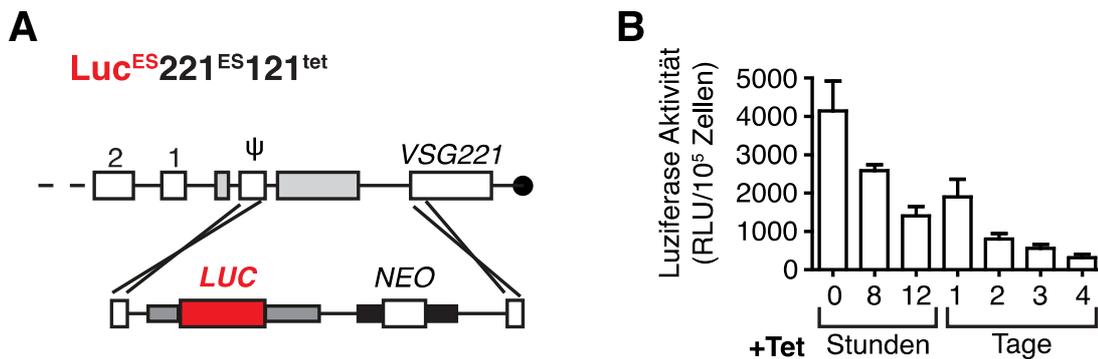


Abbildung 7 Die ektopische *VSG121* Expression führt zu einer Inaktivierung der BES. (A) Illustration des Luziferase-Reporter-Konstrukts in der aktiven BES. Das Reporter-Konstrukt integriert in die aktive *VSG221* BES. Ein Teil der 70 bp-repeats (hellgraue Kästen) wird dabei deletiert. Das Luziferase-Reporter-Gen (rot) besitzt die Aktin 5' und 3' UTRs (dunkelgraue Kästen). Mit einem *NEO*-Resistenz-Gen wurde auf positive Rekombinanten selektiert. Die *ESAGs* 1 und 2 (nummerierte weiße Kästen) bleiben erhalten. **(B)** Luziferaseaktivität nach *VSG121* Überexpression. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Lumineszenz von 2×10^5 Zellen gemessen. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SD von 2 unabhängigen Klonen als RLU von 1×10^5 Zellen.

5.2.2 Die aktive BES wird graduell inaktiviert

Die Messung der Luziferaseaktivität in der $\text{Luc}^{\text{ES}}221^{\text{ES}}121^{\text{tet}}$ Reporterlinie hat gezeigt, dass die aktive BES nach der *VSG121* Überexpression inaktiviert wird. Dies konnte nun durch ein Abschalten des BES-Promoters oder durch eine abnehmende Prozessivität der RNA Polymerase I ausgelöst sein. Wäre letzteres der Fall, sollte die Expression von telomernahen Genen früher abnehmen als die von promoternahen. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden die mRNAs von drei *ESAGs* während der frühen Phase der *VSG121* Überexpression quantifiziert. Einige *ESAGs* liegen in mehreren Kopien innerhalb der *VSG221* BES vor (Hertz-Fowler et al., 2008). Daher wurden *ESAG1*, 2 und 12 gewählt, die nur mit jeweils einer Kopie in der *VSG221* BES vertreten sind. *ESAG1* und *ESAG2* liegen etwa 10 bzw. 12 kbp stromaufwärts vom Telomer, *ESAG12* ist etwa 35 kbp vom Telomer entfernt (Abbildung 8A). Es wurden RNA-Proben der Zelllinie $221^{\text{ES}}121^{\text{tet}}$ nach 0, 4 und 8 h der Induktion mittels

eines Northern Blots quantifiziert (Abbildung 8B). Da eine Detektion der *ESAG* Transkripte mit fluoreszenten Sonden aufgrund der geringen Abundanz nicht möglich ist, wurden mit ^{32}P (dCTP)-markierte DNA-Sonden spezifisch für *ESAG1*, *2* und *12* hergestellt. Als Ladekontrolle diente eine fluoreszente DNA-Sonde gegen die 18s rRNA und die Werte wurden auf die parentale Zelllinie 221^{ES} (P) normiert. Nach 8 h betrug die Menge an *ESAG1* mRNA nur noch 40 %, die von *ESAG2* 60 % und von *ESAG12* 80 %. Die mRNAs der telomernahen *ESAGs* *1* und *2* nehmen somit schneller ab als die des weiter stromaufwärts gelegenen *ESAG12*.

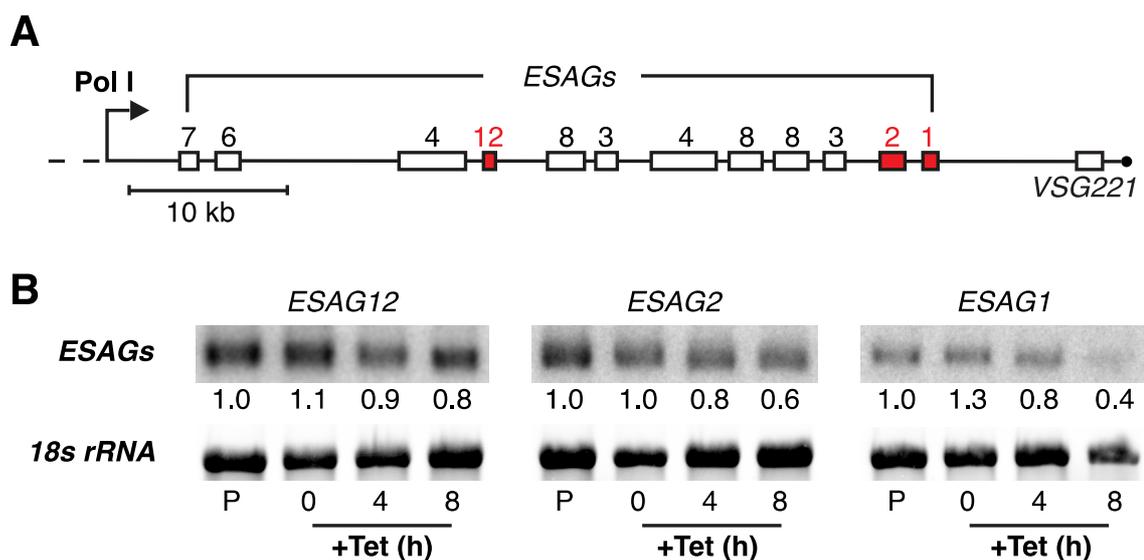


Abbildung 8 Die mRNAs von drei *ESAGs* weisen eine positionsabhängige Abnahme auf. (A) Illustration der aktiven *VSG221* BES mit der Position der *ESAGs* (weiße nummerierte Kästen). Die hier analysierten *ESAGs* *1*, *2* und *12* sind rot hervorgehoben. **(B)** Northern Blot Analyse der *ESAG* mRNAs nach Tet Induktion. Die Northern Blots wurden mit einer fluoreszenten 18s rRNA-Sonde hybridisiert und mit dem Licor Odyssey System quantifiziert. Anschliessend wurden die Blots mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden hybridisiert und mittels digitaler Radiographie quantifiziert. Die einzelnen Werte wurden auf die 18s rRNA normiert und sind relativ zur parentalen (P) Zelllinie angegeben.

Da die Halbwertszeiten der einzelnen *ESAG* mRNAs nicht bekannt sind, könnte die unterschiedliche Abnahme auch durch abweichende Halbwertszeiten begründet sein. Alternativ könnte die unterschiedliche Kinetik von einer directionalen Inaktivierung der BES herrühren, die am Telomer startet und sich in Richtung des Promoters ausbreitet. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Zelllinien hergestellt, die ein gleiches Reporter-Gen an unterschiedlichen Positionen

in der aktiven BES enthielten. Als Reporter wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) gewählt, da positive Rekombinanten fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden können. Zunächst wurde das Plasmid pESprom mit *KpnI* und *BamHI* linearisiert und in die 221^{ES}121^{tet} Zelllinie transfiziert. Die dadurch generierte Zelllinie GFP^{ESpro}221^{ES}121^{tet} (im folgenden als ESpro bezeichnet) besitzt somit direkt hinter dem Promoter der *VSG221* BES ein Blastizidin-Resistenz-Gen und ein GFP-Reporter-Gen (Abbildung 9A, oberes Schema). Das *GFP*-Gen besitzt die *VSG221* 5' und 3'UTR, um eine hohe Abundanz der mRNA zu gewährleisten, wodurch eine Quantifizierung mit fluoreszenten Sonden möglich ist. Um das gleiche Reporter-Gen in Telomernähe vor das endogene *VSG221* zu integrieren, wurde das *GFP* inklusive der 5' und 3'UTRs mit *SpeI* und *EcoRI* aus dem Plasmid pESprom mobilisiert und in den ebenfalls mit *SpeI* und *EcoRI* geöffneten pES.M1.6-0 ligiert. Das resultierende Plasmid pEStel.GFP wurde mit *KpnI* und *AvrII* linearisiert und ebenfalls in die 221^{ES}121^{tet} Linie transfiziert. Die so entstandene Reporterlinie GFP^{EStel}221^{ES}121^{tet} (im folgenden als EStel bezeichnet) besitzt somit das *GFP*-Reporter-Gen und ein Neomycin-Resistenz-Gen direkt stromaufwärts des endogenen *VSG221* (Abbildung 9A, unteres Schema). Von beiden Reporterzelllinien konnten jeweils zwei unabhängige Klone isoliert werden, die für weitere Analysen verwendet wurden. Nach verschiedenen Zeiten der *VSG121* Induktion wurde Gesamt-RNA isoliert und die Mengen der *GFP*, *VSG221* und *VSG121* mRNA quantifiziert (Abbildung 9B). Während die *VSG221* mRNA in beiden Zelllinien mit gleicher Kinetik abnahm, nahm die *GFP* mRNA im Falle der EStel-Linie schneller ab als in der ESpro-Linie. Die Signifikanz der unterschiedlichen Kinetiken wurde im Bereich von 0 bis 8 h mittels eines *Two-Way-Anova*-Tests bestimmt ($p=0.018$). Nach 2 Tagen der Induktion nahm die *GFP* Expression in der ESpro-Linie wieder zu, während die *VSG221* Expression unverändert bei etwa 20 bis 30 % blieb. In der EStel-Linie stieg die *GFP* Expression dagegen nicht an. Die Ergebnisse zeigen somit, dass durch die ektoische Überexpression des *VSG121* die aktive BES vom Telomer ausgehend graduell inaktiviert wird. Des Weiteren wird die BES aus entgegengesetzter Richtung, beginnend am Promoter, reaktiviert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass es sich um keine vollständige Inaktivierung handelt; die BES bleibt noch zu 20 % aktiv. Im Folgenden wird dies daher als BES Attenuierung bezeichnet.

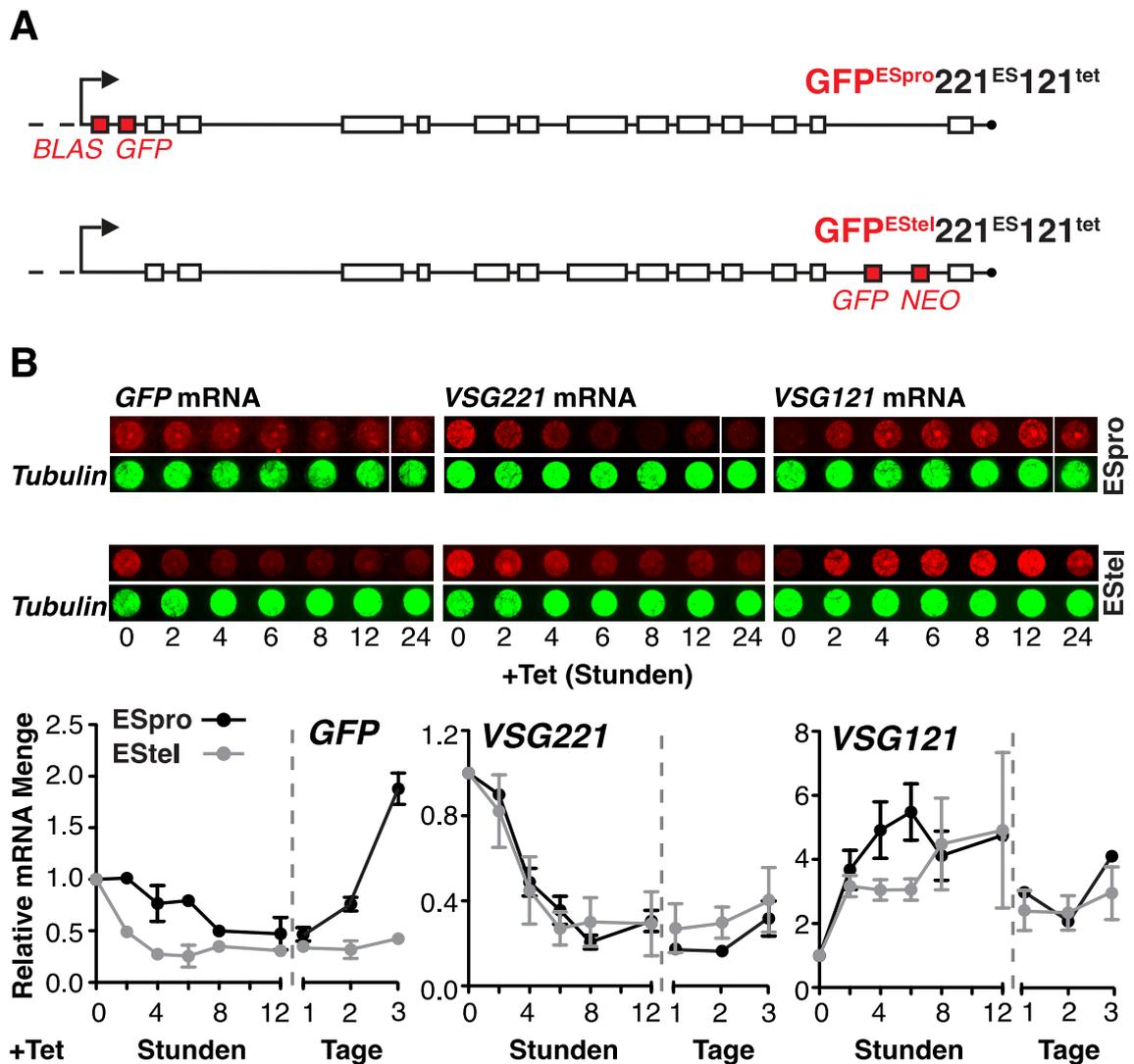


Abbildung 9 Die ektopische *VSG121* Expression führt einer graduellen Attenuierung der *VSG221* BES Aktivität. **(A)** Illustration der GFP-Reporterzelllinien. In der $GFP^{ESpro}221^{ES}121^{tet}$ -Linie (oberes Schema) wurde ein Blastizidin-Resistenz-Gen (*BLAS*) gefolgt von einem *GFP*-Reporter-Gen mit den *VSG221* 5' und 3' UTRs (*GFP*) direkt stromabwärts des BES-Promoters (schwarzer Pfeil) integriert. Die $GFP^{EStel}221^{ES}121^{tet}$ -Linie besitzt das *GFP* Reporter-Gen stromaufwärts des endogenen *VSG221* (unteres Schema). **(B)** RNA-Dot Blot der Reporterlinien nach *VSG121*-Expression. Nach den angegebenen Zeiten der *VSG121*-Induktion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels Dot Blot auf Nitrozellulose transferiert. Die Blots wurden mit fluoreszenten DNA-Sonden spezifisch gegen *GFP*, *VSG221* und *VSG121* (rot) hybridisiert. Eine fluoreszente Sonde gegen *Tubulin* (grün) diente als Ladekontrolle. Die Blots wurden mit dem Licor Odyssey System quantifiziert und auf die *Tubulin*-mRNA normiert. Die unteren Graphen zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 2 unabhängigen Klonen als relative mRNA-Menge bezogen auf die nicht induzierte Kontrolle (0 h). Graue Kurve: $GFP^{EStel}221^{ES}121^{tet}$ (EStel), schwarze Kurve: $GFP^{ESpro}221^{ES}121^{tet}$ (ESpro).

5.3 Der Einfluss der BES Aktivität auf den Zellzyklus

Die Ergebnisse aus 5.2 zeigen, dass die *VSG121* Überexpression zu einer Attenuierung der aktiven BES innerhalb von 6 h führt. Dies hat zur Folge, dass auch die Expression der co-transkribierten *ESAGs* abnimmt. Da die Funktionen der einzelnen *ESAGs* kaum bekannt sind, wurden im Folgenden die Auswirkungen der BES Attenuierung zellbiologisch untersucht. Dazu wurde zunächst eine Wachstumsanalyse durchgeführt und die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen innerhalb der Population bestimmt. Darüber hinaus wurde neben der globalen RNA-Synthese auch die transkriptionelle Aktivität eines endogenen RNA Polymerase I und II Locus quantifiziert.

5.3.1 Die BES Attenuierung führt zu einer verlängerten G1-Phase

Der erste Effekt, der nach der *VSG121* Überexpression zu beobachten ist, ist die graduelle Attenuierung der aktiven *VSG221* BES. Dies führt ebenfalls zu einer Abnahme der *ESAG* Expression. Um die Auswirkungen der BES Attenuierung auf das Populationswachstum zu untersuchen, wurde in zwei Klonen der 221^{ES}121^{tet} Linie parallel die ektopische *VSG121* Expression induziert und in regelmäßigen Abständen die Zelldichte bestimmt (Abbildung 10A).

In den ersten 12 h der Induktion war das Wachstum der Populationen kaum beeinflusst. Nach 24 h verlangsamte sich das Wachstum und die Populations-Dopplungs-Zeit (PDZ) betrug im weiteren Verlauf 20 bis 30 h (PDZ(-Tet) = 6 h). Dieses verlangsamte Wachstum blieb für weitere 5 Tage bestehen. Nach 6 Tagen begann sich das Wachstum wieder zu normalisieren, und nach 8 Tagen zeigten die induzierten Kulturen wieder gleiche Wachstumsraten wie die Kontrollkulturen. Während der gesamten Zeit waren keine morphologischen Aberrationen der induzierten Trypanosomen zu beobachten (Abbildung 10B). Um zu untersuchen, ob das verlangsamte Wachstum auf die Expansion einer bestimmten Zellzyklusphase zurückzuführen ist, wurde die Zellzyklusverteilung der Population analysiert (Abbildung 10C). Dazu wurde die *VSG121* Expression in der 221^{ES}121^{tet} Linie

induziert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Kinetoplasten- und Nukleus-Konfiguration bestimmt. Die Trypanosomen wurden dazu chemisch fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte bereits an Tag 1 der *VSG121* Überexpression eine Akkumulation von 1K1N Zellen und eine Abnahme an Zellen mit sich teilendem Kinetoplasten. Nach 2 Tagen konnte zudem eine signifikante Abnahme an 2K1N Zellen beobachtet werden, die Anzahl an 2K2N Zellen blieb jedoch relativ konstant. Diese Umverteilung im Zellzyklusprofil der Population zeigt, dass die Zellen nach der BES Attenuierung in der G1-Phase akkumulieren. Sollte es sich um einen tatsächlichen G1-Arrest handeln, sollten die Zellen nicht mehr in die S-Phase eintreten. Um dies zu überprüfen, wurde die DNA-Synthese mit dem Nukleosid-Analog 5-Ethyl-2'-Deoxyuridin (EdU) visualisiert. Das EdU wird nur in neu synthetisierte DNA eingebaut und kann durch die chemische Kopplung eines Fluorophors nachgewiesen werden (Abbildung 11A). Zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion der *VSG121* Expression wurden die Zellen für 4 h oder 18 h mit EdU inkubiert und anschließend fixiert. Nach der chemischen Kopplung eines Fluorophors wurde die DNA zusätzlich mit DAPI angefärbt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Ohne Induktion der *VSG121* Expression konnte nach 4 h der EdU-Inkubation in 83 % der Zellen der Eintritt in die S-Phase nachgewiesen werden (Abbildung 11B). Nach 24 h Tet Induktion und 4 h EdU-Inkubation wiesen lediglich 17 % der Zellen neu synthetisierte DNA auf, wohingegen nach 18 h EdU Inkubation 86 % der Zellen in die S-Phase eingetreten waren. Nach 3 Tagen konnte selbst nach 18 h EdU Inkubation in nur 15 % der Zellen der Eintritt in die S-Phase nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die BES Attenuierung nicht zu einem Zellzyklusarrest führt, sondern die G1-Phase vielmehr stark verlängert wird. Die Zellen scheinen somit in einen ruhenden Zustand einzutreten. Es ist hierbei zu erwähnen, dass die Trypanosomen in diesem Zustand für 5 Tage verweilen bevor sie wieder normale Teilungsraten erreichen. Es handelt sich somit um einen reversiblen Zustand, im Gegensatz zu dem G2/M-Arrest nach *VSG* RNAi (Shedder et al., 2005).

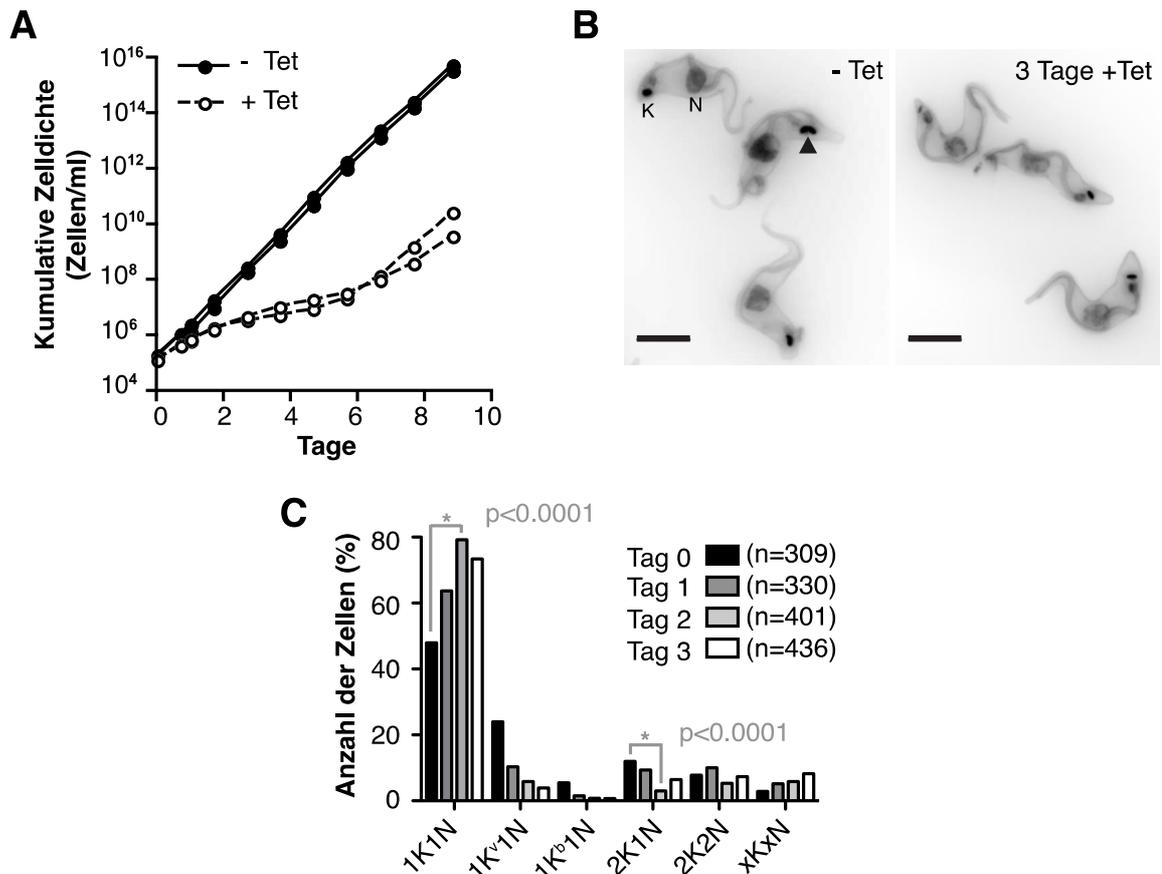


Abbildung 10 Die Attenuierung der BES führt zu einem verlangsamten Wachstum. (A) Wachstumsanalyse der 221^{ES}121^{tet} Zellen nach ektopischer *VSG121* Expression. Die Kurve zeigt das Wachstum von 2 unabhängigen Klonen ohne (-Tet, ausgefüllte Symbole) und mit der Zugabe von Tetrazyklin (+Tet, offene Symbole) über einen Zeitraum von 9 Tagen. **(B)** Zellmorphologie nach Wachstumseinbruch. Trypanosomen vor (-Tet) und 3 Tage nach (+Tet) *VSG121* Expression wurden mit DAPI und AMCA-Sulfo-NHS gefärbt. Die Abbildungen zeigen digital invertierte, maximale Intensitätsprojektionen (60x200 nm). Pfeil: v-förmiger, teilender Kinetoplast; N: Nukleus; K: Kinetoplast; Maßstabsbalken: 5 μ m. **(C)** Zellzyklus Analyse. Trypanosomen wurden mit Tet induziert und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Die Kinetoplasten- und Nukleus-Konfigurationen wurden nach DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

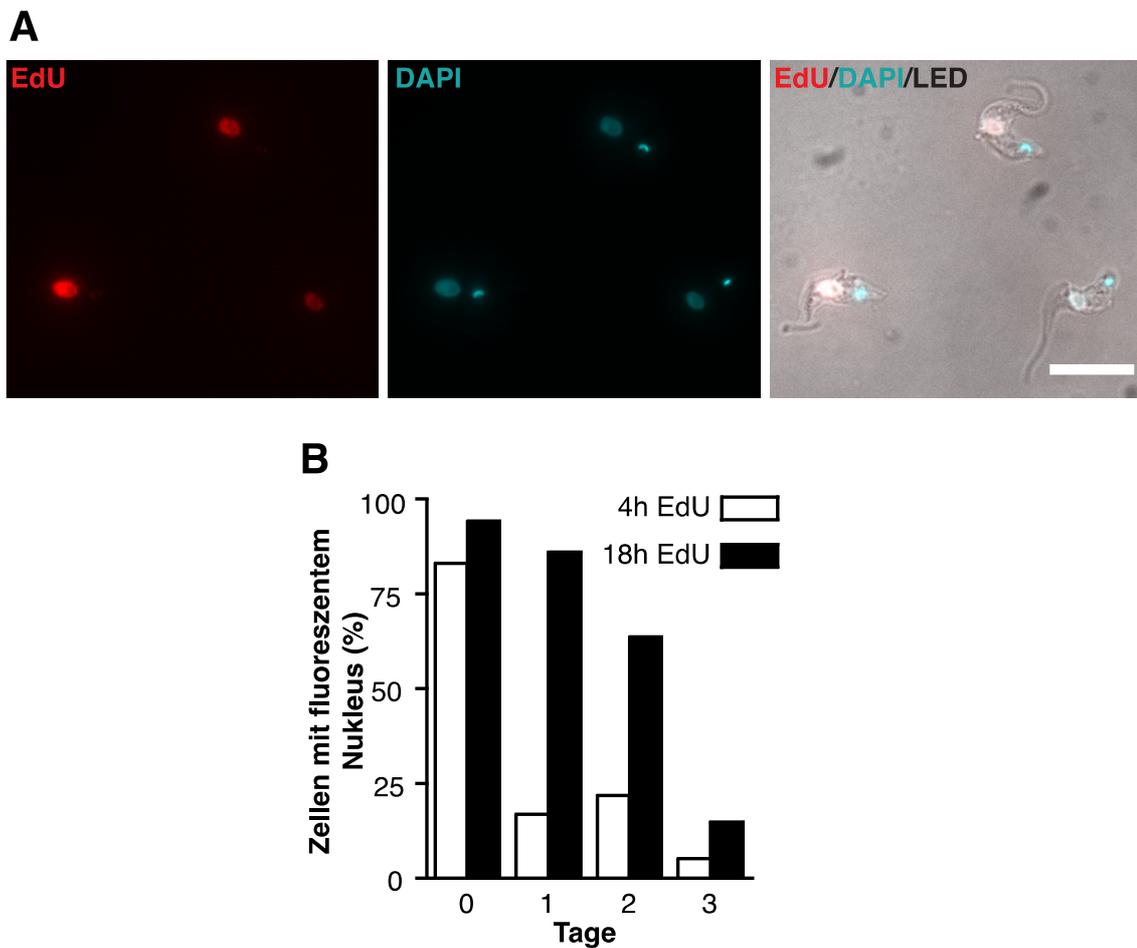


Abbildung 11 BES Attenuierung führt zu einer verlängerten G1 Phase. (A) Visualisierung der S-Phase durch EdU-Einbau. Das Nucleosid Analog-EdU wird in neu synthetisierte DNA eingebaut und kann durch eine chemische Reaktion mit einem Fluorophor visualisiert werden. $221^{ES}121^{tet}$ -Zellen wurden ohne Tet-Zugabe für 4 h mit $50 \mu\text{M}$ EdU inkubiert (rot) und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Gezeigt sind maximale Intensitätsprojektionen von 2-Kanal, 3D-Aufnahmen ($150 \times 200 \text{ nm}$; Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$) **(B)** Einbau von EdU in $221^{ES}121^{tet}$ Zellen. Die *VSG121* Expression wurde induziert und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen wurden die Zellen für 4 oder 18 h (weiße bzw. schwarze Balken) mit $50 \mu\text{M}$ EdU inkubiert. Die Zellen wurden anschließend chemisch fixiert, die DNA mit DAPI angefärbt und mikroskopisch auf fluoreszente Nuklei analysiert ($n > 100/\text{Zeitpunkt}$).

5.3.2 Die globale RNA-Syntheserate wird reduziert

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine ektopische *VSG* Überexpression zur graduellen Attenuierung der aktiven BES führt und dadurch zu einem verlangsamten Zellzyklus. Dabei verbleiben die Trypanosomen für eine verlängerte Zeitspanne in der G1-Phase, ohne jedoch sichtlichen Schaden zu nehmen oder gar zu sterben. Sie verweilen 5 Tage in diesem ruhenden Zustand, bevor die BES reaktiviert wird und sich das Wachstum normalisiert. Diese bemerkenswert verlängerte G1-Phase setzt eine Reduktion des metabolischen Umsatzes sowie anabolischer Wege voraus, darunter auch die Proteinsynthese. Dies wiederum sollte sich in einer Reduktion der gesamten RNA-Synthese widerspiegeln. Um die RNA-Syntheserate zu messen, wurden die Zellen mit dem Nukleosid-Analog 5-Bromouridin 5'-Triphosphat (BrUTP) inkubiert. Das BrUTP wird während der Transkription in die naszierende RNA eingebaut und kann mit einem anti-BrdU-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 12A). Die *VSG121* Expression wurde induziert und nach 0, 8, 24 und 48 h wurden die Zellen für 30 min mit BrUTP inkubiert. Anschließend wurden die Proben chemisch fixiert und zunächst mit einem anti-BrdU-Antikörper und dann mit einem sekundären AlexaFluor488-konjugierten-Antikörper inkubiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt, um die Nuklei und Kinetoplasten zu visualisieren. Die RNA-Syntheserate wurde quantifiziert, indem die Fluoreszenzintensität von mikroskopischen 3D-Aufnahmen entlang der z-Achse summiert und für einzelne Zellen mit dem Programm *ImageJ* nach Abzug des Hintergrundsignals bestimmt wurde (Abbildung 12B). Um Abweichungen durch unterschiedliche Syntheseraten in verschiedenen Zellzyklusstadien zu vermeiden, wurden nur Zellen in der G1-Phase gemessen, die sich durch eine 1K1N-Konfiguration auszeichnen. Nach 8 h der *VSG121* Expression wurde keine Veränderung der RNA-Syntheserate gemessen. Nach 24 h fiel die mittlere Fluoreszenzintensität signifikant auf 30 % des Ausgangswertes ab und blieb auch nach 48 h konstant bei 30 %. Dies zeigt, dass durch den Eintritt in den ruhenden Zustand die gesamte RNA-Synthese verringert wird.

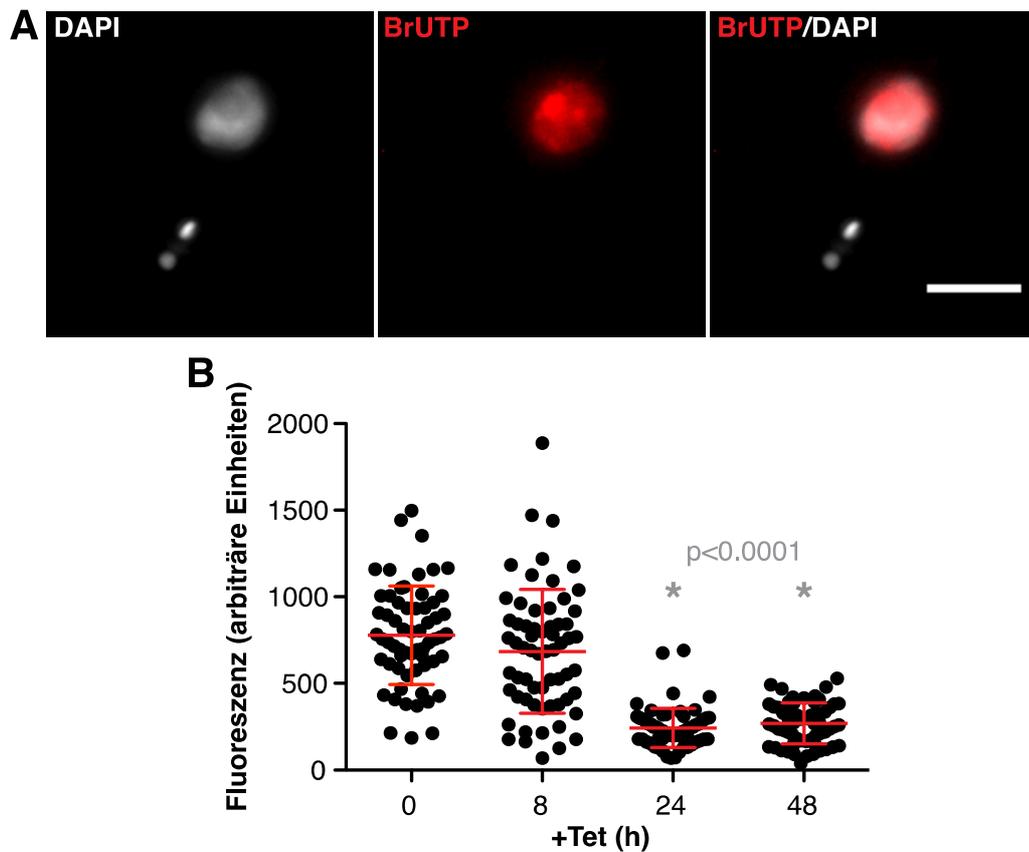


Abbildung 12 Reduktion der RNA Synthese in der ausgedehnten G1-Phase. (A) Maximale Intensitätsprojektionen von 2-Kanal, 3D-Aufnahmen (150x200 nm). Die Zellen wurden für 30 min mit BrUTP inkubiert und anschließend mit einem anti-BrdU und einem AlexaFluor488-konjugiertem sekundären Antikörper inkubiert (rot). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (grau). Maßstabsbalken: 5 μm . (B) Quantifizierung der RNA-Syntheserate. 221^{ES}121^{let} Zellen wurden 0, 8, 24 und 48 h nach *VSG121* Expression mit BrUTP inkubiert und mikroskopisch analysiert. Die Quantifizierung der Transkription als Fluoreszenzintensität wurde mit ImageJ64 durchgeführt und ist als arbiträre Einheiten angegeben. Jeder Datenpunkt entspricht dem Messwert einer Zelle. Die roten Balken zeigen den Mittelwert \pm SD für $n \geq 60$ Zellen. Die Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt.

Durch den Einbau des BrUTP wurden sowohl Transkripte der RNA Polymerase I (Pol I) als auch der RNA Polymerase II (Pol II) markiert und konnten somit nicht getrennt voneinander quantifiziert werden. Um festzustellen, ob die Syntheserate beider Polymerasen gleichwohl betroffen war, wurde ein Luziferase-Reporter-Gen zum einen direkt stromabwärts eines rDNA Promoters und zum anderen in den Tubulin-Locus integriert. Somit war es möglich, die Aktivität eines BES-unabhängigen Pol I transkribierten Locus (rDNA) und die eines Pol II transkribierten Bereichs

(Tubulin) des Genoms zu messen. Hierzu wurde das Luziferase-Gen aus dem pRS mit *HindIII* und *BamHI* mobilisiert und in einen pTSA-Rib (Xong et al., 1998) ligiert, in dem die *Tubulin* 3'UTR durch die *PARP* 3'UTR ersetzt wurde (Doktorarbeit M. Günzel, 2010). Das Hygromyzin-Resistenz-Gen wurde durch ein Puromyzin-Resistenz-Gen ersetzt, um die Selektion in der Zelllinie 221^{ES}121^{tet} zu ermöglichen. Das resultierende Plasmid pRib.Luc wurde mit *SphI* linearisiert und die 221^{ES}121^{tet} - Linie transfiziert, woraus drei Klone der Zelllinie Luc^{rPro}221^{ES}121^{tet} gewonnen wurden (Abbildung 13A). Für die Insertion in den *Tubulin*-Lokus wurde das Luziferase-Gen ebenfalls mittels *HindIII* und *BamHI* aus dem pRS mobilisiert und in den pTub.MITat1.6 ligiert (Doktorarbeit M. Günzel, 2010). Das *BLE*-Gen wurde auch hier durch ein Puromyzin (*PUR*)-Resistenz-Gen ersetzt. Das daraus resultierende Plasmid pTub.Luc wurde mit *NotI* linearisiert und die Zelllinie 221^{ES}121^{tet} transfiziert, woraus zwei Klone der Zelllinie Luc^{tub}221^{ES}121^{tet} gewonnen werden konnten (Abbildung 13B). Die Expression des *VSG121* wurde induziert und nach verschiedenen Zeiten die Luziferase-Aktivität gemessen (Abbildung 13). Nach 24 h reduzierte sich die Enzymaktivität auf 67 % der Ausgangsaktivität in der Luc^{rPro}221^{ES}121^{tet} und auf 62 % in der Luc^{tub}221^{ES}121^{tet} Linie. Nach 48 h war die Luziferaseaktivität auf 30 bis 50 % gesunken. Dies zeigt, dass die Transkription sowohl der Pol I als auch Pol II gleichermaßen reduziert ist.

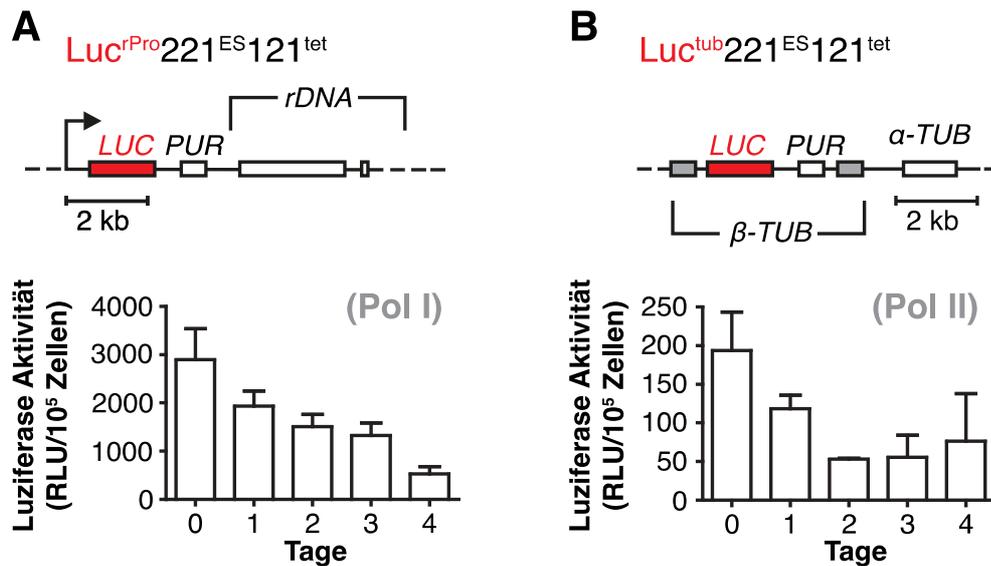


Abbildung 13 Pol I und II weisen eine reduzierte Syntheserate auf. (A) Transkriptionsaktivität eines Pol I Locus. Um die BES-unabhängige Pol I Transkriptionsrate zu messen, wurde ein Luziferase-Reporter-Gen (roter Kasten) in die Promoterregion eines rDNA-Locus integriert (oberes Schema). Der untere Graph zeigt die Luziferase Aktivität zu den angegebenen Zeiten nach Induktion der VSG121 Expression. Die Werte sind mittlere RLU \pm SD von 3 unabhängigen Klonen. **(B)** Transkriptionsaktivität eines Pol II Locus. Die Aktivität der Pol II wurde durch die Integration eines Luziferase-Gens (roter Kasten) in den Tubulin-Lokus gemessen (oberes Schema). Der untere Graph zeigt die Luziferaseaktivität als mittlere RLU \pm SD für 2 unabhängige Klone.

5.4 Der Einfluss der BES-Aktivität auf die Entwicklung der Trypanosomen

Wie die bisherigen Ergebnisse gezeigt haben, führt die ektopische Expression eines zweiten VSGs zu einer graduellen Attenuierung der aktiven BES. Dies wiederum führt zu einem stark verlangsamten Wachstum als Folge einer Verlängerung der G1-Phase. Während dieses ruhenden Zustandes kommt es zu einer globalen Reduktion der Transkriptionsrate. Das ermöglicht den Zellen, in diesem Zustand für 5 Tage zu verweilen, bevor die BES wieder aktiviert wird und die Zellen wieder in den normalen Zellzyklus übergehen.

Das Abschalten der aktiven BES findet allerdings nicht nur während der antigenen Variation eine Bedeutung. Auch während der Transition zu *Short Stumpy* (ST) - Formen muss die BES inaktiviert werden, damit sich die Parasiten auf den Wirtswechsel vorbereiten können. Der hier beschriebene Phänotyp nach *VSG121* Überexpression ähnelt stark dem der nicht-proliferativen ST-Formen. Diese zeichnen sich durch (i) eine graduelle Inaktivierung der BES, (ii) einen G1/G0-Zellzyklusarrest und (iii) einer reduzierten RNA-Syntheserate aus (Amiguet-Vercher et al., 2004). Bei der Zelllinie 221^{ES}, die allen hier generierten Linien zugrunde liegt, handelt es sich allerdings um monomorphe Trypanosomen. Diese haben die Eigenschaft verloren auf SIF zu reagieren und bilden keine ST-Formen mehr aus. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese monomorphen Zellen auf das membranpermeable cAMP-Analog 8-(4-Chlorophenylthio)-Adenosin-3',5'-Cyklisches Monophosphat (pCPT-cAMP) mit der Expression von ST-spezifischen Genen reagieren (Breidbach et al., 2002). Ein solches stadienspezifisches Gen ist das *PAD1* (*Protein Associated with Differentiation 1*). Es kodiert für ein Oberflächentransporterprotein, das nur in Trypanosomen exprimiert wird, die intermediär oder gänzlich zu ST-Formen entwickelt sind. Dieses Protein gehört zu einer Carboxylat-Transporter-Familie, die für die Aufnahme von Citrat und *cis*-Aconitat zuständig sind (Dean et al., 2009). Die Aufnahme dieser Moleküle führt zur Differenzierung der ST-Formen zu PZF. Diese Entwicklung ist u.a. charakterisiert durch die Expression des PZF Oberflächenproteins EP1 (Roditi et al., 1989). Zwar ist der beobachtete

Wachstumseffekt nach *VSG* Überexpression kein eindeutiger G1-Arrest. Allerdings sind die restlichen Kriterien für das ST-Stadium erfüllt. Es wurde daher vermutet, dass die hier beschriebenen ruhenden Trypanosomen ein ST-ähnliches Stadium repräsentieren. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die BES Attenuierung nach der *VSG*-Überexpression zur Expression des ST-spezifischen *PAD1* führt und die Trypanosomen somit sensitiv für das Differenzierungssignal *cis*-Aconitat werden.

5.4.1 Die BES Attenuierung führt zur Expression eines *Short Stumpy Reporters*

Das *PAD1* kodiert für ein Oberflächenprotein, dessen mRNA ebenso wie das Protein selbst nur in ST-Formen detektierbar ist (Dean et al., 2009). Die stadienspezifische Regulation der *PAD1* Expression erfolgt durch Sequenzelemente in der *PAD1* 3'UTR. Wenn diese an ein Reporter-Gen gekoppelt wird, so unterliegt dieses ebenso der stadienspezifischen Regulation und kann in monomorphen Trypanosomen durch pCTP-cAMP induziert werden (MacGregor & Matthews, 2012). Durch die Kopplung der *PAD1* 3'UTR an ein *GFP*-Reporter-Gen können so einzelne Zellen fluoreszenzmikroskopisch als ST-Formen identifiziert werden. Das Plasmid p4231 beinhaltet ein MS2:GFP Fusionsprotein, eine Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS), die *PAD1-PAD2* intergenische Sequenz und ein *BLAS*-Resistenzgen (J. Sunter und M. Carrington, nicht veröffentlicht). Dieses Konstrukt integriert in den *Tubulin*-Locus und wird somit konstitutiv exprimiert und durch die *PAD1* 3'UTR stadienspezifisch reguliert (Abbildung 14A). Um die Funktionalität des Konstrukts zu verifizieren, wurde die parentale Zelllinie 221^{ES} mit dem Plasmid transfiziert. Es konnten zwei Klone der Zelllinie GFP:PAD_{utr}221^{ES} isoliert werden, die für weitere Analysen verwendet wurden. Die Zellen wurden zunächst mit 100 μ M pCPT-cAMP bei 37° C inkubiert und nach 48 h mit AMCA gefärbt und fixiert. Es war ein deutliches GFP-Signal im Nukleus der Zellen zu erkennen, das jedoch in der Kontrollkultur nicht zu beobachten war (Abbildung 14B).

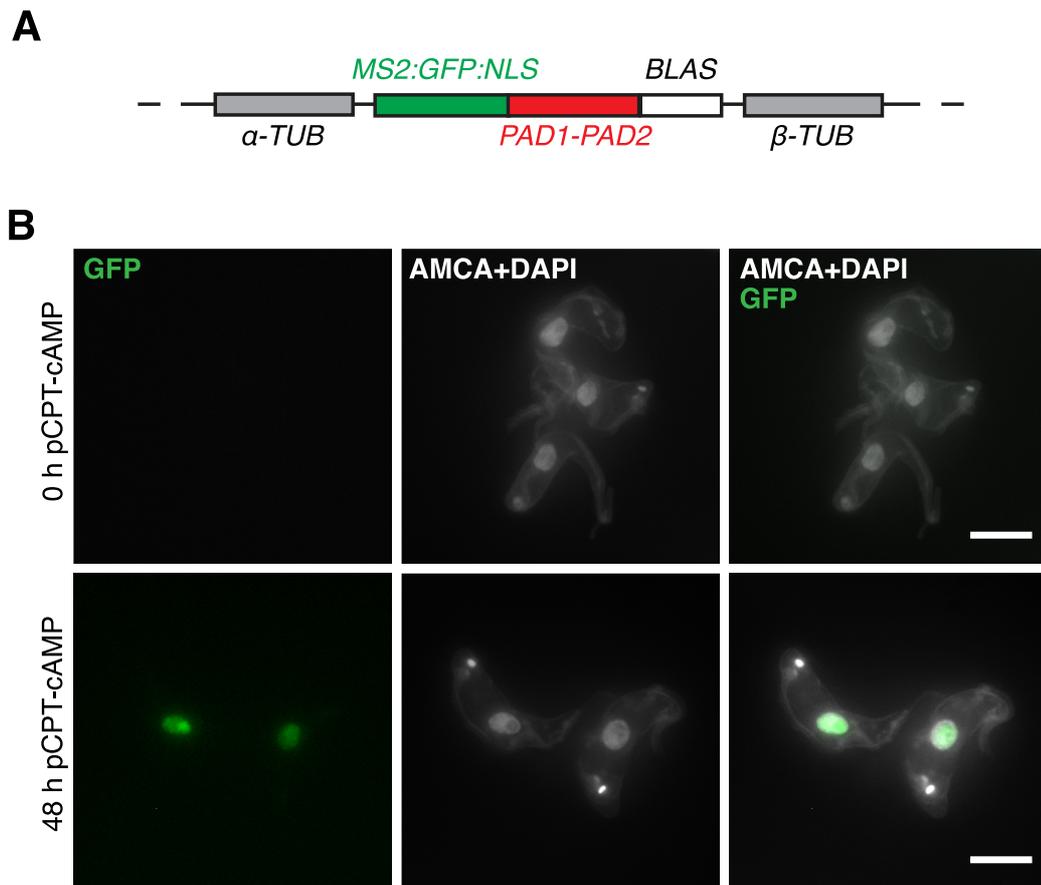


Abbildung 14 Der GFP:PAD_{utr} Reporter ist ein valider Marker für ST-spezifische Genexpression.

(A) Illustration des GFP:PAD_{utr} Reporter-Konstrukts. Der Reporter besteht aus einem MS2:GFP:NLS-Fusionsprotein (grün). Durch die NLS wird das GFP in den Nukleus transportiert und durch die MS2-Sequenz im Kern gehalten. Durch die Kernlokalisation erhält man auch bei schwacher Expression ein deutliches Signal. Die *PAD1-PAD2*-intergenische Sequenz (rot) reguliert die stadienspezifische Expression und die Blastizidin-Resistenz (*BLAS*, weißer Kasten) ermöglicht die Selektion rekombinanter Trypanosomen. Das Konstrukt integriert in den *Tubulin*-Locus zwischen dem α - und dem β -*Tubulin* Gen (α -*TUB* und β -*TUB*, graue Kästen). (B) Maximale Intensitätsprojektionen von 2-Kanal, 3D-Fluoreszenzaufnahmen mit 150 Bildern im Abstand von 200nm. GFP:PAD_{utr}221^{ES}-Zellen wurden für 0 h und 48 h mit 100 μ M pCPT-cAMP inkubiert. Die Zelloberfläche wurde mit AMCA-Sulfo-NHS und die DNA mit DAPI gefärbt (grau). Nach 48 h pCPT-cAMP -Inkubation ist ein deutliches nukleäres GFP-Signal zu erkennen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Als nächstes wurde die Zelllinie 221^{ES}121^{tet} mit dem GFP:PAD_{utr} Reporter transfiziert. Es wurden ebenfalls zwei Klone der Linie GFP:PAD_{utr}221^{ES}121^{tet} isoliert und für weitere Analysen verwendet. Für eine quantitative Analyse der GFP-Expression wurde die Durchflusszytometrie gewählt. Somit konnte nicht nur die relative

Expressionsstärke vor und nach der VSG-Überexpression bestimmt werden, sondern gleichzeitig auch der prozentuale Anteil an Zellen innerhalb einer Kultur, die das GFP exprimierten. Dazu wurden zunächst die GFP:PAD_{utr}221^{ES}-Zellen nach 0 h und 48 h der pCPT-cAMP-Inkubation analysiert (Abbildung 15A). Für die Auswertung der Daten wurde ein Wert für die Fluoreszenzintensität definiert, ab welchem die Zellen als GFP-positiv bewertet wurden. Ohne die Zugabe von pCPT-cAMP (0 h) lagen nur 1,6 % der Zellen im GFP-positiven Bereich. Nach 48 h stieg der Anteil auf 42 % an. Die Durchflusszytometrie erwies sich somit als geeignet, um die Expression des GFP-Reporters nach VSG-Überexpression zu untersuchen. Die Zelllinie GFP:PAD_{utr}221^{ES}121^{tet} wurde dazu mit Tet induziert und die GFP-Fluoreszenz quantifiziert (Abbildung 15B). Für die Analyse der Daten wurde derselbe Grenzwert definiert wie im vorangegangenen Experiment. Als Kontrolle wurde die Zelllinie GFP:PAD_{utr}221^{ES} ebenfalls mit Tet kultiviert und analysiert. Vor Induktion der VSG121-Expression (0 h Tet) lag der Anteil an GFP-positiven Zellen bei 2 %. Während der Anteil an GFP-positiven Zellen in der Kontrollkultur nicht zunahm, stieg der Anteil in der GFP:PAD_{utr}221^{ES}121^{tet} Linie nach 24 h bereits auf 10 % und nach 48 h auf 31 % an.

Dies zeigt, dass die BES Attenuierung nach VSG Überexpression zu der Expression ST-spezifischer Gene führt. Es ist hierbei besonders zu betonen, dass es sich um monomorphe, laboradaptierte Trypanosomen handelt. Diese sind nicht mehr sensitiv für das natürliche Differenzierungssignal SIF und bilden unter normalen Kulturbedingungen keine ST-Formen mehr aus.

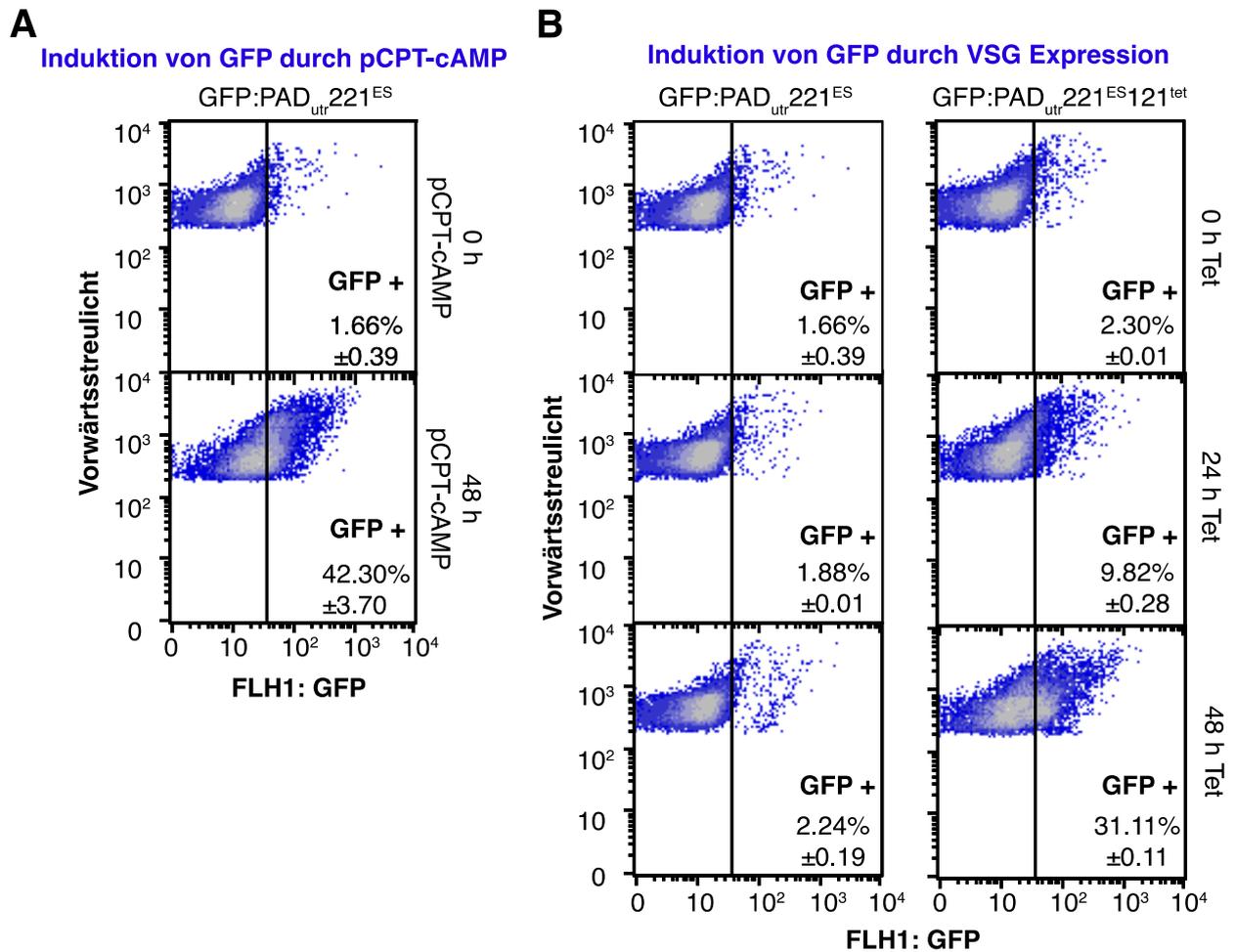


Abbildung 15 Die BES Attenuierung induziert ST-Marker-Gen Expression. (A) Durchflusszytometrie-Analyse der parentalen 221^{ES} Zelllinie mit dem GFP:PAD_{utr}-Reporter integriert im *Tubulin*-Locus. Die Zellen wurden vor (0 h) und 48 h nach Inkubation mit 100 μ M pCPT-cAMP auf GFP-Expression analysiert. (B) Durchflusszytometrie Analyse der parentalen (linke Graphen) und der 221^{ES}121^{tet} Zellen (rechte Graphen), beide mit dem GFP:PAD_{utr} Reporter im Tubulin-Lokus integriert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Tet kultiviert und nach den angegebenen Zeiten auf GFP-Expression analysiert. Der Grenzwert, ab dem die Fluoreszenz als GFP positiv gewertet wurde, ist manuell gewählt worden (vertikale Linie). Die Werte in (A) und (B) sind Mittelwerte \pm SD von je 2 unabhängigen Klonen. Die 0 h Kontrolle der GFP:PAD_{utr} 221^{ES} Zellen in (A) und (B) stammen von derselben Messung.

5.4.2 Das native PAD1 wird stadienspezifisch in der G1-Phase exprimiert

Die oben beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Überexpression eines ektopischen VSGs zur Attenuierung der aktiven BES führt. Dies wiederum führt zu einer Verlängerung der G1-Phase und zur Expression eines ST-spezifischen Reporter-Gens. Sollte der beobachtete Phänotyp tatsächlich ein ST-ähnliches Stadium darstellen, so müsste auch das native PAD1-Protein an der Oberfläche der Trypanosomen exprimiert werden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob der GFP:PAD_{utr} Reporter und das native PAD1 stadienspezifisch in den ruhenden G1-Trypanosomen exprimiert wird. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde die GFP:PAD_{utr}221^{ES}121^{tet} Linie für 48 h mit Tet induziert und anschließend chemisch fixiert. Die Zellen wurden dann mit einem anti-PAD1-Antikörper inkubiert, die DNA mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 16A). Das native PAD1 konnte deutlich auf der Oberfläche der Trypanosomen nachgewiesen werden. Es zeigte sich zudem, dass nur GFP-positive Zellen auch das native PAD1 exprimierten. Die Analyse der Zellzyklusverteilung der GFP- und PAD1-positiven Zellen zeigte in beiden Fällen eine G1-spezifische Expression (Abbildung 16B, C). Allerdings konnte die GFP-Expression auch in 20 % der Zellen anderer Stadien beobachtet werden, wohingegen das native PAD1 ausschließlich in 1K1N Zellen exprimiert wurde. Dies könnte an einer längeren Halbwertszeit des GFPs liegen. Hierbei würden die Zellen, welche die ruhende G1-Phase verlassen haben, kein PAD1 mehr exprimieren. Aufgrund der längeren Halbwertszeit des GFPs bliebe dieses aber noch länger sichtbar als das native PAD1. Zudem ist bekannt, dass während der Differenzierung von pleomorphen Trypanosomen die Akkumulation der *PAD1* mRNA etwa zwei Tage vor der Proteinexpression beginnt (MacGregor et al., 2012). Somit ist es ebenfalls möglich, dass die GFP-positiven Zellen anderer Zellzyklusstadien zwar die *GFP:PAD_{utr}* mRNA und das Reporter-Protein akkumulieren, nicht aber das native PAD1 exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen dennoch, dass das native PAD1 spezifisch in den ruhenden G1-attenuierten Zellen exprimiert wird.

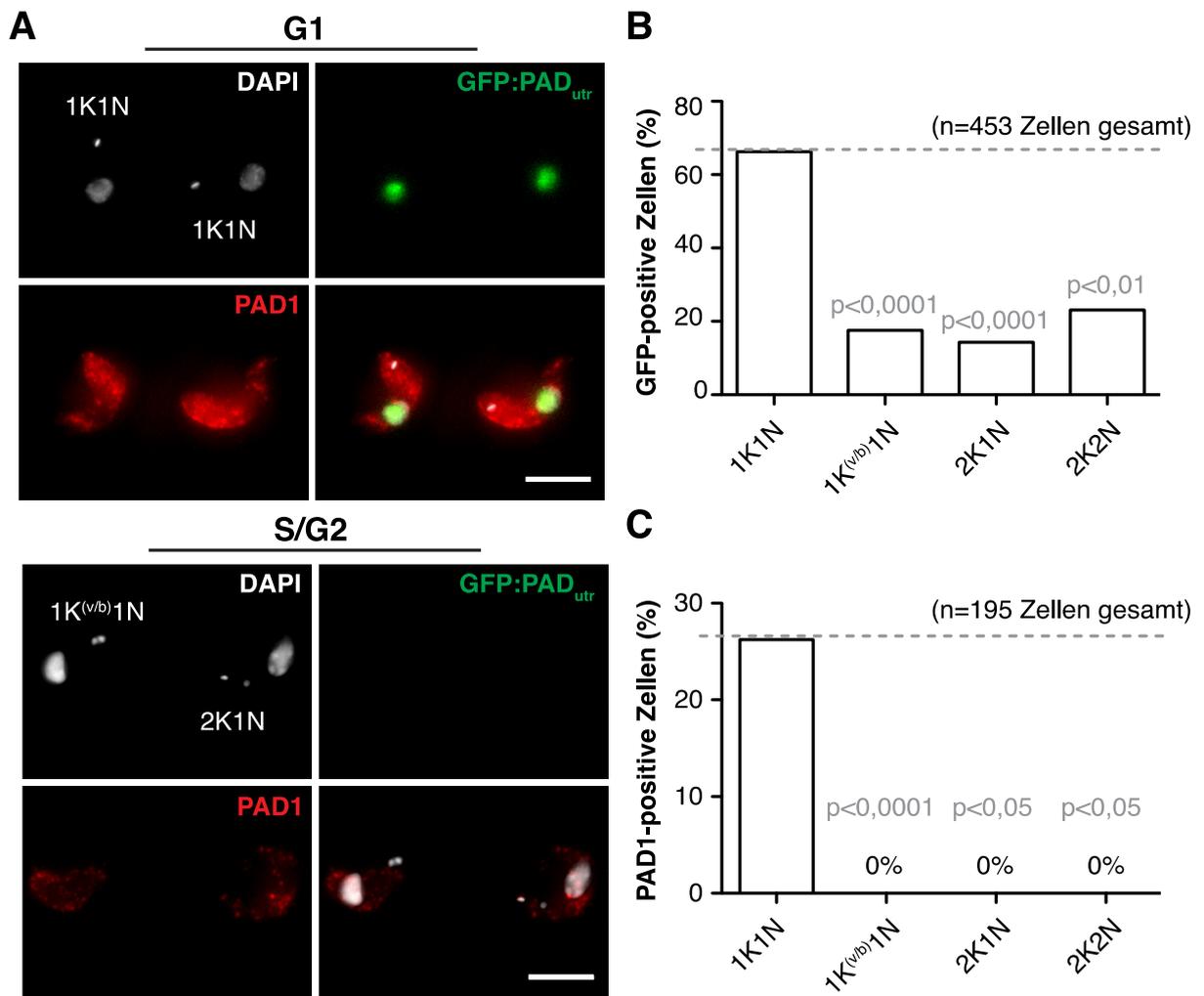


Abbildung 16 Das native PAD1 wird auf der Zelloberfläche von G1 Zellen exprimiert. **(A)** PAD1 Immunfluoreszenz nach VSG121 Überexpression. GFP:PAD_{utr}221^{ES}121^{let}-Zellen wurden für 48 h mit Tet induziert, chemisch fixiert und mit einem anti-PAD1 -Antikörper (rot) inkubiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (grau), um die Position der Zellen im Zellzyklus zu bestimmen. PAD1-positive Zellen zeigten zudem ein deutliches GFP-Signal im Nukleus (grün). Das native PAD1 wurde nur in Trypanosomen in der G1-Phase (1K1N) exprimiert, nicht aber in der G2- und S-Phase (1K^(v/b)1N und 2K1N). Gezeigt sind maximale Intensitätsprojektionen von 3-Kanal, 3D Aufnahmen (100x200 nm). Maßstabsbalken: 10 μ m. **(B, C)** Zellzyklusverteilung der Trypanosomen, welche den GFP:PAD_{utr} Reporter (B) und das native PAD1 Protein (C) exprimieren. Die Zellen wurden wie in (A) behandelt und anhand der Kinetoplasten- und Nukleus-Konfiguration unterteilt. Die Werte sind als Prozent des entsprechenden Zellzyklusstadiums angegeben und die p-Werte wurden mittels Fishers Exakt Test bestimmt.

5.4.3 Die ruhenden Trypanosomen sind differenzierungskompetent

Wie die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, führt die Attenuierung der aktiven BES zu der Expression eines ST-spezifischen Proteins, dem PAD1, in monomorphen Trypanosomen. Die zelluläre Funktion dieses Proteins in ST-Formen ist der Transport von *cis*-Aconitat (CA) und Citrat in die Zelle, wodurch die Differenzierung zum Insektenstadium angestoßen wird (Czichos et al., 1986; Dean et al., 2009). Dieser Prozess geht einher mit der synchronen Expression des PZF-spezifischen Oberflächenproteins EP1 (Roditi et al., 1989). Falls das PAD1 in den hier beschriebenen ruhenden Trypanosomen dieselbe Funktion erfüllt, sollten die Zellen ebenfalls sensitiv für CA sein und mit der Expression von EP1 reagieren. Hierzu wurde die *VSG121* Expression in den 221^{ES}121^{tet} Zellen für 48 h induziert und anschließend CA in einer Konzentration von 6 mM zu den Kulturen gegeben. Die Trypanosomen wurden weiterhin unter BSF-Bedingungen bei 37° C und 5 % CO₂ in HMI-9-Medium gehalten. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Expression des EP1 durch einen Kälteschock induziert wird (Engstler & Boshart, 2004). Zudem wurden die Zellen nach Zugabe von CA ohne Tet kultiviert, um zu verhindern, dass die ektopische *VSG121*-Expression einer *EP1* Expression entgegen wirkte. Nach 0, 6 und 24 h der CA-Inkubation wurden die Kulturen chemisch fixiert und die Expression des EP1 mit einem anti-EP1-Antikörper zunächst fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 17). Die Kontrollkultur (0 h CA) zeigte keine EP1 Expression, aber bereits 6 h nach CA-Zugabe konnte EP1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Nach 24 h konnte zudem eine morphologische Veränderung der Trypanosomen beobachtet werden; das posteriore Ende des Zellkörpers zeigte eine deutliche Verlängerung und der Kinetoplast verlagerte sich in anteriore Richtung hin zum Zellkern. Dies zeigt, dass die attenuierten Trypanosomen das Differenzierungssignal CA aufnehmen und verarbeiten können. Des Weiteren findet nicht nur ein Austausch des Oberflächenmantels durch das EP1 statt, sondern ebenso eine Veränderung der Zellarchitektur.

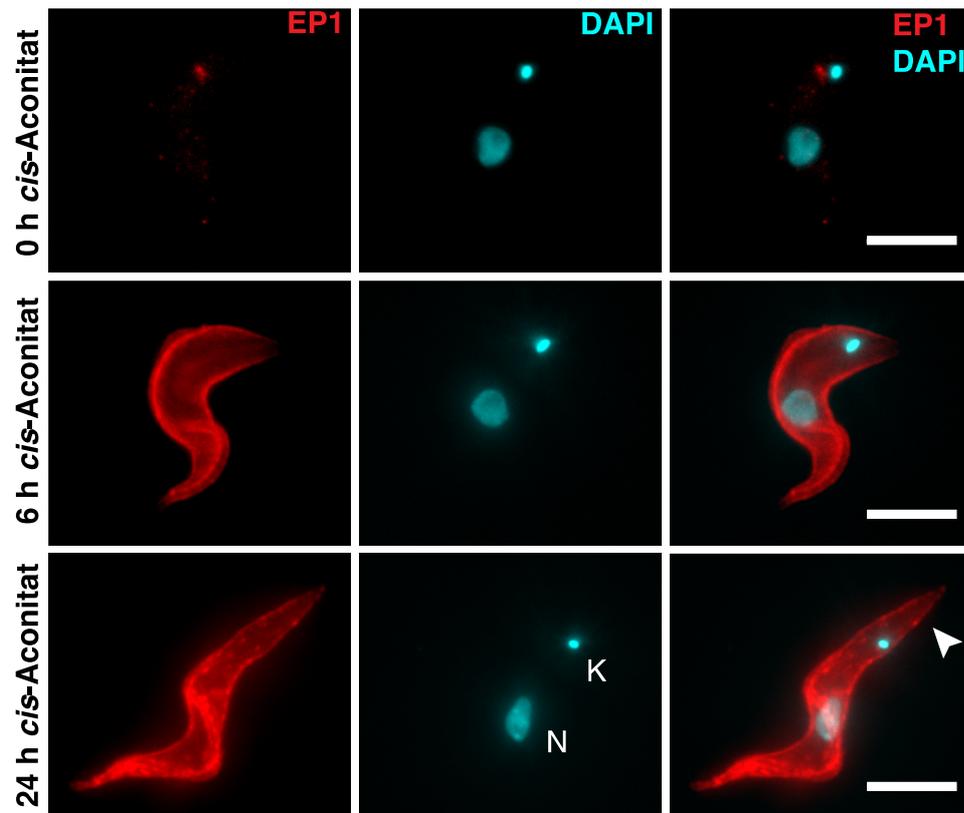


Abbildung 17 Die Attenuierung der BES verleiht den Trypanosomen Sensitivität für das Differenzierungssignal *cis*-Aconitat. Immunofluoreszenz zur Detektion des Oberflächenproteins EP1. 221^{ES}121^{tet} Zellen wurden 48 h nach Induktion der ektopischen *VSG121* Expression mit 6 mM CA für 0, 6 und 24 h kultiviert und fixiert. Die Zellen wurden mit einem primären anti-EP1 und einem AlexaFluor488-konjugiertem sekundären Antikörper inkubiert (rot). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). N, Nukleus; K, Kinetoplast; Pfeil: PZF-typische posteriore Elongation; Maßstabsbalken: 10 μ m.

Um eine quantitative Aussage über die EP1 Expression bezogen auf die Population zu treffen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 18A). Hierzu wurde die 221^{ES}121^{tet} Linie für 48 h mit Tet induziert und anschließend mit CA wie oben beschrieben kultiviert. Als Kontrolle dienten Kulturen, die zuvor nicht mit Tet induziert, ansonsten aber identisch behandelt wurden. Nach 0, 6 und 24 h wurden die Zellen fixiert und nach einer EP1-Immunofluoreszenz analysiert. In den Kontrollkulturen (-Tet) konnte auch nach 24 h keine Änderung des Fluoreszenzprofils beobachtet werden. Die induzierten Kulturen (+Tet) hingegen wiesen schon nach 6 h der CA-Inkubation einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz auf. Um den Anteil der EP1-exprimierenden Zellen innerhalb der Population zu bestimmen, wurde anhand

der 0 h Kontrollen ein Bereich für die Fluoreszenzintensität ausgewählt, in dem die Zellen als EP1 positiv definiert wurden (M1). Die Analyse ergab, dass 6 h nach der CA-Zugabe bereits 22 % und nach 24 h 70 % der Population EP1 exprimierte (Abbildung 18B). In den Kontrollkulturen hingegen konnte kein Anstieg an EP1-positiven Zellen beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine Zellzyklusanalyse durch Bestimmung der Kinetoplasten- und Nukleus-Konfiguration durchgeführt (Abbildung 18C). Diese ergab, dass bereits nach 6 h der CA-Inkubation der Anteil an Trypanosomen in der G1 (1K1N) Phase von 65 % auf 40 % abfiel. Gleichzeitig stieg der Anteil an Zellen mit in Teilung befindlichen oder bereits geteilten Kinetoplasten leicht an. Jedoch konnte auch ein Anstieg von abnormalen Kinetoplasten- und Nukleus-Konfigurationen von 5 auf 18 % beobachtet werden. Diese Experimente zeigen, dass die ruhenden Trypanosomen sensitiv für das Differenzierungssignal CA sind und nach dessen Perzeption wieder in den Zellzyklus eintreten.

Die bisherigen Experimente wurden in BSF-Kulturmedium bei 37° C durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Trypanosomen durch die Attenuierung der aktiven BES unter BSF Bedingungen Differenzierungskompetenz erlangen. Die vollständige Differenzierung und Kultivierung prozyklischer Trypanosomen erfordert allerdings eine hohe Zelldichte bei einer Temperatur von 27° C in Insektenstadien spezifischem Medium. Um festzustellen, ob die BES-Attenuierung nicht nur zu einer Differenzierungskompetenz führt, sondern die komplette Entwicklung zu PZFs erlaubt, wurde das oben beschriebene Experiment unter PZF-Bedingungen wiederholt.

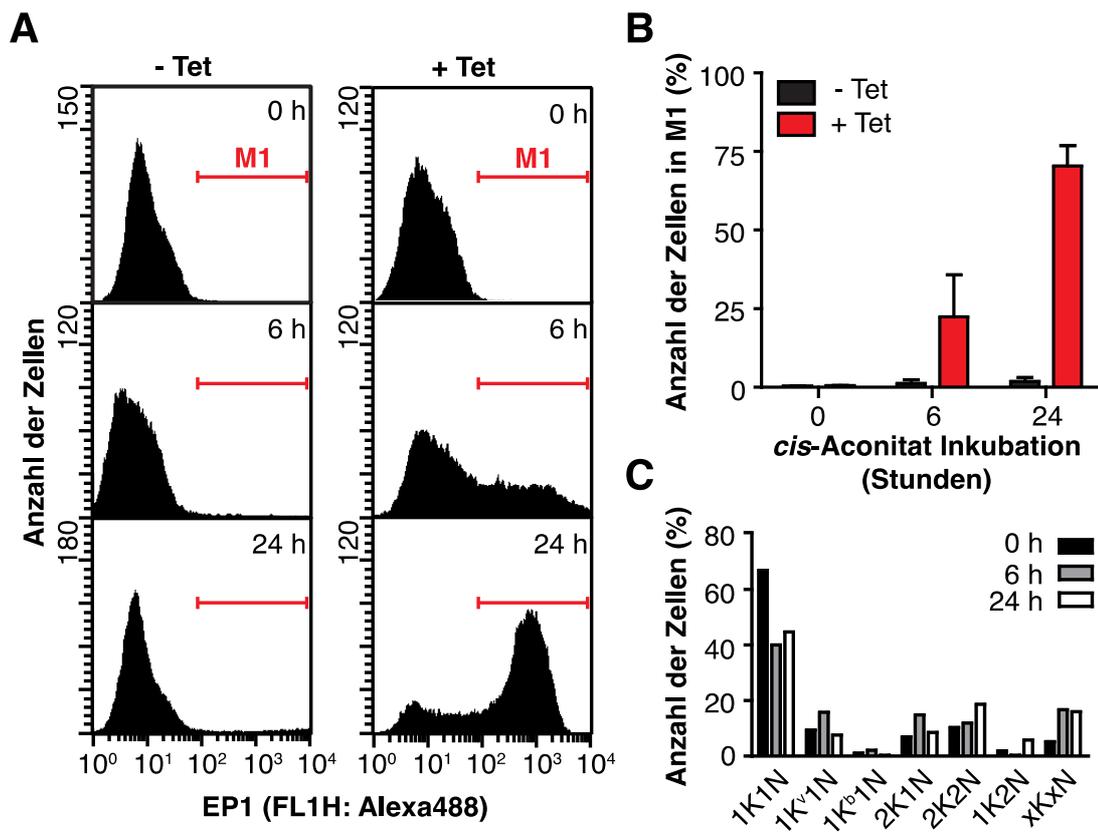


Abbildung 18 Durch die Aufnahme von *cis*-Aconitat wird die G1-Attenuierung aufgehoben. **(A)** Durchflusszytometrie-Analyse der EP1 Oberflächenexpression bei 37° C. Die 221^{ES}121^{tet} Zellen wurden für 48 h mit Tet induziert und anschließend mit 6 mM CA für 0, 6 und 24 h inkubiert (+Tet). Als Kontrolle dienten nicht-induzierte Kulturen (-Tet). Die Zellen wurden fixiert und mittels Immunofluoreszenz die EP1 Expression ermittelt. **(B)** Quantifizierung der EP1-positiven Zellen innerhalb der Populationen aus (A). Alle Zellen im Bereich von M1 wurden dabei als EP1-positiv gewertet. Der Graph zeigt den Anteil der in M1 befindlichen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl als Mittelwert \pm SD von 2 unabhängigen Klonen. **(C)** Zellzyklusanalyse nach CA Inkubation. Die fixierten Zellen aus (A) wurden mit DAPI gefärbt und die Kinetoplasten- und Nukleus-Konfigurationen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden ≥ 100 Zellen ausgewertet.

Nach 48 h Tet-Induktion wurden die Trypanosomen bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in dem Differenzierungsmedium DTM bei 27°C mit 6 mM CA inkubiert. Nach 0, 6 und 24 h wurden die Zellen fixiert und die EP1 Expression mittels Immunfluoreszenz und anschließender Durchflusszytometrie wie oben beschrieben analysiert (Abbildung 19A). Nach 6 h zeigten bereits 58 % der Tet-induzierten Zellen eine EP1 Oberflächenexpression, während nur 5 % der nicht-induzierten Kontrollkulturen EP1-positiv waren (Abbildung 19B). Daraus ergibt sich eine 10-fach höhere Differenzierungskompetenz der attenuierten Zellen verglichen mit der Kontrollpopulation. Nach 24 h waren beide Populationen zu mehr als 70 % EP1-positiv. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die EP1 Expression auch in der Kontrollpopulation durch den Kälteschock von 27°C in Anwesenheit des Differenzierungssignals CA induziert wurde (Engstler & Boshart, 2004). Um die Entwicklung der Population zu verfolgen, wurden die attenuierten Trypanosomen (+Tet) weiterhin in DTM mit CA bei 27°C kultiviert und das Wachstum über mehrere Tage beobachtet (Abbildung 19C). Dabei wurden die Kulturen stets bei einer Zelldichte von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. In den ersten 24 h konnte keine Zunahme der Zelldichte beobachtet werden. In den folgenden Tagen traten die Trypanosomen jedoch wieder in den Zellzyklus ein und wiesen über drei Tage hinweg ein exponentielles Wachstum auf. Diese Verzögerung im Wachstum ist charakteristisch für die Differenzierung von pleomorphen sowie monomorphen Trypanosomen (van Deursen et al., 2001). Wurden die attenuierten Zellen ohne CA kultiviert, blieben diese im Zellzyklus arretiert und zeigten keine Zunahme der Zelldichte. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Attenuierung der BES ausreichend ist, um BSF-Trypanosomen in ein intermediäres Entwicklungsstadium zu überführen, das ihnen die Kompetenz zur vollständigen Differenzierung zu PZF-Trypanosomen verleiht. Für die Expression des insektenstadienspezifischen Oberflächenproteins EP1 und Aufhebung des ruhenden Stadiums ist die Anwesenheit von CA ausreichend. Jedoch benötigt es einen Temperaturwechsel zu 27°C und ein Insektenstadien spezifisches Kulturmedium, um die vollständige Differenzierung zu erreichen.

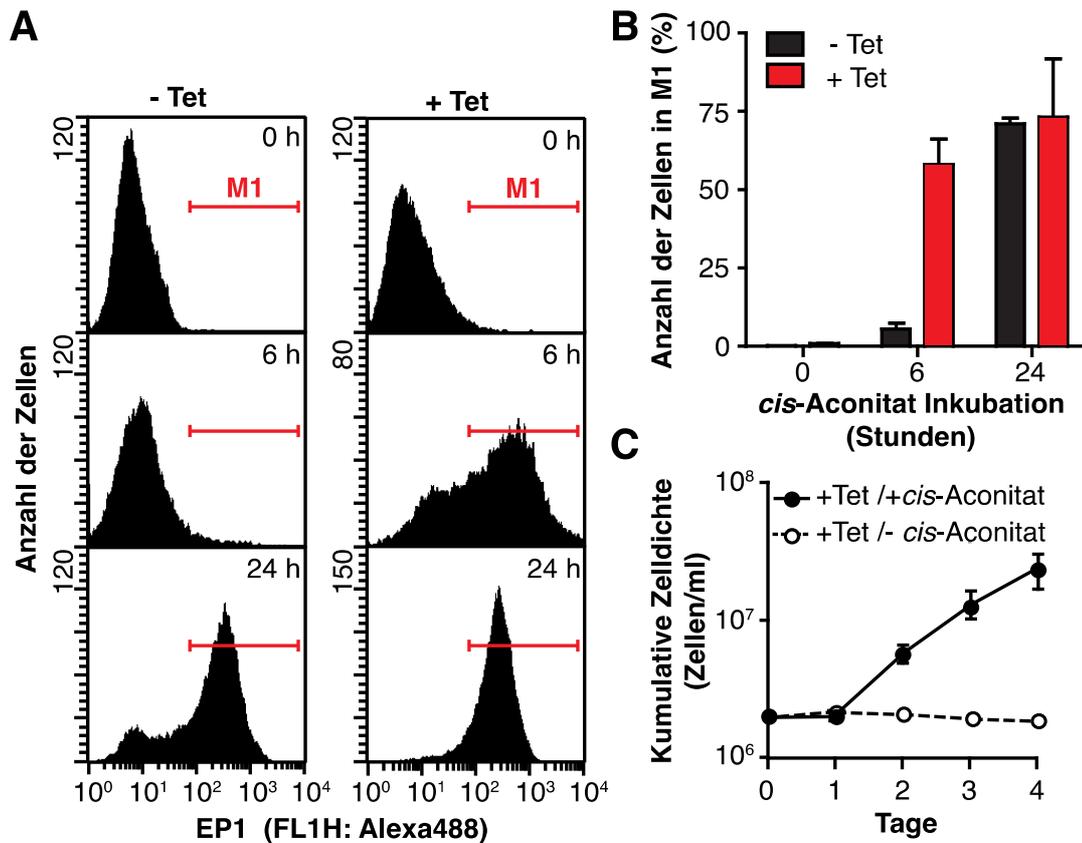


Abbildung 19 Der ruhende Zustand verleiht den Trypanosomen Differenzierungskompetenz (A) Durchflusszytometrie-Analyse der EP1 Expression bei 27° C. 221^{ES}121^{tet} Zellen wurden für 48 h mit Tet induziert (+Tet) und anschließend bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in DTM bei 27° C für 0, 6 und 24 h mit 6 mM CA inkubiert. Nach Immunfluoreszenz gegen EP1 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nicht-induzierte Zellen (-Tet) dienen als Kontrolle. (B) Quantifizierung der EP1-exprimierenden Zellen innerhalb der Populationen aus (A). Alle Zellen im Bereich von M1 wurden dabei als EP1-positiv gewertet. Der Graph zeigt den Anteil der in M1 befindlichen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl als Mittelwert \pm SD von 2 unabhängigen Klonen. (C) Populationswachstum nach Differenzierung. 48 h Tet induzierte 221^{ES}121^{tet} Zellen wurden bei einer Zelldichte von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml in DTM bei 27° C mit (+Tet/+cis-Aconit) und ohne (+Tet/-cis-Aconit) kultiviert und täglich die Zellzahl bestimmt. Die Kurven zeigen Mittelwerte \pm SD von 2 unabhängigen Klonen.

5.5 Die Aktivität der BES wird durch *ESAG1* und *ESAG2* gemessen

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Attenuierung der aktiven BES zu einer verlangsamten G1-Phase und zur Expression eines ST-Markers führt. Darüber hinaus erlangen die Trypanosomen in dieser ruhenden Phase vollständige Differenzierungs-Kompetenz. Was aber führt zum Eintritt in diese ruhende Phase? Der frühe Effekt der *VSG121* Überexpression ist die graduelle Attenuierung der aktiven BES. Dies geht einher mit einer Abnahme der *ESAG* mRNAs. Da die Attenuierung am Telomer beginnt, nehmen telomernahe *ESAGs* früher ab als weiter stromaufwärts gelegene. Die *ESAGs 1* und *2* sind in allen bekannten BESs dem Telomer am nächsten gelegen (Hertz-Fowler et al., 2008) und dadurch bei einer BES Attenuierung als erste betroffen. Um eine mögliche Beteiligung der *ESAGs* an dem Eintritt in die ruhende Phase zu ermitteln, wurden die Auswirkungen einer Depletion von *ESAG1* und *ESAG2* durch RNAi in der GFP:PAD_{utr} Zelllinie untersucht.

5.5.1 Die Depletion von *ESAG1* und *2* führt zu Wachstumsdefekten und induziert den *Short Stumpy*-Marker GFP:PAD_{utr}

Zur Herstellung der RNAi Zelllinien wurden *ESAG1* und *2* aus dem Genom der 221^{ES} Zellen amplifiziert und mit *HindIII* und *SpeI* in das RNAi-Plasmid p2T7 (Shi et al., 2000) ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden mit *NotI* linearisiert und in die GFP:PAD_{utr} 221^{ES} Zelllinie transfiziert. Von den so gewonnenen Zelllinien *ESAG1*^{RNAi} und *ESAG2*^{RNAi} wurden 2 bzw. 3 Klone isoliert und für weitere Analysen verwendet. Zunächst wurden die Auswirkungen der RNAi auf das Wachstum der Zellen untersucht. Dazu wurden die Populationen mit Tet induziert und die Zellzahlen täglich über 5 Tage bestimmt (Abbildung 20, untere Graphen). Nach 3 Tagen konnte in beiden Linien ein deutlicher Einbruch im Wachstum beobachtet werden. In den *ESAG1*^{RNAi}-Zellen normalisierte sich das Wachstum wieder nach 5 Tagen und wies keinen Unterschied mehr zur nicht induzierten Kontrolle auf (Abbildung 20A). Die

RNAi gegen *ESAG2* zeigte einen stärkeren Wachstumseinbruch an Tag 3. Im weiteren Verlauf erholte sich das Wachstum nicht und die Zellen starben ab (Abbildung 20B). Um die Effektivität der RNAi zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA nach 0, 24 und 48 h der Induktion isoliert und mittels Northern Blot analysiert (Abbildung 20, obere Felder). Nach RNAi gegen *ESAG1* waren bereits an Tag 1 der Induktion nur noch 30 % der mRNA vorhanden. Die Quantifizierung der *ESAG2* mRNA nach RNAi zeigte eine Abnahme auf 3 % an Tag 1.

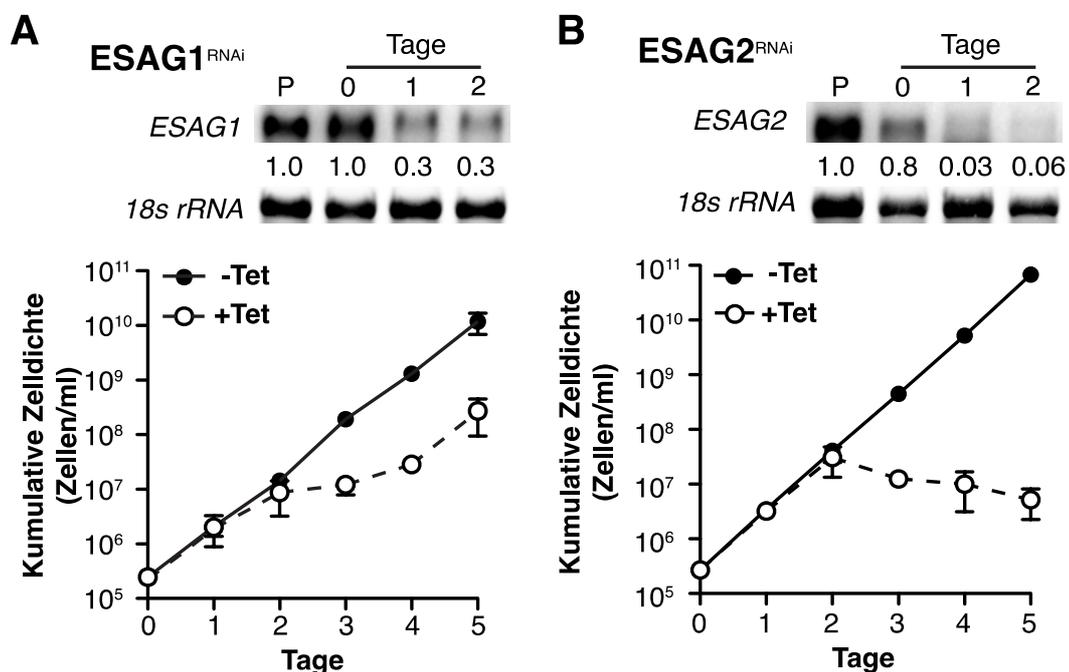


Abbildung 20 Die Depletion von ESAG 1 und 2 durch RNAi führt zu unterschiedlichen Wachstumsdefekten. Northern Blot-Analyse der *ESAG* mRNAs (obere Felder) und Wachstumsanalyse (untere Felder) nach RNAi gegen (A) *ESAG1* und (B) *ESAG2*. Die Northern Blots wurden mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden hybridisiert und mittels digitaler Radiographie quantifiziert. Anschließend wurden die Blots mit einer fluoreszenten Sonde gegen die 18s rRNA hybridisiert und mit dem Licor Odyssey System quantifiziert. Die einzelnen Werte wurden auf die rRNA normiert und sind relativ zur parentalen 221^{ES} Zelllinie (P) angegeben. Die Wachstumskurven zeigen die kumulative Zellzahl/ml als Mittelwert \pm SD von 2 (*ESAG1^{RNAi}*) und 3 (*ESAG2^{RNAi}*) unabhängigen Klonen (Die Wachstumsanalyse wurde von S. Markert durchgeführt).

Zeitgleich mit der Wachstumsanalyse wurde die Expression des GFP:PAD_{utr} Reporters mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 21). Bereits an Tag 2 der RNAi-Induktion konnte in beiden Fällen in etwa 40 % der Population eine GFP-Expression gemessen werden. Nach 3 Tagen betrug der Anteil an GFP-positiven Zellen nach *ESAG1* RNAi 60 %, im Falle der *ESAG2* RNAi 80 %. Mit der Normalisierung des Wachstums der *ESAG1*^{RNAi} Linie an Tag 4 sank auch der Anteil an GFP-positiven Zellen, während dieser in der *ESAG2*^{RNAi} Linie bei 80 % verblieb. Sowohl der Wachstumseinbruch als auch die GFP:PAD_{utr} Expression traten erst nach 2 bis 3 Tagen der RNAi auf, obwohl die *ESAG* mRNAs bereits nach einem Tag depletiert waren. Dies entspricht der gleichen Kinetik wie im Falle der *VSG121*-induzierten BES Attenuierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Abfall von *ESAG1* und *ESAG2* als Konsequenz einer BES Attenuierung die Expression des ST-Markers induziert.

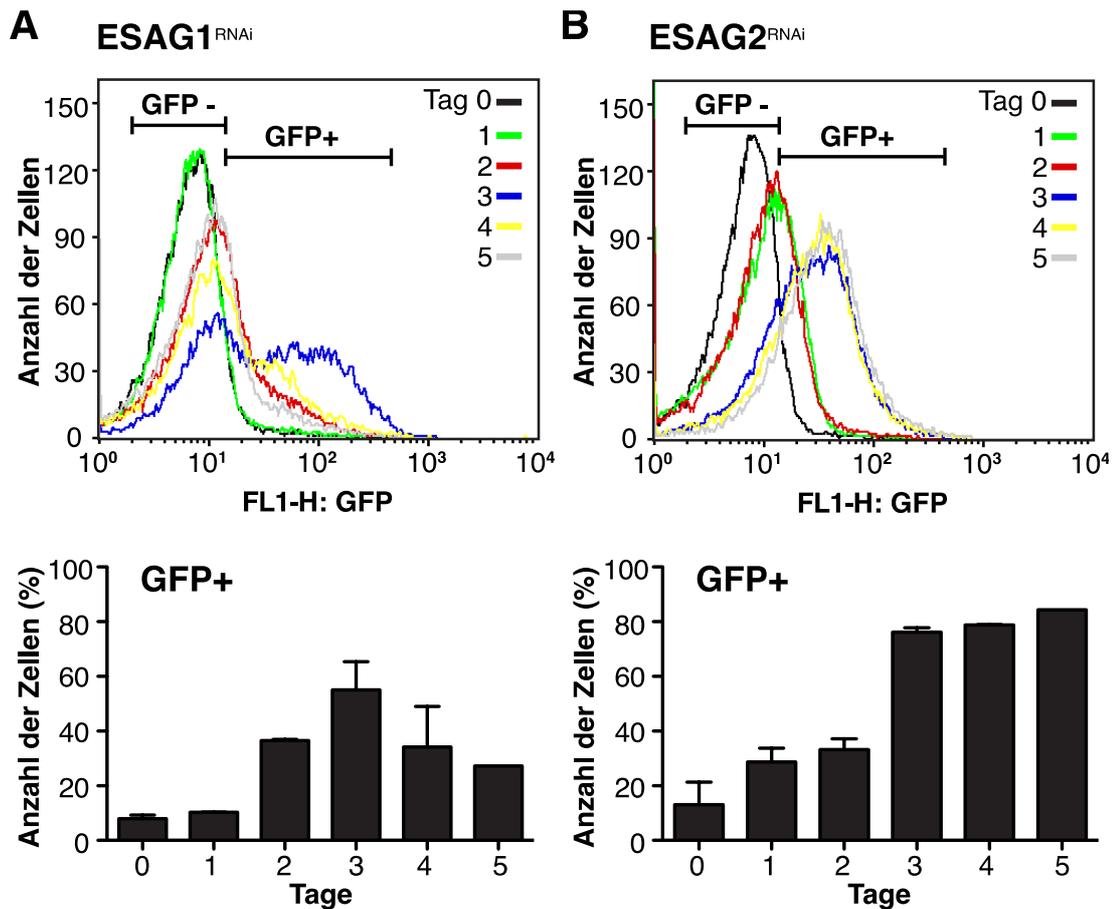


Abbildung 21 ESAG1 und 2 RNAi induziert GFP:PAD_{utr} Expression. Durchflusszytometrie-Analyse nach RNAi gegen (A) *ESAG1* und (B) *ESAG2*. Die Zellen wurden mit Tet induziert und zu den angegebenen Zeiten die GFP-Fluoreszenz analysiert (obere Graphen). Es wurde anschließend ein Bereich der Fluoreszenzintensität definiert, ab dem die Zellen als GFP-positiv (GFP+) gewertet wurden. Die unteren Graphen zeigen den Anteil an GFP+ -Zellen in der Population als Mittelwerte \pm SD von 2 (*ESAG1^{RNAi}*) und 3 (*ESAG2^{RNAi}*) unabhängigen Klonen.

5.6 Die Funktion der VSG 3'UTR bei der Regulation der BES Aktivität

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass allein die induzierte ektoische Expression des *VSG121* zu einer graduellen Attenuierung der aktiven BES führt. Die Transkription des ektoischen VSGs erfolgte dabei durch eine T7 RNA Polymerase aus einem nicht-BES-Locus. Zudem wurden keine *ESAGs* mit dem ektoischen VSG co-transkribiert. Dies ließ vermuten, dass das *VSG121* selbst ein Signal zur Attenuierung der BES liefert. Sollte es sich hierbei um einen generellen Mechanismus zur Kontrolle der BES-Aktivität handeln, müsste dieser alle VSGs gleichermaßen erfassen können. Obwohl VSG Proteine eine konservierte Tertiärstruktur aufweisen, unterscheiden sich die Sequenzen der VSG Gene jedoch deutlich voneinander. Die 3' untranslatierte Region (UTR) jedes bekannten VSG Gens besitzt jedoch ein zu 100 % konserviertes Sequenzmotiv bestehend aus 16 Nukleotiden (16mer). Thermodynamische Berechnungen zeigen, dass dieses, zusammen mit einer weiteren, hoch konservierten Sequenz aus 8 Nukleotiden (8mer), eine helikale Tertiärstruktur ausbildet (Abbildung 22). Die Deletion des gesamten 16mer ($\Delta 39-198$) oder Teile davon ($\Delta 46-52$ und $\Delta 49-53$) reduzierten die VSG Mengen um bis zu 95 % verglichen mit der wt UTR. Mutationen in der Schleifenregion (AC41-42UA und UGA46-48ACU) hatten dagegen keinen Effekt, ebenso wie eine Invertierung des kompletten 8mers (Diplomarbeit C. Batram, 2009). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das 16mer als Teil einer Stamm-Schleifen-Struktur direkt erkannt und die mRNA dadurch stabilisiert wird. Des Weiteren zeigten die Analysen von konsitutiven VSG Doppelexpressoren, die zwei VSGs aus derselben BES exprimierten, dass die Gesamtmenge an VSG mRNA nicht über 100 % verglichen mit Einzelexpressoren lag (Diplomarbeit B. Uhl, 2009; Diplomarbeit K. Fey, 2011). Demnach könnte das konservierte Sequenzmotiv zusätzlich dazu dienen, die Menge an VSG mRNA zu "zählen" und zu limitieren. Durch einen kurzfristigen Anstieg der VSG mRNA Menge könnte dieser Zählmechanismus so ein Signal zur Attenuierung der aktiven BES auslösen. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden ein *VSG121* mit bereits charakterisierter

Mutation im 16mer, sowie *GFP* Reporter-Gene mit nativer *VSG121* 3'UTR induzierbar exprimiert und die Auswirkungen auf das Wachstum sowie der endogenen *VSG221* mRNA untersucht.

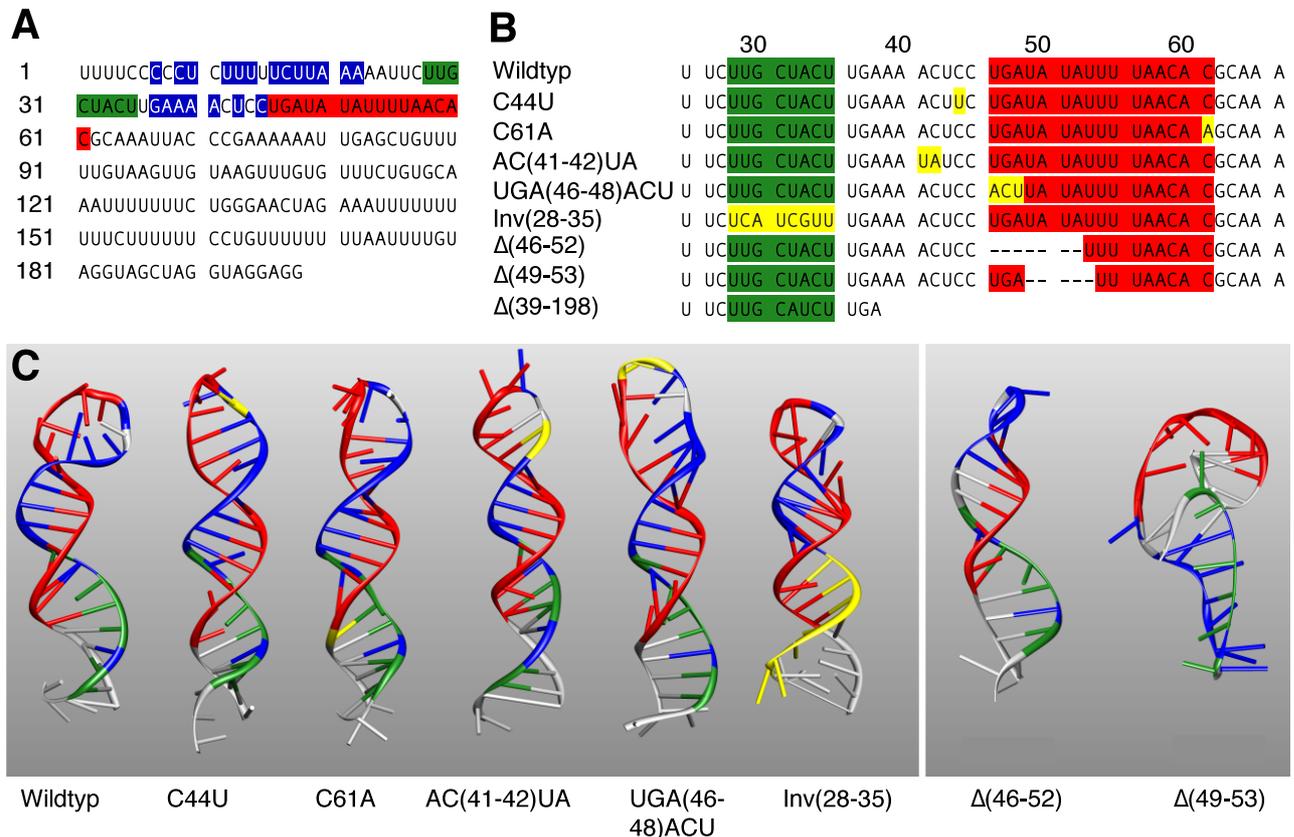


Abbildung 22 Mutationsanalyse der konservierten VSG 3'UTR. (A) Die komplette *VSG121* 3'UTR umfasst 198 Nukleotide. Alle *VSG* 3'UTRs in den Genomdatenbanken besitzen ein Sequenzelement von 16 Nukleotiden (16mer; rot), das zu 100 % konserviert ist. Zusätzlich ist die Sequenz zwischen dem Stop-Codon und dem 16mer ebenfalls hoch konserviert (blau). Innerhalb dieses Abschnittes ist ein weiteres, 8 Nukleotide umfassendes Motiv ebenfalls zu nahezu 100 % konserviert (8mer; grün). (B, C) *VSG121* Gene mit mutierten 3'UTRs wurden zusätzlich zum endogenen *VSG* aus der *VSG221* BES exprimiert und die Expressionsmengen mit der wildtypischen *VSG121*-Kontrolle verglichen. RNA-Strukturvorhersagen (Cylofold; <http://cylofold.abcc.ncifcrf.gov>) sowie die Analyse der Faltungsthermodynamik (iFoldRNA; <http://troll.med.unc.edu/ifoldrna/>) deuten darauf hin, dass die konservierten Nukleotide notwendig sind, um eine stabile Tertiärstruktur auszubilden (Modellierung und Abbildung von M. Engstler).

5.6.1 Das konservierte 16mer ist notwendig für die Initiation der BES Attenuierung

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits ein *VSG121* hergestellt, in dem die Nukleotide 46 bis 52 der 3'UTR deletiert wurden (Abbildung 22B, C). Dieses *VSG M1.6-Δ(46-52)* wurde konstitutiv aus der aktiven *VSG221* BES der Zelllinie 221^{ES} exprimiert (Diplomarbeit C. Batram, 2009). Die Menge des Proteins dieser mutierten mRNA war um ein 10-faches geringer im Vergleich zu der wt mRNA, was auf die stabilisierende Funktion des Sequenzmotivs zurückzuführen ist. Um eine eventuelle Funktion des 16mers bei der Regulation der BES-Aktivität zu untersuchen, wurde das mutierte *VSG* in der 221^{ES} Zelllinie induzierbar exprimiert. Hierzu wurde das *M1.6-Δ(46-52)* mit *HindIII* aus dem Donor-Plasmid pBSK.M1.6-Δ(46-52) mobilisiert und in den Expressionsvektor pRS ligiert. Das resultierende Plasmid pRS.M1.6-Δ(46-52) wurde mit *NotI* linearisiert und in die parentale 221^{ES} Linie transfiziert. Von der resultierenden Zelllinie 221^{ES}121Δ(46-52)^{tet} konnten zwei Klone isoliert werden, die für weitere Analysen verwendet wurden. Nach Tet Induktion wurde das Wachstum beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten Gesamt-RNA und Protein isoliert und mittels RNA bzw. Protein Dot Blot quantitativ analysiert (Abbildung 23). Nach der Induktion verlangsamte sich das Wachstum zwar leicht, es kam jedoch zu keiner Zeit zu einem vergleichbaren Einbruch wie im Falle der *VSG121* wt Überexpression (Abbildung 23A, B). Die ektopische *VSG121* mRNA Menge stieg innerhalb von 24 h lediglich auf 30 % an und die *VSG221* mRNA fiel nach 8 h kurzfristig auf etwa 70 % ab. Diese stieg innerhalb der folgenden 4 h jedoch wieder auf die Ausgangsmenge an (Abbildung 23C, linker Graph). Die Summe beider mRNA-Mengen betrug über den gesamten Zeitraum nicht signifikant mehr als 100 %. Die Proteinmengen beider *VSGs* verhielten sich ebenso wie die mRNA Mengen (Abbildung 23C, rechter Graph). Dies zeigt, dass das konservierte 16mer Sequenzmotiv für eine hohe *VSG* Expression und die Attenuierung der aktiven BES notwendig ist.

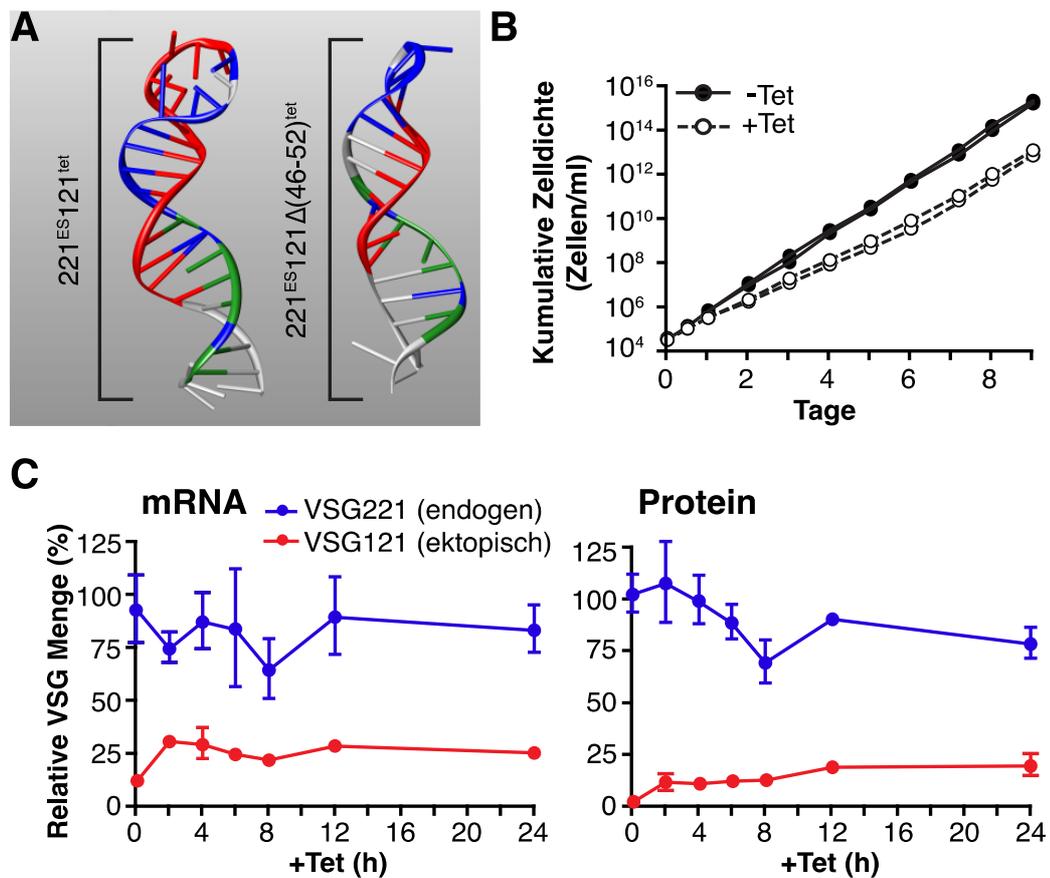


Abbildung 23 Das 16mer ist notwendig für eine BES Attenuierung. (A) Vergleich der Tertiärstruktur des Sequenzmotivs in der *VSG121* wt und $\Delta(46-52)$ 3'UTR (siehe Abbildung 23). (B) Wachstumsanalyse der $221^{ES}121\Delta(46-52)^{tet}$ Zellen. Zwei Klone wurden jeweils ohne (-Tet, ausgefüllte Kreise) und mit (+Tet, offene Kreise) Tet kultiviert und die Zellzahl täglich bestimmt. (C) Quantifizierungen der mRNA (links) und Protein (rechts) -Mengen nach ektopischer *VSG121\Delta(46-52)* Expression. Gesamt-RNA und -Protein wurde zu den angegebenen Zeiten nach Tet-Induktion isoliert und mittels Dot Blot quantifiziert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SD von 2 unabhängigen Klonen und sind relativ zu den parentalen Zelllinien 221^{ES} (*VSG221*) und 121^{wt} (*VSG121*) angegeben.

5.6.2 Die Expression eines Reporter-Gens mit *VSG121* 3'UTR führt zur Depletion der endogenen *VSG* mRNA

Es konnte bis jetzt gezeigt werden, dass die ektopische Expression eines zweiten *VSGs* zu einer Attenuierung der aktiven BES führt, was wiederum zu einer Retardation in der G1-Phase des Zellzyklus führt. Ein konserviertes Sequenzmotiv in der *VSG* 3'UTR erwies sich hierbei als unabdinglich für die Expression hoher Mengen *VSG* und für die Initiation der BES Attenuierung. Es wurde nun untersucht, ob die *VSG* 3'UTR nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist, um die aktive BES zu attenuieren. Dazu wurde ein *GFP* Reporter-Gen mit der *VSG* 3'UTR induzierbar exprimiert. Hierzu wurde zunächst die *GFP*-kodierende Sequenz aus dem Plasmid p3822 mit den Oligonukleotiden CFP_U.HindIII und 04_GFP_BamHI_L amplifiziert und mit den Restriktions-Schnittstellen *Sma*I und *Bam*HI in einen pBSK(+) ligiert. Die *VSG* 3'UTR wurde aus dem Plasmid pBSK.M1.6-198 mit den Oligonukleotiden M1.63'UTRBgIII_U und M1.6_full_lower amplifiziert und mit den Schnittstellen *Bg*III und *Bam*HI hinter die *GFP* kodierende Sequenz ligiert. Das *GFP* mit *VSG121* 3'UTR wurde dann mit *Hind*III und *Xba*I in den pRS kloniert, woraus der Expressionsvektor pRS.GFP-198 resultierte. Dieser wurde dann mit *Not*I linearisiert und in die parentale 221^{ES} Linie transfiziert. Drei Klone der so entstandenen Zelllinie 221^{ES}GFP^{tet} wurden für weitere Analysen isoliert. Um die Expression und Induzierbarkeit des *GFP* Reporter-Gens zu verifizieren, wurden Trypanosomen 0 und 6 h nach Tet-Induktion fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 24A). Nach 6 h der Induktion war ein starkes zytoplasmatisches *GFP*-Signal sichtbar, womit die *GFP*-Reporterzelllinie für weitere Analysen geeignet schien. Die Wachstumsanalyse zeigte bereits 48 h nach der Induktion einen deutlichen Einbruch, woraufhin die Zellen schließlich abstarben (Abbildung 24B). Um die Auswirkungen der Überexpression der heterologen mRNA auf die *VSG*-Expression zu untersuchen, wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der Induktion RNA von zwei Klonen isoliert und mittels Dot Blot quantifiziert (Abbildung 24C). Nach 2 h der Tet-Induktion kam es zu einem starken Anstieg der *GFP* mRNA Menge. Die *VSG221* mRNA fiel nach 8 h auf 60 % der Ausgangsmenge ab, lag nach 24 h jedoch wieder bei 100 %. Die Expression eines heterologen Gens mit der *VSG* 3'UTR führt somit kurzzeitig zu

einem Abfall der endogenen VSG mRNA Menge, jedoch nicht zu einer Attenuierung der BES. Wäre dies der Fall, sollten nach 8 h der Induktion nur noch 20 bis 30 % der VSG mRNA vorhanden sein (siehe Abbildung 5). Des Weiteren normalisierte sich die VSG mRNA Menge nach 24 h und die Zellen starben ab. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Menge an GFP-Protein zurück zu führen, das über einen längeren Zeitraum toxisch zu sein scheint.

Das *GFP* Reporter-Gen besaß in diesem Experiment keine sekretorischen Signalsequenzen und wurde somit zytoplasmatisch translatiert. Das VSG dagegen ist das dominierende Protein auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen und wird durch ein N-terminales Signalpeptid co-translational in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Sollte ein putativer VSG mRNA Zählmechanismus direkt am ER operieren, würde eine zytosolische mRNA diesem entgehen. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde das GFP mit einer Signalsequenz (*leader sequence*, LS) versehen, um den Transport in das ER zu ermöglichen. Da der Einfluss der 3'UTR unabhängig von der kodierenden Sequenz des VSGs analysiert werden sollte, wurde die LS von dem Hauptoberflächenprotein der PZF-Trypanosomen, dem Prozyklin EP1, gewählt. Auch das EP1 wird in das ER transportiert, beschreibt also den gleichen sekretorischen Weg wie das VSG. Hierzu wurde aus dem Plasmid pRS.LS::GFP::GPI-198 (Diplomarbeit C. Batram, 2009) mittels *BstEII* das *EP1::LS* enthaltene Fragment mobilisiert und in das Plasmid pRS.GFP-198 ligiert, das ebenfalls mit *BstEII* geöffnet wurde. Das resultierende Plasmid pRS.LS::GFP-198 kodierte somit für ein LS::GFP-Fusionsprotein mit der *VSG121* 3'UTR und wurde in die 221^{ES} Zellen transfiziert. Von der resultierenden Zelllinie 221^{ES}LS::GFP^{tet} konnten zwei Klone isoliert werden, welche für weitere Analysen verwendet wurden.

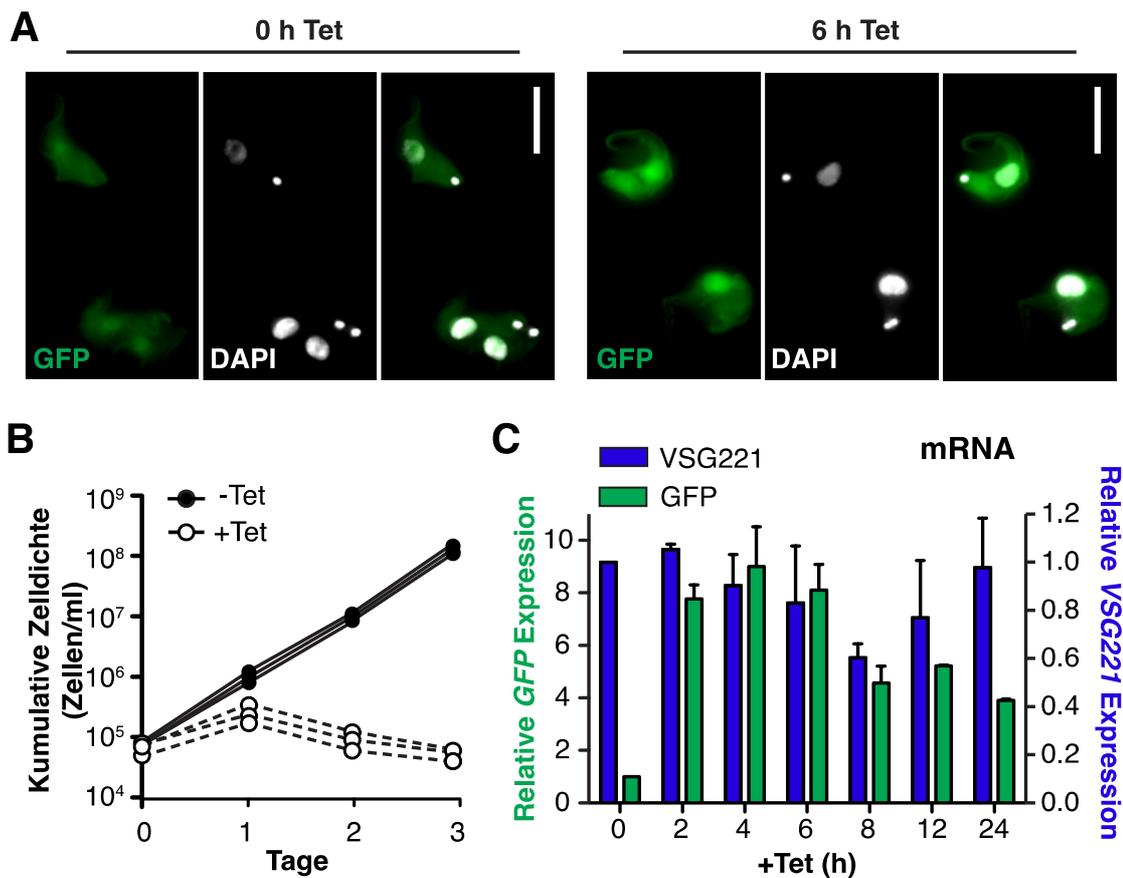


Abbildung 24 Die VSG 3'UTR ist nicht ausreichend für eine BES Attenuierung. (A) Maximale Intensitätsprojektionen von 2-Kanal, 3D Fluoreszenzaufnahmen mit 150 Bildern im Abstand von 200 nm. $221^{\text{ES}}\text{GFP}^{\text{tet}}$ Zellen wurden vor (0 h Tet) 6 h nach Tet-Induktion fixiert und mit DAPI (blau) gefärbt. Das GFP (grün) ist im Zytoplasma lokalisiert. Maßstabsbalken: $10\ \mu\text{m}$. (B) Wachstumsanalyse der $221^{\text{ES}}\text{GFP}^{\text{tet}}$ Zellen. Drei unabhängige Klone wurden mit (+Tet, offene Kreise) und ohne (-Tet, ausgefüllte Kreise) Tet kultiviert und die Zellzahl täglich bestimmt. (C) Quantifizierung der *GFP* und *VSG221* mRNA. Zu den angegebenen Zeiten nach Tet-Induktion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA Dot Blot quantifiziert. Die Werte sind als relative Expression bezogen auf die jeweilige Ausgangsmenge dargestellt. Die linke Y-Achse bezieht sich auf die *GFP* Expression (grüne Balken) und die rechte Y-Achse auf die *VSG221* Expression (blaue Balken). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD für 2 unabhängige Klone.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte bestätigt werden, dass das GFP im ER lokalisiert war (Abbildung 25A). Bereits nach 6 h Tet-Induktion war eine starke Zunahme der Fluoreszenz zu erkennen. Diese war nicht homogen verteilt, sondern es konnten neben einer größeren, posterioren Akkumulation auch kleinere, anteriore Strukturen beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass das GFP im ER akkumuliert und dort zu Protein-Aggregaten führt, die die Struktur des Organells beeinträchtigen. Eine Wachstumsanalyse der Zellen ergab, dass die Populationen bereits 4 h nach Tet-Zugabe begannen, abzusterben (Abbildung 25B). Die Quantifizierung der *GFP* und *VSG221* mRNA Mengen zeigte, dass die *GFP* mRNA bereits 2 h nach Tet-Induktion um das 8-fache stärker exprimiert wurde als vor der Induktion (Abbildung 25C). Nach 6 h war der Höchstwert von einer 12-fachen Expression zu messen. Die *VSG221* mRNA fiel parallel dazu nach 2 h auf 20 % der Ausgangsmenge ab und blieb über 24 h konstant bei diesem Wert. Die Abnahme der *VSG* mRNA ist somit wesentlich schneller und ausgeprägter, wenn die Reporter mRNA an das ER geleitet und nicht im Zytoplasma translatiert wird. Ferner ist die Abnahme schneller als die bekannte Halbwertszeit der *VSG* mRNA von 4,5 h (Ehlers et al., 1987). Ob in diesem Fall die aktive BES attenuiert wird, konnte nicht geklärt werden. Das sofortige Absterben der Zellen und die schnelle *VSG* Depletion sprechen aber für einen toxischen Effekt durch die GFP-Akkumulation im ER, weshalb von weiteren Analysen der Zelllinie abgesehen wurde.

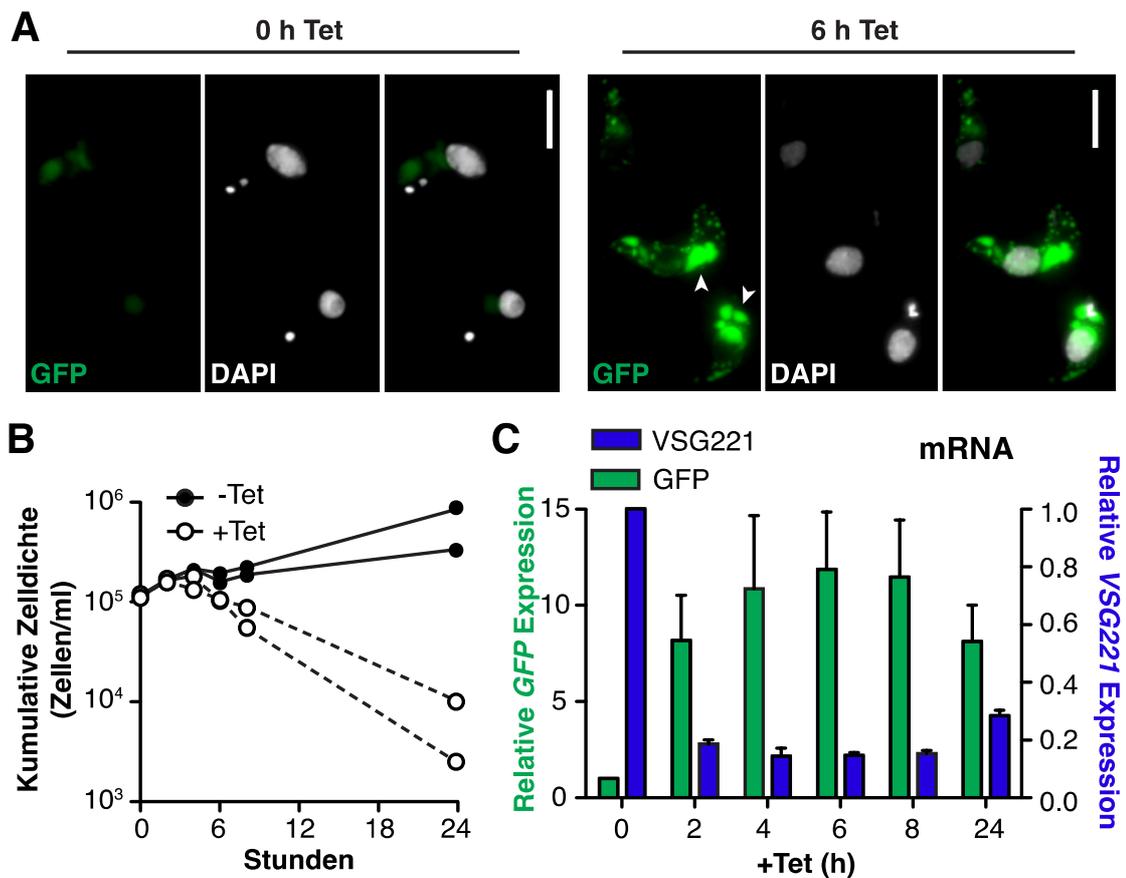


Abbildung 25 Die Überexpression eines ER-lokalisierten GFP-Reporters mit VSG 3'UTR ist letal. (A) Maximale Intensitätsprojektionen von 2-Kanal, 3D Fluoreszenzaufnahmen mit 200 Bildern im Abstand von 100 nm. 221^{ES}LS::GFP^{tet} Zellen wurden vor (0 h Tet) und 6 h nach Tet-Induktion fixiert und mit DAPI (blau) gefärbt. Das GFP (grün) ist im ER lokalisiert und bildet nach Überexpression Aggregate (weiße Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μ m. (B) Wachstumsanalyse der 221^{ES}LS::GFP^{tet} Zellen. Zwei unabhängige Klone wurden mit (+Tet, offene Kreise) und ohne (-Tet, ausgefüllte Kreise) Tet kultiviert und die Zellzahl bestimmt. (C) Quantifizierung der GFP und VSG221 mRNA. Zu den angegebenen Zeiten nach Tet-Induktion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA-Dotblot quantifiziert. Die Werte sind als relative Expression bezogen auf die jeweilige Ausgangsmenge dargestellt. Die linke Y-Achse bezieht sich auf die GFP Expression (grüne Balken) und die rechte Y-Achse auf die VSG221 Expression (blaue Balken). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD für 2 unabhängige Klone.

6 Diskussion

6.1 Eine negative Rückkopplung kontrolliert die BES Aktivität

Afrikanische Trypanosomen haben sich im Laufe der Evolution nahezu perfekt an die Bedingungen im Säugetierwirt angepasst. Der dichte VSG-Mantel verhindert, dass Antikörper die darunter liegenden invarianten Proteine erkennen können (Schwede et al., 2011). Die hohe Endo- und Exozytoserate, in Zusammenspiel mit der durch die Schwimmrichtung der Parasiten gerichtete, hydrodynamische Sortierung der Antikörper-gebundenen VSGs, ermöglicht ihr Überleben auch in Anwesenheit geringer Antikörperkonzentrationen (Engstler et al., 2004; Engstler et al., 2007). Diese Mechanismen der Immunevasion stoßen jedoch an ihre Grenzen, wenn die Parasitämie weiter fortschreitet und der Antikörpertiter gegen das VSG ansteigt. Nun hängt das Überleben der Population von der antigenen Variation ab. Nur diejenigen Parasiten werden der Immunantwort entkommen, welche erfolgreich und schnell das bestehende VSG auf der Oberfläche durch ein neues austauschen. Dies kann auf unterschiedliche Wege erreicht werden: (i) durch den Austausch kompletter Telomer-Bereiche zwischen einer inaktiven und einer aktiven Blutstromformexpressionsstelle (BES) (Bruch-Induzierte Homologe Rekombination, BIR), (ii) durch Duplikation von VSG Genen aus transkriptionell inaktiven Loci in die aktive BES (Genkonversion, GC) oder (iii) durch einen transkriptionellen Wechsel der BES (*in situ* Wechsel) (Horn & McCulloch, 2010). Repetitive DNA-Elemente stromaufwärts der VSGs, die *70-bp repeats*, spielen besonders bei der BIR eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Bereich in der aktiven BES vermehrt DNA-Brüche auftreten. Wurden künstlich Doppelstrangbrüche erzeugt, so erhöhte dies noch die Frequenz von rekombinatorischen VSG-Wechseln (Boothroyd et al., 2009). Während durch BIR nur vollständige VSGs ausgetauscht werden, können durch GC auch neu zusammengesetzte, sogenannte Mosaik-VSGs entstehen. Dies geschieht durch die Rekombination zweier VSGs, die geringe Sequenzhomologien aufweisen (Marcello & Barry, 2007). In beiden Fällen jedoch, während der BIR oder GC, kommt

es zu keiner Zeit zu einer gleichzeitigen Transkription zweier VSGs, da der Austausch in der aktiven BES stattfindet. Die Kontrolle der monoallelen VSG Expression spielt hierbei also keine Rolle.

Was aber geschieht während eines transkriptionellen Wechsels der BES? Die zugrunde liegenden Mechanismen waren ebenso wie die zeitliche Abfolge bisher unbekannt. Zwei Möglichkeiten waren daher denkbar: Entweder wird die aktive BES abgeschaltet, bevor eine neue aktiviert wird oder aber eine zweite BES wird erst aktiviert. Nun stellt das erste Szenario ein Problem dar: Würde die BES abgeschaltet werden, käme es zu einer Reduktion der VSG Mengen. Dies birgt jedoch die Gefahr eines sofortigen und irreversiblen Zellzyklusarrests (Shedder et al., 2005). Würde jedoch zuerst eine neue BES angeschaltet werden, käme es zur gleichzeitigen Expression von zwei VSGs. Dies würde verhindern, dass die VSG Mengen unter eine kritische Grenze fallen. Die gleichzeitige Expression zweier VSGs stellt an sich kein Problem dar. Integriert man ein zweites VSG in die aktive BES, so werden beide, das ektopische und das endogene VSG, zu gleichen Teilen exprimiert und bilden einen funktionellen Oberflächenmantel (Muñoz-Jordán et al., 1996; T. K. Smith et al., 2009). Die konstitutive, stabile Expression von mehr als nur einem VSG stellt allerdings eine artifizielle Situation dar. Dennoch ist anzunehmen, dass die gleichzeitige Expression zweier VSGs einen natürlichen, wenn auch nur zeitlich begrenzten Übergangszustand während der antigenen Variation darstellt. Experimente mit durch Resistenz-Genen markierten, unterschiedlichen BESs haben gezeigt, dass es nicht möglich ist, stabil mehr als eine BES zur Zeit vollständig aktiv zu halten. Vielmehr wurde ein schneller, wiederholter Wechsel zwischen den markierten BESs beobachtet (Chaves et al., 1999). Es wurde postuliert, dass eine abgeschaltete BES für eine gewisse Zeit in einem prä-aktiven Status verweilt und schnell wieder aktiviert werden kann. Dies würde den beobachteten schnellen und wiederholten Wechsel zwischen den beiden markierten BESs erklären. Die damalige Methodik ließ allerdings keine Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge oder die zugrunde liegenden Mechanismen des *in situ* Wechsels zu, da mittels Antibiotika auf zufällig aufgetretene Wechsel-Events in einzelnen Zellen selektiert wurde. Die molekularen und zellbiologischen Abläufe während eines *in situ* Wechsels lassen sich daher nur untersuchen, wenn in einer gesamten Population zeitgleich eine neue BES

zugeschaltet wird. Zwar wurde eine Reihe von Chromatin-modifizierenden Proteinen identifiziert, die den inaktiven Status einer BES aufrecht erhalten. Jedoch konnte bisher keine gezielte, vollständige Aktivierung einer zweiten BES erreicht werden.

Wodurch würde sich das Zuschalten einer neuen BES auszeichnen? Der kleinste gemeinsame Nenner aller bekannten BESs ist ein telomernahes *VSG* Gen (Hertz-Fowler et al., 2008). Bei einer vollständigen Aktivierung würde also in jedem Fall ein zweites *VSG* exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde daher das Anschalten einer neuen BES einzig durch die gezielte Überexpression eines ektopischen *VSGs* simuliert. Nach Induktion des Transgens kam es zu einer simultanen Abnahme der endogenen *VSG221* mRNA sowie des Proteins. Die Quantifizierung verschiedener Expressionsstellen-assoziiierter-Gene (*ESAGs*) sowie die Analysen unterschiedlicher Reporter-Zelllinien haben zudem gezeigt, dass es zu einer graduellen Inaktivierung der gesamten BES kommt. Dieser Gradient beginnt am Telomer und breitet sich in Richtung des Promoters aus. Dabei kommt es nicht zu einer vollständigen, transkriptionellen Inaktivierung. Die BES bleibt zu etwa 20 % aktiv, weshalb hier der Begriff der BES Attenuierung gewählt wurde. Dieser Zustand entspricht wahrscheinlich dem prä-aktiven Status einer zuvor aktiven BES unmittelbar nach einem *in situ* Wechsel (Chaves et al., 1999). Des Weiteren wurde die Attenuierung einzig durch die induzierte Expression des ektopischen *VSGs* ausgelöst; weder wurden gleichzeitig ektopische *ESAGs* induziert, noch wurde das Transgen durch die endogene RNA Polymerase I transkribiert.

Die Kontrolle der monoallelen *VSG* Expression blieb bisher nur wage verstanden. *T. brucei* besitzt etwa 15 BESs von denen immer nur eine zur Zeit exprimiert wird, während alle anderen inaktiv sind. Die Aufrechterhaltung des inaktiven Status der BESs steht im direkten Zusammenhang mit einer kompakten Heterochromatinstruktur, verschiedenen Chromatin-modifizierenden Proteinen und einem Telomer-Bindeprotein (Figueiredo & Cross, 2010; Rudenko, 2010; Stanne & Rudenko, 2010). Ferner wird die aktive BES in einem speziellen, subnukleären Locus transkribiert, dem sogenannten *Expression Site Body* (ESB). Von diesem ist nur bekannt, dass es sich um eine Akkumulation der RNA Polymerase I ausserhalb des Nukleolus handelt, der mit der aktiven BES assoziiert ist (Navarro & Gull, 2001). Eine weitere Arbeit zeigte, dass die Schwesterchromatiden der aktiven BES bis

unmittelbar vor der Mitose von einem Cohesin-Komplex zusammengehalten werden. Dies gewährleistet, dass nur eine aktive BES an die Tochterzelle weiter gegeben wird. Die Depletion des Komplexes durch RNAi führte zu einer erhöhten *in situ* Wechselrate (Landeira et al., 2009).

Wie kann es nun zu einem transkriptionellen *in situ* Wechsel kommen? Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Transkription in allen BESs gleichermaßen initiiert wird, jedoch in inaktiven BESs frühzeitig abgebrochen wird. Dies führt dazu, dass die promoternahen *ESAG6* und *7* Gene von nahezu allen BESs transkribiert werden. Gene weiter stromabwärts, und somit auch das *VSG*, jedoch nicht mehr (Vanhamme et al., 2000). Zufällige Veränderungen der Chromatinstruktur einer inaktiven BES könnten zu einer vollständig prozessiven Transkription einer zweiten BES führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine inaktive BES in räumliche Nähe des ESB oder des Nukleolus gelangt, wo es durch die hohe Verfügbarkeit der RNA Polymerase I zu einer vollständigen Aktivierung der BES kommt. Die kurzfristige Überexpression an *VSG* führt dann zu einer negativen Rückkopplung, was zu einer BES Attenuierung führt. Ob nun die neu zugeschaltete oder die zuvor aktive BES von der Attenuierung betroffen ist, unterliegt wahrscheinlich zunächst dem Zufall. In dem hier angewandten System wurde das ektopische *VSG* aus der ribosomalen Zwischenregion von einer T7 RNA Polymerase transkribiert. Das eingebrachte Konstrukt enthielt ausschließlich das ektopische *VSG* und keine weiteren DNA-Elemente einer BES. Die negative Rückkopplung wird also einzig und allein von dem neuen *VSG* ausgelöst und ist unabhängig von der endogenen RNA Polymerase I, vom ESB und von anderen Elementen aus der BES. Diese autoregulatorische Rückkopplung sichert, dass immer nur eine BES zu jeder Zeit aktiv ist und stellt somit die Basis für die Kontrolle der monoallelen *VSG* Expression in *T. brucei* dar.

6.2 Wodurch wird die negative Rückkopplung ausgelöst?

Ein intensiv untersuchtes Beispiel für die Kontrolle monoalleler Expression einer großen Genfamilie stellen die Odorantrezeptoren (ORs) im Zentralnervensystem der Säuger dar. Über 1000 verschiedene ORs sind im Genom kodiert (Buck & Axel, 1991), aber ein einzelnes Neuron exprimiert jeweils nur ein Allel eines einzigen *OR* Gens (Chess et al., 1994). Während der Entwicklung zu einem reifen Neuron sind zunächst sämtliche *OR* Gene transkriptionell inaktiv und in heterochromatischen Makrodomänen lokalisiert. Diese zeichnen sich durch eine Anreicherung von Histon H3 Lysin 9 tri-Methylierungen (H3K9me3) aus (Magklara et al., 2011). Durch einen stochastischen, limitierten Prozess wird das Heterochromatin aufgelöst bis ein *OR* Gen transkriptionell aktiv ist. Eine negative Rückkopplung verhindert dann eine weitere Auflösung des Heterochromatins, wodurch keine weiteren *OR* Gene aktiviert werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das ausgewählte aktive *OR* Allel in mit einem DNA-Element des Chromosomes 14, dem sogenannten H-Element, *in trans* assoziiert und in einem subnukleären Kompartiment lokalisiert. Alle anderen, inaktiven Allele finden sich in verteilten heterochromatischen Foci (Lomvardas et al., 2006). Die Kontrolle der monoallelen *OR* Expression lässt sich somit in drei Schritte einteilen: (1) die initiale, stochastische Aktivierung eines Gens, (2) das Auslösen einer negativen Rückkopplung und Inhibition einer weiteren Aktivierung und (3) die Aufrechterhaltung des epigenetischen Status (Fleischmann et al., 2013). Ist ein *OR* Gen erst aktiviert, findet in der Regel kein Wechsel zu einem anderen Allel statt. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Expression eines *OR* Transgens in unreifen Neuronen die Expression der endogenen Gene inhibiert. Wurde ein solches Transgen in reifen, differenzierten Neuronen exprimiert, führte dies zudem zur Repression des zuvor ausgewählten *OR* Gens (Nguyen et al., 2007; Fleischmann et al., 2008).

Dieser Mechanismus weist viele Parallelen zu der monoallelen Expression in Trypanosomen auf. Die subnukleäre Lokalisation des aktiven Allels (Navarro & Gull, 2001), die heterochromatische Signatur der inaktiven Allele (Figueiredo & Cross, 2010; Stanne & Rudenko, 2010) und die hier beschriebene negative Rückkopplung. Was aber ist der molekulare Mechanismus dieser Rückkopplung?

Die nähere Charakterisierung in olfaktorischen Neuronen ergab, dass nur ein intaktes OR Protein diese auslöst. Pseudogene oder die untranslatierten Bereiche um ein *OR* Gen sind hingegen nicht in der Lage, die anderen Allele zu reprimieren (Nguyen et al., 2007). Ebenso konnte durch eine Mutation im G-Protein-Bindemotiv gezeigt werden, dass die Signaltransduktion der ORs nicht für die Rückkopplung notwendig ist (Imai et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass die Expression eines OR Proteins zu der Aktivierung einer Adenylat-Cyclase, der *Adcy3*, führt. Diese wiederum inhibiert eine Lysin-spezifische Demethylase, *LSD1*, die selektiv Demethylierungen an *H3K9me2* und *H3K4me2* katalysiert (Lyons et al., 2013). In dem von Lyons et al. vorgeschlagenen Modell ist zunächst *LSD1* aktiv und demethyliert *H3K9me2* gleichermaßen an allen *OR* Allelen bis eines transkribiert werden kann. Kodiert dieses Allel für einen funktionellen Odorantrezeptor, aktiviert dieser *Adcy3*. Die cAMP-Produktion dieser Cyclase sorgt dann für eine Deaktivierung der *LSD1*, wodurch keine weitere *H3K9*-Demethylierung stattfindet und somit keine weiteren *OR* Gene aktiviert werden. Wird aber ein *OR* Pseudogen aktiviert, fehlt die *Adcy3*-Aktivierung und dadurch auch die Inhibition von *LSD1*, wodurch weitere *OR* Allele demethyliert und aktiviert werden.

Obwohl *T. brucei* keine Methylierungen an *H3K9* und *H3K4* aufweist (Mandava et al., 2007), ist ein ähnlicher Mechanismus bei der autoregulatorischen *VSG* Expression denkbar. Im Genom von *T. brucei* finden sich etwa 80 Adenylat-Cyclasen (AC), von denen eine Vielzahl auf der Plasmamembran von Blutstromformen exprimiert wird (Bridges et al., 2007). Untersuchungen an der *ESAG4*- und *ESAG4L*-Familie haben gezeigt, dass die Depletion dieser ACs zu einer verringerten cAMP-Synthese und zu Defekten in der Zytokinese führt, ähnlich dem Phänotypen durch *VSG*-RNAi (Salmon et al., 2012). Salmon et al. schlossen daraus, dass die ACs der *ESAG4*+*ESAG4L*-Familie als Sensoren für die Integrität des *VSG* Mantels dienen könnten; kommt es zu einer Reduktion der *VSG*-Dichte, führt eine geringere cAMP-Produktion zu einem Zellzyklusarrest vor der Zytokinese, wodurch ein weiteres Ausdünnen des *VSG* Mantels verhindert wird. Diese ACs könnten aber nicht nur eine Abnahme, sondern auch eine kurzzeitige Zunahme der *VSG*-Dichte signalisieren und mit einer erhöhten cAMP-Produktion reagieren. Ein erhöhter, intrazellulärer cAMP-Spiegel könnte dann über Effektor-Proteine die Attenuierung der BES auslösen.

Während des Lebenszyklus von *T. brucei* steht die Aktivität der BES in der Tat mit der cAMP-Konzentration im Zusammenhang. Das bisher nicht identifizierte Molekül *Stumpy* induzierender Faktor (SIF) wird von den Parasiten im Blut des Säugetierwirtes, aber auch *in vitro*, gebildet. Erreicht SIF eine bestimmte Konzentration, löst dieses durch einen cAMP-abhängigen Signalweg die Differenzierung zu *Short Stumpy* (ST) -Formen aus (Reuner et al., 1997; Vassella et al., 1997), welche ebenfalls die BES deaktivieren (Amiguet-Vercher et al., 2004). Die genauen molekularen Mechanismen der ST-Transition und die Effektoren des cAMP sind allerdings nicht bekannt. Es ist auch unklar, wie die zeitliche Abfolge der Ereignisse einzuordnen ist.

Führt SIF zu einer Attenuierung der BES und dadurch zur ST-Transition? Oder ist die BES-Inaktivierung eine Konsequenz aus der Entwicklung? Es ist denkbar, dass beides, sowohl SIF als auch eine kurzzeitige VSG Überexpression, einen gemeinsamen cAMP-abhängigen Signalweg nutzen, um die aktive BES zu attenuieren.

Eine Erhöhung der VSG-Konzentration an der Zelloberfläche stellt allerdings ein Problem dar. Um die Antikörper-gebundenen VSGs durch Endozytose von der Zelloberfläche zu entfernen, müssen die Proteine eine hohe Mobilität beibehalten (Engstler et al., 2007). Gleichzeitig muss der Oberflächenmantel aber so dicht wie möglich gepackt sein, um die darunter liegenden, invarianten Bestandteile der Plasmamembran abzuschirmen. Daraus ergibt sich, dass die VSG Proteine eine nahezu maximale Dichte aufweisen. Eine nur leichte Erhöhung der Konzentration an der Oberfläche führt zu einem Einbruch der Mobilität und somit zu einem Funktionsverlust des Mantels (Hartel et al., Publikation eingereicht). Um diesem Problem zu entgehen, müsste eine VSG Überexpression erkannt und signalisiert werden, bevor die Proteinkonzentration an der Oberfläche zunimmt. Wie die Quantifizierungen der mRNA und Proteinmengen zeigen, erreicht die mRNA des ektopischen VSGs bereits nach 2 h die maximale Expression, wohingegen die Proteinmengen in diesem Zeitraum kaum eine Erhöhung aufweisen. Würde eine VSG Überexpression also durch einen Anstieg der mRNA erkannt werden, würde die negative Rückkopplung ausgelöst werden bevor kritische Mengen an VSG Protein gebildet werden.

Die Expression der *VSG* Gene erfolgt aus einer etwa 50 kbp langen, polyzistronischen Transkriptionseinheit, der BES. Während die *VSG* mRNA den Großteil der Gesamt-mRNA Population einer Zelle ausmacht, sind die co-transkribierten *ESAGs* in wesentlich geringeren Mengen vorhanden. Bereits 1995 wurde von Berberof et al. gezeigt, dass die *VSG* 3'UTR für die stadienspezifische Stabilisierung der mRNA verantwortlich ist (Berberof et al., 1995). Dies erklärt die unterschiedliche Abundanz von *ESAGs* und *VSG* in BSF. Exprimiert man zwei *VSGs* gleichzeitig aus der aktiven BES, so sollte man erwarten, dass die Gesamt-*VSG* mRNA Menge auf 200 % ansteigt, da beide *VSGs* von demselben Promoter transkribiert und durch die 3'UTR stabilisiert werden. Die Gesamtmenge der *VSG* mRNA beträgt in den konstitutiven Doppel-Expressoren jedoch stets 100 % und beide *VSGs* tragen zu jeweils 50 % der Gesamtmenge bei (Diplomarbeit K. Fey, 2011). Bis heute sind keine Transkriptionsfaktoren oder regulatorische DNA-Elemente zusätzlich zum BES Promotor bekannt, wodurch eine Regulation der Transkriptionsinitiation unwahrscheinlich erscheint. Das ließ darauf schließen, dass die Menge an *VSG* mRNA posttranskriptionell limitiert wird. Die Existenz eines *VSG* mRNA limitierenden Faktors wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten in Betracht gezogen (Diplomarbeit C. Batram, 2009). Dies wiederum setzt voraus, dass alle *VSGs* gleichermaßen von diesem Faktor erkannt werden müssen. Da alle bekannten *VSG* Gene in der proteinkodierenden Sequenz stark voneinander abweichen, wurde eine Beteiligung dieser an der Regulation ausgeschlossen. Die 3'UTR aller bekannten *VSG* Gene weist jedoch eine starke Homologie auf. Insbesondere zwei Sequenzmotive, die 8 bzw. 16 Nukleotide lang sind, sind zu 100 % konserviert. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass insbesondere das 16mer unabdingbar für die Stabilität der mRNA und somit für die Expression des *VSGs* ist (Diplomarbeit C. Batram, 2009). Die induzierte Expression einer bereits charakterisierten Mutation, $\Delta(45-51)$, zeigte, dass die ektopische *VSG121* mRNA nur etwa 25 % der wt Mengen erreichte. Auch die Proteinmenge stieg nicht über 25 bis 30 % an. Das endogene *VSG221* zeigte ebenfalls keine signifikante Abnahme und das Wachstum der Population wies keinen Einbruch auf. Die negative Rückkopplung auf die aktive BES scheint somit nur durch eine hohe Expression von *VSG* ausgelöst zu werden. Aber woran könnten überschüssende *VSG* mRNA-Mengen erkannt werden?

Thermodynamische Modellierungen zeigen, dass das 8- und 16mer eine helikale Tertiärstruktur ausbilden (Abbildung 23). Diese könnte als Plattform für ein RNA-Bindeprotein dienen, das die Stabilität der mRNA begünstigt. Ist dieses Bindeprotein nur in begrenzten Mengen vorhanden, könnte dadurch eine Limitierung der *VSG* mRNA Mengen erklärt werden. Eine kurzfristige Überexpression an *VSG* mRNA könnte ein bestehendes Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Faktor verschieben und dadurch eine Signalkaskade auslösen, welche zur Attenuierung der BES führt.

Wenn die *VSG* 3'UTR für die mRNA Homöostase und der Kontrolle der BES verantwortlich ist, sollte die mRNA eines Reportergens gekoppelt mit der *VSG* 3'UTR mit der endogenen *VSG* mRNA kompetieren und die Attenuierung der BES initiieren. Durch die induzierte Expression eines *GFPs* mit der *VSG121* 3'UTR konnte eine Abnahme der endogenen *VSG* mRNA erzielt werden. Im Falle eines zytosolischen GFP-Reporters konnte allerdings kein kompletter Austausch der *VSG* mRNA durch die *GFP* mRNA beobachtet werden und die *VSG* mRNA Mengen erreichten nach 24 h wieder die Ausgangsmengen von 100 %. Dies lässt vermuten, dass die *VSG* 3'UTR zwar an der Homöostase beteiligt, aber gekoppelt an eine heterologe Reporter-mRNA nicht ausreichend ist, um die gesamte Population der endogenen *VSG* mRNA zu ersetzen und die BES zu deaktivieren. Des Weiteren schienen die Trypanosomen die Menge an GFP Protein über einen längeren Zeitraum nicht zu tolerieren; bereits nach 24 h der Induktion begannen die Kulturen abzusterben. Dies kann nicht auf eine verminderte *VSG* Expression zurückgeführt werden, da die *VSG* mRNA Mengen nach 24 h bereits wieder bei 100 % lagen. Es ist vielmehr anzunehmen, dass größere Mengen an GFP Protein über einen längeren Zeitraum eine toxische Wirkung auf die Zellen haben (Liu et al., 1999).

Das *VSG* stellt das Hauptprotein der Zelloberfläche in der BSF der Trypanosomen dar und trägt mit 15 % zur gesamten Proteinmenge bei. Daraus ergibt sich, dass das *VSG* ca. 90 % des gesamten Transports durch das endoplasmatische Retikulum (ER) ausmacht (Schwede et al., 2012). Es wurde daher in Erwägung gezogen, dass eine Kontrolle der *VSG* mRNA Menge am ER operieren könnte. Ein solcher ER-assoziiertes Regulationsmechanismus könnte ein *VSG*-spezifisches RNA-

Bindeprotein beinhalten, das an membrangebundenen Polyribosomen lokalisiert ist. In Trypanosomen ist ein solches Protein bisher nicht bekannt, jedoch finden sich in anderen Organismen mögliche Beispiele hierfür. Das RNA-Bindeprotein Scp160 aus der Hefe *S. cerevisiae* ist an der ER-Membran angereichert und bindet zytosolische und membrangebundene Polyribosomen. Des Weiteren wird durch die Bindung von Scp160 die Assoziation einiger mRNAs mit der ER-Membran beeinflusst (Kraut-Cohen & Gerst, 2010). Es wurde gezeigt, dass Scp160p auch mRNA-unabhängig an perinukleärer Membran assoziiert ist und die Transkription telomernaher Gene beeinflusst (Marsellach et al., 2006). Um der Möglichkeit eines am ER operierenden VSG mRNA Regulationsmechanismus nachzugehen, wurde das *GFP* Reporter gen einschliesslich der VSG 3'UTR mit einer ER-Importsequenz versehen. Da nur die Funktion der VSG 3'UTR, getrennt von anderen VSG-Sequenzen, untersucht werden sollte, wurde die ER-Importsequenz des Prozyklins EP1 gewählt. Fluoreszenzmikroskopisch konnte die Lokalisation des GFP im ER nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der endogenen VSG mRNA Mengen nach Induktion des Reporter gens zeigte, dass die VSG Mengen innerhalb von 2 h auf 20 % der Ausgangsmenge abfiel. Im Gegensatz zu dem zytosolischen GFP-Reporter blieben die VSG mRNA-Mengen über 24 h konstant bei 20 bis 25 %. Aus der schnellen Abnahme der VSG mRNA ergibt sich somit eine Halbwertszeit von weniger als 60 min. Dies steht im Widerspruch zu experimentell ermittelten Werten von 4,5 h (Ehlers et al., 1987). Es muss somit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei der hier beobachteten Abnahme um einen aktiven Degradationsprozess handelt. Wodurch könnte dieser ausgelöst werden? In Säugerzellen schützt ein Signalweg das ER vor der Akkumulation un- oder missgefalteter Proteine, die so genannte *Unfolded Protein Response* (UPR). Dieser Signalweg wird aktiviert, wenn sich durch Nährstoffmangel, Kalziumdepletion oder die Reduktion von Disulfiden ungefaltete Proteine im ER ansammeln. Drei bekannte Sensor-Proteine, die das Stresssignal vom ER an das Zytoplasma weitergeben, wurden in Säugerzellen identifiziert; IRE1, PERK und ATF6. Als Antwort auf eine UPR wird die Translation einer Vielzahl von mRNAs inhibiert, wobei gleichzeitig die Transkription von Chaperonen erhöht wird (Kohno, 2010). In Trypanosomen fehlen die Charakteristika für eine typische UPR. Nach Behandlung von BSF mit Dithiothreitol (DTT) zur Reduzierung von Disulfiden

konnte keine signifikante Änderung der mRNA Mengen von Genen festgestellt werden, welche am Prozess des ER-Membrantransports beteiligt sind (Koumandou et al., 2008). Ferner finden sich keine offensichtlichen Homologen zu dem Sensor-Protein IRE1. Allerdings wurde nachgewiesen, dass durch DTT-induzierten ER-Stress die mRNA Halbwertszeiten unter anderem von dem ER-Chaperon DnaJ und der Protein-Disulfid-Isomerase PDI erhöht waren (Goldshmidt et al., 2010). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass Trypanosomen andere Mechanismen der ER-Stressvermeidung entwickelt haben. Diese könnten auf der Ebene der mRNA Stabilisierung und Destabilisierung wirken.

Der Import von Membranproteinen in das ER erfolgt in Trypanosomen über zwei Wege: entweder co-translational durch die Bindung eines *Signal Recognition Particle* (SRP) oder post-translational durch das Zusammenspiel verschiedener Chaperone. Es konnte gezeigt werden, dass RNAi gegen den SRP-Rezeptor zu einer charakteristischen Stressantwort führt, dem *Spliced-Leader RNA Silencing* (SLS). Hierbei wird die Transkription der für die mRNA-Prozessierung benötigten *Spliced-Leader RNA* inhibiert und es kommt somit zu einer Reduktion der mRNA Mengen (Lustig et al., 2007). Die SLS-Antwort wurde auch beobachtet, wenn Trypanosomen mit DTT behandelt wurden oder nach RNAi gegen *SEC61* und *SEC63*, die an der Translokation von Proteinen ins ER beteiligt sind. Des Weiteren löste anhaltender ER-Stress einen programmierten Zelltod aus (Goldshmidt et al., 2010). Dies zeigt, dass Trypanosomen spezifisch auf ER-Stress reagieren, wenn auch anders als aus Säugetier-Systemen bekannt.

Die SLS-Antwort nach DTT-induziertem ER-Stress in BSF wird allerdings erst nach 180 min deutlich (Goldshmidt et al., 2010). Nach der Überexpression des ins ER geleiteten GFPs reduzierte sich die Menge an *VSG* mRNA bereits nach 120 min auf 20 %. Somit beginnt die Abnahme noch vor der SLS-Antwort, was, zusätzlich zur errechneten Halbwertszeit von 60 min, gegen eine passive Degradation der *VSG* mRNA spricht. Ferner konnte keine Abnahme der *Tubulin* mRNA Menge in diesem Zeitraum beobachtet werden. Diese blieb auch nach 8 h unverändert. Auch das spricht gegen eine generelle SLS-Antwort. Es könnte daher sein, dass die Überexpression eines fremden Proteins im ER, in diesem Falle GFP, zu einer bisher nicht bekannten Stress-Antwort führt. Wie oben bereits erwähnt, stellt das *VSG* ca.

90 % des gesamten Proteinflusses durch das ER dar. Die Parasiten könnten daher eine Stressantwort entwickelt haben, die schnell und spezifisch durch die Degradation der VSG mRNA wirkt, um das ER zu entlasten. Die Überexpression eines fremden Proteins im ER stellt jedoch keine Situation dar, die auch *in vivo* zu erwarten ist. Vielmehr könnte dieser Mechanismus dem Zweck dienen, nicht funktionelle Mosaik-VSGs frühzeitig zu eliminieren. Im Zuge der antigenen Variation werden nicht nur bestehende VSG Gene aus verschiedenen Loci in die aktive BES kopiert, sondern es entstehen durch Rekombinationsereignisse zwischen unterschiedlichen VSG Genen auch neu zusammengesetzte VSGs. Die Funktionalität eines neu zusammengesetzten VSGs kann nicht auf DNA-Ebene geprüft werden und somit können auch nicht funktionelle Proteine entstehen. Wird nun ein solches funktionsloses Mosaik-VSG in die aktive BES kopiert, muss die Zelle schnell auf dieses Ereignis reagieren. Wenn das neue VSG nicht als solches im ER erkannt wird, könnte eine schnelle Degradation ER-assoziiierter mRNAs die Zelle kurzfristig vor einer Überlastung des ER schützen. Damit wäre ein kurzes Zeitfenster gegeben, in welchem neue Rekombinationsereignisse oder eine *in situ* Aktivierung einer neuen BES das funktionslose VSG wieder ersetzen könnten. Geschieht dies nicht, kommt es wahrscheinlich, ebenso wie bei persistierendem ER-Stress beschrieben, zum Zelltod, wodurch der nach ca. 3 h beginnende Populationseinbruch zu erklären ist.

Die Funktion der VSG 3'UTR im Zusammenhang mit der mRNA Homöostase und der Kontrolle der BES lässt sich somit scheinbar nur schwer anhand eines Reportergens untersuchen; wird ein VSG ohne die konservierten Sequenzmotive in der 3'UTR exprimiert, werden nur geringe mRNA und Proteinmengen erreicht. Somit kann die Funktion des Proteins bei der negativen Rückkopplung nicht ohne die 3'UTR untersucht werden. Wird ein Reporterprotein (in diesem Falle GFP) mit der VSG 3'UTR exprimiert, ist die starke Expression toxisch. Folglich kann auch die Funktion der 3'UTR nicht ohne ein intaktes VSG Protein untersucht werden.

Die Frage, welche Rolle das 16mer bei der mRNA Homöostase und Kontrolle der BES-Aktivität spielt, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Fest steht nur, dass das konservierte Sequenzmotiv für die Stabilität der VSG mRNA verantwortlich und unabdingbar für die Expression vitaler Mengen an VSG ist.

Welcher Faktor an die 3'UTR bindet und welche Funktion dieser noch erfüllt, bleibt vorerst unbeantwortet.

6.3 Welche Rolle spielt die Chromatinstruktur bei der BES Attenuierung?

Die fehlende Kontrolle der Transkriptionsinitiation an BES Promotoren zusammen mit der hier beobachteten positionsabhängigen Abnahme der BES-assoziierten mRNA Mengen lässt darauf schließen, dass es sich im Falle der hier beschriebenen Attenuierung um eine Inhibition der Prozessivität der RNA Polymerase I (Pol I) handelt. Wie bereits erwähnt, spielt die Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der BES-Aktivität. Während inaktive BESs eine dichte und kompakte Heterochromatinstruktur aufweisen, ist die aktive BES nahezu frei von Nukleosomen (Figueiredo & Cross, 2010; Stanne & Rudenko, 2010). Im Zuge einer BES-Inaktivierung muss es somit zu einer Veränderung der Chromatinstruktur kommen. Dieser Prozess konnte bisher jedoch nicht untersucht werden, da ein synchroner *in situ* Wechsel nicht induziert werden kann. Die hier beschriebene negative Rückkopplung der VSG Expression auf die BES-Aktivität bietet nun diese Möglichkeit. Die *Formaldehyd assistierte Identifizierung regulatorischer Elemente* (FAIRE) erlaubt es, proteinfreie DNA-Elemente zu identifizieren und zu quantifizieren. Dazu werden *in vivo* Protein-DNA-Komplexe chemisch fixiert und die nicht gebundene, freie DNA mittels Phenol:Chloroform-Extraktion getrennt. Anschließend wird mit quantitativer PCR die Anreicherung an freier DNA im Vergleich zu nicht fixierter Kontroll-DNA bestimmt (Giresi et al., 2007; Figueiredo & Cross, 2010). Mithilfe dieser Methode wurde in dieser Arbeit versucht, eine Veränderung der Chromatinstruktur der aktiven BES während der VSG-induzierten Attenuierung nachzuweisen. Die so durchgeführte Analyse des VSG221 Gens in der 221^{ES}121^{tet} Linie zeigte keine Veränderung während der BES-Attenuierung (Abbildung 26). Als interne Kontrolle wurde die DNA des VSG121 Gens ebenfalls quantifiziert. Wie zu erwarten war, kam es zu einer geringeren Anreicherung der VSG121 DNA, da das Gen in einer inaktiven BES vorkommt, zusätzlich zu der ektopischen Kopie in der

ribosomalen Zwischenregion. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass es zu einer Veränderung der Chromatinstruktur kommt. Vergleicht man den Unterschied zwischen einer aktiven und einer gänzlich inaktiven BES, so findet man eine 10 bis 100-fach höhere Anreicherung proteinfreier DNA (Figueiredo & Cross, 2010). Die Transkriptionsrate einer aktiven BES ist im Gegensatz dazu jedoch 10^4 - 10^5 -fach höher (Figueiredo et al., 2008). Während der hier beschriebenen BES Attenuierung beträgt die Aktivität noch 20 %, also 10^3 - 10^4 -fach höher als die einer inaktiven BES. Diese verhältnismäßig hohe Restaktivität schließt eine kompakte Chromatinstruktur wie die einer gänzlich inaktiven BES aus. Es ist daher zu vermuten, dass ein geringer Unterschied in der Nukleosomen-Abundanz mit dieser Methode nicht nachweisbar ist. Nicht nur eine kompakte Struktur kann auf die Aktivität der Transkription Einfluss nehmen, sondern auch verschiedene Modifikationen der Histone (Bannister & Kouzarides, 2011). Ein für die monoallele Expression und antigene Variation wichtiges Enzym ist die Histon-Methyltransferase Dot1b (Figueiredo et al., 2008), die tri-Methylierungen an das Lysin 76 des Histons H3 (H3K76me3) setzt. Dot1b ist *in vitro* nicht essentiell für Trypanosomen, weder in der BSF noch in der PZF. Während der Differenzierung von BSF zu den Insektenstadien spielt das Enzym jedoch eine wichtige Rolle (Janzen et al., 2006). In einer *Dot1b*-depletierten Zelllinie (Δ dot1b) wurde eine Derepression BES-assoziiierter VSGs beobachtet. Des Weiteren wird ein *in situ* Wechsel zu einer neuen BES erst nach 4 bis 5 Wochen vollständig abgeschlossen (Figueiredo et al., 2008). Die Δ dot1b-Trypanosomen sind also in der Lage, einen *in situ* Wechsel zu vollziehen, allerdings mit erheblich verlangsamter Kinetik. Dabei bleibt die alte BES zu 100 % aktiv, während die neue BES in der Aktivität zwischen 5 bis 90 % variiert. Die Funktionen von Dot1b könnten somit darin bestehen, eine inaktive BES schnell und vollständig zu aktivieren oder die alte BES effizient zu deaktivieren. Es ist auch denkbar, dass beide Prozesse von dem Enzym abhängen (Figueiredo et al., 2008). Sollte die Deaktivierung von Dot1b abhängen, müsste in Δ dot1b-Trypanosomen eine langsamere Kinetik der BES Attenuierung nach *VSG121* Überexpression zu beobachten sein.

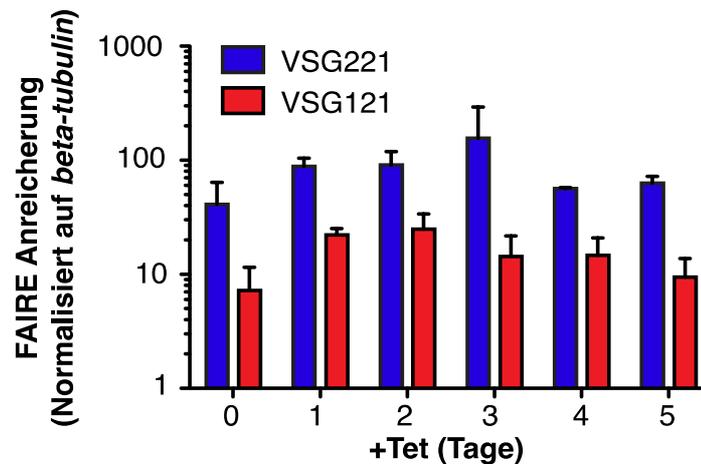


Abbildung 26 Die FAIRE Analyse zeigte keine Veränderung der Chromatinstruktur. Um Veränderungen in der Chromatinstruktur während der BES-Attenuierung zu messen, wurden $221^{ES}121^{tet}$ Zellen mit Tet induziert und die DNA mittels FAIRE in täglichen Intervallen über 5 Tage isoliert. Die Menge an isolierter DNA wurde durch quantitative PCR bestimmt. Die FAIRE - Anreicherung ist dargestellt als n-facher Unterschied zwischen den fixierten Proben und der nicht fixierten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM (siehe Materialien und Methoden für Details).

Das ektopische *VSG121* wurde daher in die $\Delta dot1b$ -Zelllinie (Janzen et al., 2006) integriert ($\Delta dot1b.121^{tet}$). Da diese Zelllinie bereits ein *BLE*-Resistenzgen enthält, wurde dieses in dem Plasmid pRS.M1.6-198 durch ein *PUR*-Resistenzgen ausgetauscht. Nach Induktion der *VSG121* Expression wurden sowohl das Wachstum als auch die VSG Proteinmengen bestimmt. Das *VSG121* stieg innerhalb von 12 h auf 100 % der Wildtypmengen an, und das endogene *VSG221* lag nach 24 h bei 20 % (Abbildung 27B). Das entspricht derselben Kinetik, die bei der $221^{ES}121^{tet}$ Linie beobachtet wurde. In den folgenden 10 Tagen blieben die *VSG121* und *VSG221* Mengen konstant bei etwa 100 % bzw. 20 %, ohne dass eine Gegenregulation stattfand. Das Wachstum der Populationen blieb nach der Induktion unbeeinflusst und es war kein Unterschied zwischen den induzierten und nicht induzierten Kulturen zu beobachten (Abbildung 27A). Um die Aktivität der BES zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Luziferase-Gen stromaufwärts des endogenen *VSG221* integriert (Abbildung 27C). Nach *VSG121* Induktion wurde keine Abnahme der Enzymaktivität gemessen (Abbildung 27D). Dies zeigt, dass die BES in der

Δ dot1b.121^{tet} Linie durch die ektopische *VSG121* Expression nicht attenuiert wird, sondern nur das telomerständige *VSG221* reprimiert wird. Diese Daten, zusammen mit der bekannten Beteiligung von Dot1b während eines transkriptionellen Wechsels, unterstützen das hier erarbeitete Modell, wodurch ein *in situ* Wechsel durch das Zuschalten einer neuen BES ausgelöst wird. Des Weiteren zeigt dieses Experiment zum ersten Mal, dass (i) die Proliferation der Trypanosomen in direktem Zusammenhang mit der Aktivität der BES steht, (ii) das BES-assoziierte *VSG* unabhängig von der BES reprimiert werden kann und (iii) das *VSG in trans* komplementiert werden kann. Wie aber wird das telomerständige *VSG221* reprimiert, das etwa 4 kbp stromaufwärts gelegene Luziferase-Gen aber nicht?

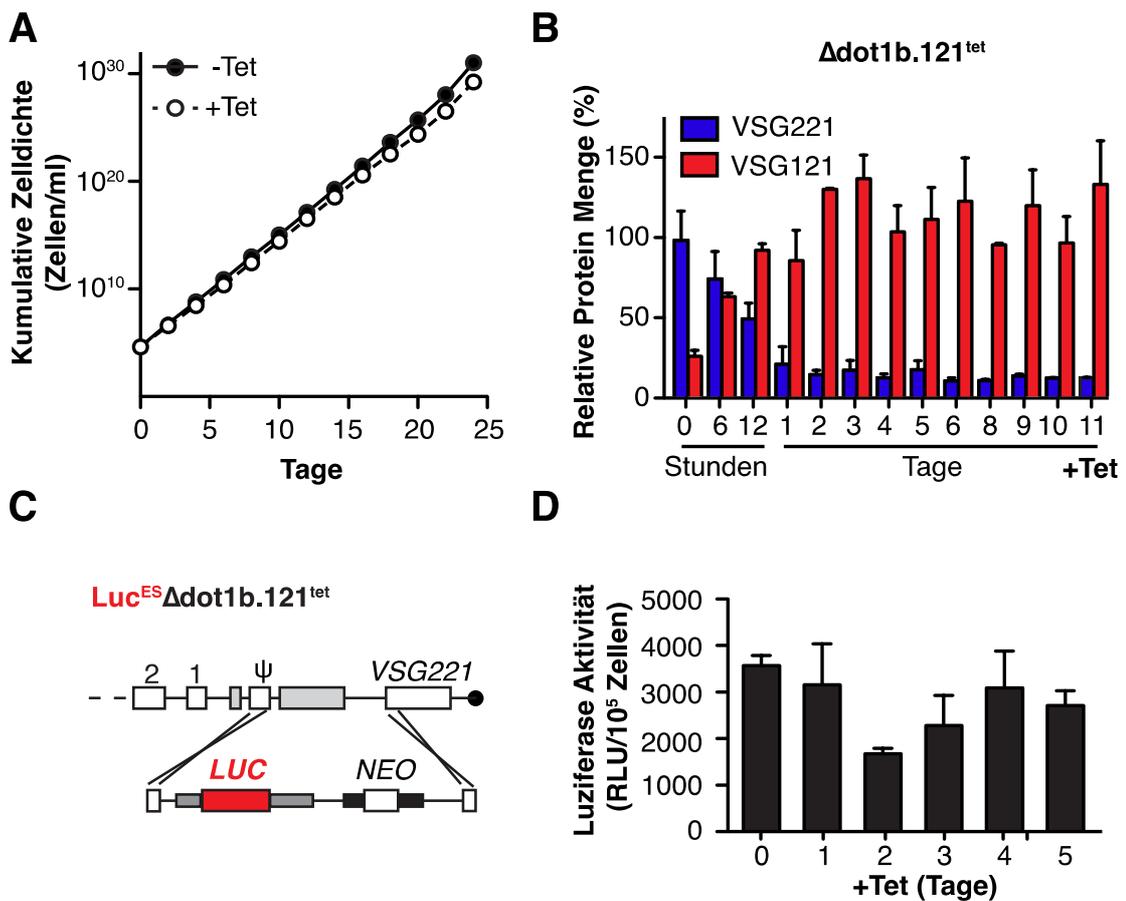


Abbildung 27 Die Histon Methyltransferase Dot1b ist an der Attenuierung der BES beteiligt. (A) Wachstumsanalyse der $\Delta dot1b.121^{tet}$ Zellen. Die Überexpression von *VSG121* wurde induziert und die Zellzahlen täglich bestimmt (Mittelwerte \pm SD von 2 Klonen). **(B)** Quantifizierung der VSG-Proteinmengen nach Tet-Induktion. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Tet-Induktion die Mengen an *VSG221* (blau) und *VSG121* (rot) mittels Protein Dot Blot quantifiziert. Die Werte wurden auf die parentalen 221^{ES} und 121^{wt} Zellen normiert und zeigen Mittelwerte \pm SD von 2 unabhängigen Klonen. **(C)** Illustration der $Luc^{ES}\Delta dot1b.121^{tet}$ Linie. In die $\Delta dot1b.121^{tet}$ Zelllinie wurde ein Luziferase-Gen stromaufwärts in die aktive *VSG221* BES integriert. **(D)** Luziferaseaktivität nach *VSG121* Überexpression. Die $Luc^{ES}\Delta dot1b.121^{tet}$ Zellen wurden mit Tet induziert und zu den angegebenen Zeiten die Luziferaseaktivität gemessen. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Klonen.

Die BES-unabhängige Repression des *VSG221* in der Δ dot1b-Linie könnte auf einen Telomer-Positions-Effekt (TPE) zurückzuführen sein. Dies ist ein bekanntes Phänomen in Säugerzellen, Hefe und auch in Trypanosomen (Glover & Horn, 2006; Pedram et al., 2006; Gao et al., 2007; Glover et al., 2007). Dabei werden Gene, die sich in der Nähe von Telomeren befinden, stärker reprimiert als weiter entfernt gelegene Gene. Dieser Mechanismus der Genregulation wurde besonders in *S. cerevisiae* untersucht und die Histon-Deacetylase SIR2 (Gasser & Cockell, 2001; Michishita et al., 2008) und das DNA-Bindeprotein KU70/80 (Boulton, 1998; Evans et al., 1998; Mishra & Shore, 1999) unter anderem als beteiligte Proteine identifiziert. In dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* wurde gezeigt, dass das entsprechende SIR2 Homolog essentiell für die Heterochromatinstruktur an Telomeren ist und an der monoallelen Expression subtelomerer *var* Gene beteiligt ist (Duraisingh et al., 2005; Freitas-Junior et al., 2005). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass tbSIR2rp1, das SIR2 Homolog in *T. brucei*, zwar generell an einem TPE beteiligt ist, jedoch keinen Einfluss auf die monoallele *VSG* Expression hat (Alsford et al., 2007). Ebenso konnte keine *VSG*-relevante Funktion für tbKU80 nachgewiesen werden (Janzen et al., 2003). Die Charakterisierung eines weiteren Telomer-Bindeproteins, tbRAP1, deutete jedoch auf einen *VSG*-spezifischen TPE hin. Die Depletion von tbRAP1 durch RNAi führte zu einer Derepression aller BES-assoziiierter *VSGs*. Ferner wurde gezeigt, dass die Derepression mit zunehmender Entfernung vom Telomer abnahm (Yang et al., 2009). Andere genomische Loci waren davon jedoch nicht betroffen.

Könnte tbRAP1 also bei der Initiation der BES Attenuierung beteiligt sein? Wäre dies der Fall, könnte eine Attenuierung der BES und somit auch ein Abfall der endogenen *VSG221* mRNA durch die induzierte Überexpression von *VSG121* in Abwesenheit von RAP1 verhindert werden. Da RAP1 aber essentiell für Trypanosomen ist (Yang et al., 2009), ist die Herstellung einer *RAP1*^{-/-} Linie nicht möglich. Daher wurde ein RNAi-Plasmid in die 221^{ES}121^{tet} Linie gebracht, um durch Tet-Zugabe sowohl die *VSG121* Überexpression als auch zeitgleich die *RAP1*-RNAi zu induzieren (*RAP1*^{RNAi}). In den ersten vier Tagen der Induktion verlangsamte sich das Wachstum kontinuierlich und nach fünf Tagen begannen die Kulturen abzusterben (Abbildung 28). Dieser Phänotyp unterscheidet sich sowohl von dem der 221^{ES}121^{tet} Linie als auch von dem beschriebenen *RAP1*-RNAi Phänotypen (Yang et al., 2009).

Die Quantifizierung der mRNA Mengen nach 24 und 48 h der Induktion zeigte, dass die endogene *VSG221* mRNA auf 25 % abfiel und die ektopische *VSG121* mRNA auf 80 % der Wildtypmenge anstieg. Die Depletion von RAP1 scheint somit keinen Einfluss auf die initiale Attenuierung der aktiven BES zu haben. Die Funktion von RAP1 könnte daher vielmehr darin bestehen, die Chromatinstruktur inaktiver BESs aufrechtzuerhalten, nicht aber die aktive BES initial zu deaktivieren.

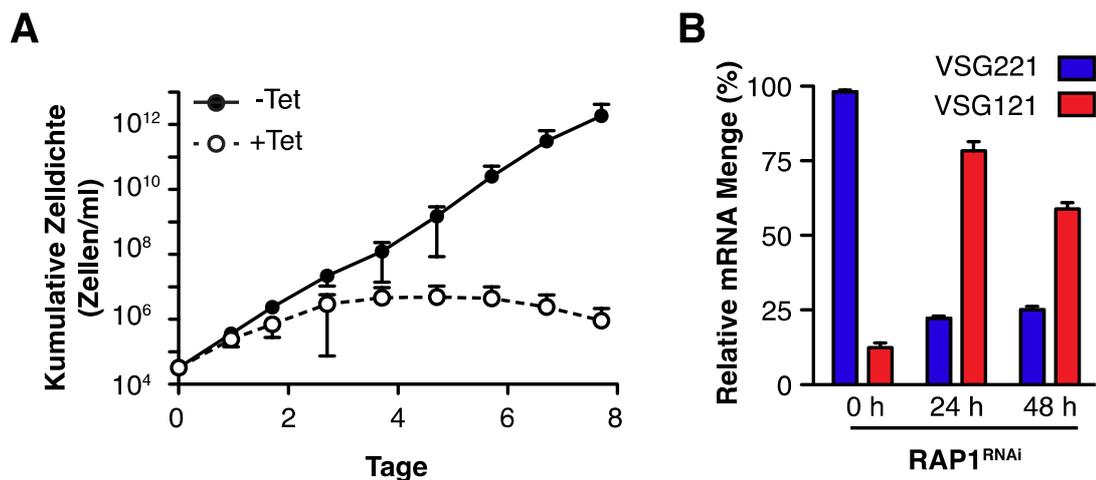


Abbildung 28 Die initiale BES Attenuierung ist unabhängig von RAP1. (A) Wachstumsanalyse nach *RAP1* RNAi bei gleichzeitiger *VSG121* Überexpression. In den *RAP1*^{RNAi} Zellen wurde durch Tet Zugabe (+Tet) die *VSG121* Expression und zugleich die *RAP1* RNAi induziert und die Zellzahl täglich bestimmt (Mittelwert \pm SD für 2 Klone). (B) Quantifizierung der *VSG* mRNA Mengen. Zu den angegebenen Zeiten nach Tet Induktion wurde gesamt RNA isoliert und mittels RNA Dot Blot quantifiziert. Die Werte für *VSG221* (blau) und *VSG121* (rot) sind auf die parentalen 221^{ES} bzw. 121^{wt} Zellen normiert (Mittelwert \pm SD für 2 Klone).

Über weitere Telomer-Bindeproteine und deren Funktion ist in Trypanosomen bisher wenig bekannt. Nicht alle Telomere in *T. brucei* beherbergen eine BES, so dass es denkbar ist, dass durch eine *VSG* Überexpression eine *VSG* genspezifische Repression ausgelöst wird. Diese müsste alle telomerständigen *VSG* Gene gleichermaßen erkennen können, was durch die 100 % konservierte Sequenz des 16mers in der 3'UTR möglich wäre. Ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein könnte so, aktiviert durch eine *VSG* Überexpression, gezielt an telomerständige *VSG* Gene binden und die Transkription der RNA Polymerase I terminieren. Eine vergleichbare Transkriptionstermination ist für rDNA Gene bekannt (Grummt et al.,

1986). Da das 16mer Motiv vor dem Polyadenylierungssignal liegt, würde so eine 3'-Prozessierung der VSG prä-mRNA verhindert werden, wodurch kein funktionelles Transkript entstehen würde. Solch ein DNA-Bindeprotein könnte zudem mit Telomer-Bindeproteinen interagieren, um ausschließlich telomerständige VSGs zu reprimieren. Dies würde erklären, warum das ektopische VSG121 in der ribosomalen Zwischenregion in den Dot1b-depletierten Trypanosomen stabil über mehrere Wochen exprimiert wurde, das endogene VSG221 jedoch reprimiert blieb.

Die VSG121 Überexpression in RAP1- und Dot1b-defizienten Trypanosomen zeigt, dass das endogene VSG unabhängig von diesen beiden Regulatoren reprimiert, die BES jedoch Dot1b-abhängig attenuiert wird. Dies spricht dafür, dass es zu einer Veränderung der Chromatinstruktur während der VSG-induzierten BES Attenuierung kommt. Die FAIRE-Experimente und die Restaktivität der attenuierten BES von 20 % weisen aber darauf hin, dass die Chromatinstruktur in einem offenen Zustand gehalten wird. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die durch die VSG Überexpression induzierte BES Attenuierung reversibel ist. Nach 3 Tagen wurde die BES Attenuierung graduell aufgehoben, nach 5 Tagen normalisierte sich das Wachstum der induzierten Populationen und das endogene VSG221 aus der aktiven BES erreichte schließlich wieder die Ausgangsmenge. Diese Erkenntnisse belegen, dass ein initiiertes, transkriptioneller *in situ* Wechsel keinesfalls zu der endgültigen Deaktivierung der vorherigen BES führen muss. Vielmehr unterliegt dieser Vorgang einer bisher nicht beachteten Flexibilität. Indizien für diese Plastizität lieferte bereits die Arbeit von Chaves und Kollegen (Chaves et al., 1999). Der dort beschriebene schnelle Wechsel zwischen zwei BESs unter selektiven Bedingungen brachte die Hypothese hervor, dass eine inaktivierte BES für eine gewisse Zeit in einem prä-aktiven Zustand verbleibt und somit schnell wieder reaktiviert werden kann. Dieses Modell kann durch die hier vorliegende Arbeit erweitert werden: Wird eine neue BES aktiv, führt dies durch eine VSG-vermittelte Rückkopplung zur Attenuierung einer der beiden BESs. Die attenuierte BES zeichnet sich durch eine schwache Restaktivität, sowie durch eine reprimierende, aber dennoch lockere Heterochromatinstruktur aus. Dies ermöglicht eine schnelle Reaktivierung. Der physiologische und evolutive Vorteil dieser Plastizität wird zum Ende der Arbeit diskutiert.

6.4 Welche Rolle spielen die *ESAGs* bei einem *in situ* Wechsel?

Wie bereits diskutiert wurde, führt die induzierte Überexpression eines ektopischen VSGs zu einer graduellen und reversiblen Attenuierung der aktiven BES. Diese Inaktivierung ist vermutlich die Konsequenz einer Veränderung der Chromatinstruktur, an der Dot1b beteiligt ist.

Obwohl das endogene *VSG221* in der Δ dot1b.121^{tet} Linie reprimiert wird und das ektopische *VSG121* wt Mengen erreicht, unterscheidet sich das Wachstum stark von der 221^{ES}121^{tet} Linie. Während die Teilungsrates in den Dot1b-defizienten Zellen nach der *VSG* Überexpression unverändert bleibt, kommt es in der 221^{ES}121^{tet} Linie nach 24 h zu einem Einbruch in der Wachstumsrate. Genauere Analysen haben gezeigt, dass es sich dabei nicht um einen typischen Zellzyklusarrest handelt, sondern dass die G1-Phase des Zellzyklus ausgedehnt wird. Es konnten ferner keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden. Die Zellen scheinen vielmehr in einen ruhenden Zustand einzutreten, begleitet von einer generellen Abnahme der Transkriptionsrate. All diese Ereignisse sind Merkmale für die differenzierungskompetenten ST-Formen (Amiguet-Vercher et al., 2004) (G1-Arrest, graduelle BES-Inaktivierung, Reduktion der Transkriptionsrate). Zusätzlich zeichnen sich ST-Formen durch die Expression für die Differenzierung notwendiger Transporter-Proteine aus, dem PAD1 und PAD2 (Dean et al., 2009). Es konnte hier ebenfalls gezeigt werden, dass auch die ruhenden Zellen nach 48 h der BES Attenuierung beginnen PAD1 zu exprimieren. Darüber hinaus sind diese Zellen sensitiv für das Differenzierungssignal *cis*-Aconitat und beginnen nach dessen Zugabe das PZF Oberflächenprotein EP1 zu exprimieren. Die Kultivierung der ruhenden Zellen in Differenzierungsmedium bei 27° C führte sogar zu einem Auflösen der ruhenden Phase und zur vollständigen Differenzierung zum Insektenstadium. Ohne das Differenzierungssignal verweilen die Zellen jedoch für 5 Tage in diesem ruhenden Zustand bis sie die attenuierte BES wieder reaktivieren und normale Teilungsrates erreichen. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die Kompetenz zur Stadiendifferenzierung nicht zwangsläufig zu einer irreversiblen

Festlegung zum Wirtswechsel führt.

Wodurch wird das verlangsamte Wachstum und die transiente Differenzierungskompetenz ausgelöst? Die Attenuierung der aktiven BES nach der *VSG121* Überexpression ist nach 2 h messbar und innerhalb von 8 h abgeschlossen. Zwangsläufig führt dies ebenfalls zu einer Reduktion der Expression aller in der BES lokalisierten *ESAGs*. In der $\Delta\text{dot1b.121}^{\text{tet}}$ Linie hingegen zeigt die *VSG121* Überexpression keinen Einfluss auf das Wachstum. In dieser Zelllinie wird nur das endogene *VSG221* reprimiert, Gene weiter stromaufwärts scheinen unbeeinflusst zu bleiben, somit auch die *ESAGs*. Demnach muss die Reduktion eines oder mehrerer *ESAGs* für den Eintritt in den ruhenden Zustand und die Expression ST-spezifischer Gene verantwortlich sein.

Alle BESs von *T. brucei* weisen eine sehr ähnliche Zusammensetzung an *ESAGs* auf. Am stärksten konserviert ist dabei die Lage von *ESAG6* und *7* sowie *ESAG1* und *2*. Während *ESAG6* und *7* direkt hinter dem BES Promoter liegen, befinden sich *ESAG1* und *2* immer ca. 40 kbp weiter stromabwärts und somit von allen *ESAGs* am nächsten zum Telomer (Hertz-Fowler et al., 2008). Da die Attenuierung der BES am Telomer beginnt und die mRNA Mengen von *ESAG1* und *2* schon nach 4 h der *VSG* Überexpression abnehmen, könnten die Produkte dieser Gene als früher Sensor für die BES-Aktivität dienen. Die RNAi gegen *ESAG1* und *ESAG2* zeigte in beiden Fällen keinen Einfluss auf das Wachstum in den ersten 48 h. An Tag 3 konnte jeweils ein Einbruch im Wachstum beobachtet werden, der von der Expression des ST-spezifischen Reporters GFP:PAD_{utr} begleitet wurde. Während die *ESAG1*^{RNAi} Zellen an Tag 5 wieder normale Teilungsraten und einen Abfall der GFP:PAD_{utr} Expression zeigten, starben die *ESAG2*^{RNAi} Zellen im weiteren Verlauf ab und behielten die Reporter-Expression bei. Die Quantifizierung der mRNA Mengen nach RNAi ergab dabei eine Reduktion der *ESAG1* mRNA auf 30 %, der *ESAG2*-Mengen auf 3 %, wodurch sich die unterschiedlichen Phänotypen erklären lassen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass der letale Phänotyp nach *ESAG2*-RNAi durch die Depletion nicht-BES-assoziiierter Kopien des Gens, sogenannte *GRESAGs* (*genes related to ESAGs*), ausgelöst wird. Im Genom von *T. brucei* TREU 927 finden sich 8 Kopien von *GRESAG2* und 12 von *GRESAG1* (Berriman et al., 2005). Zudem konnte *ESAG1* aus der aktiven BES von Trypanosomen deletiert werden, ohne dass diese

eine Beeinträchtigung in der Vitalität aufwiesen (Carruthers et al., 1996). Die RNAi zeigt jedoch, dass eine um 70 % reduzierte Expression von *ESAG1* transient zu einem Wachstumseffekt und ST-spezifischer Genexpression führt. Während der Attenuierung bleibt die BES noch zu etwa 20 % aktiv, was vergleichbar mit der hier erzielten RNAi-Effizienz ist. Die hier durchgeführte RNAi gegen *ESAG1* kann somit als Simulation einer BES Attenuierung betrachtet werden. Daraus ergibt sich, dass *ESAG1* direkt an der Kontrolle der BES-Aktivität beteiligt ist.

Für *ESAG2* lässt sich diese Aussage nicht uneingeschränkt treffen. Es ist nicht bekannt, ob eine Deletion des Gens aus der aktiven BES toleriert wird und ob der Verlust durch die nicht-BES Kopien kompensiert werden kann. Ebenso wurde hier durch die RNAi eine Reduktion um mehr als 90 % der *ESAG2*-Expression erreicht, was nicht mit einer BES Attenuierung vergleichbar ist. Es ist daher denkbar, dass eine Reduktion um 70 % zu einem weniger fatalen Phänotypen führen würde. Um dennoch auszuschließen, dass die GFP:PAD_{utr} Induktion eine unspezifische Reaktion auf die Depletion eines jeden *ESAGs* ist, wurden weitere Gene aus der aktiven *VSG221* BES sowie *Tubulin* mittels RNAi in der GFP:PAD_{utr} Zelllinie depletiert (Abbildung 29 und 30).

Ein transientser Wachstumsphänotyp, vergleichbar mit der *ESAG1*-RNAi, konnte nach RNAi gegen *ESAG12* beobachtet werden, allerdings kam es zu keiner Zeit zu einer Expression des GFP:PAD_{utr} Reporters (Abbildung 29A). Ebenso zeigte die *Tubulin* RNAi den erwarteten letalen Phänotypen (LaCount et al., 2000), jedoch keine GFP-Expression (Abbildung 29B).

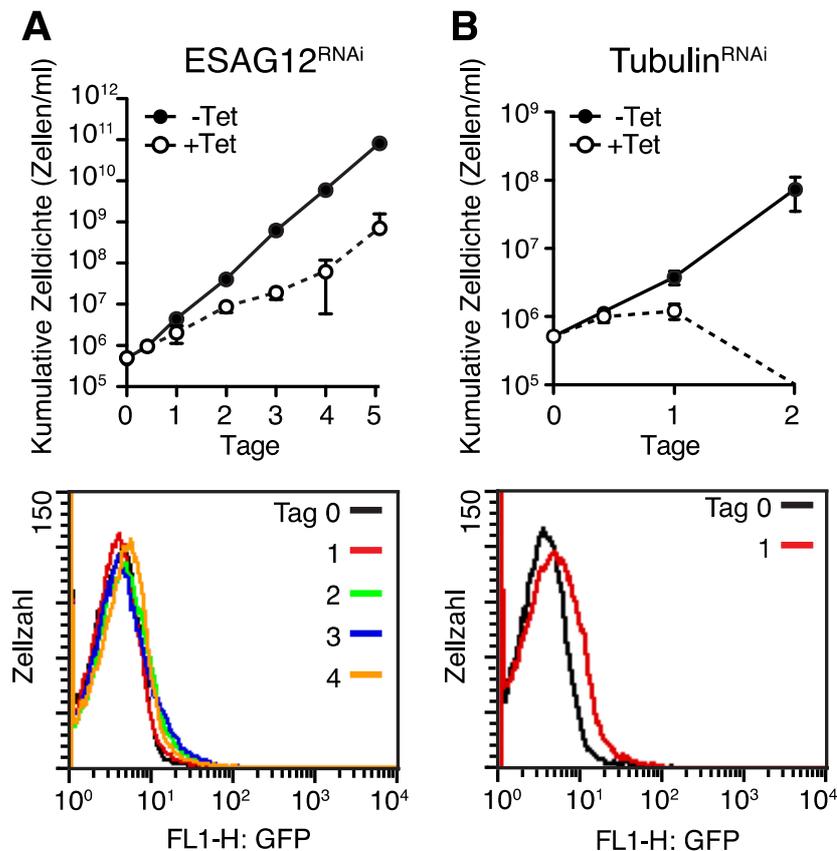


Abbildung 29 Die Depletion von ESAG12 und Tubulin zeigt keine ST-Marker Genexpression. In der GFP:PAD_{utr} Linie wurde RNAi gegen *ESAG12* (A) und *Tubulin* (B) induziert und das Wachstum sowie die GFP-Expression bestimmt. Die oberen Graphen zeigen die kumulative Zellzahlen/ml als Mittelwert \pm SD von 2 (*ESAG12*) und 4 (*Tubulin*) unabhängigen Klonen. Die unteren Graphen zeigen Durchflusssytometrie-Profile von jeweils einem repräsentativen Klon.

Die RNAi gegen *ESAG3* und *6/7* zeigte einen deutlichen Wachstumseinbruch nach 24 h, jedoch keine Induktion des GFP-Reporters (Abbildung 30A, B). Ein transienter Wachstumseffekt, vergleichbar mit der RNAi gegen *ESAG1* und *12*, konnte auch nach *ESAG8*-RNAi beobachtet werden. Allerdings zeigte diese einen leichten Anstieg an GFP-positiven Zellen an Tag 3 (Abbildung 30C). Der Phänotyp nach *ESAG8*-RNAi kann nicht auf die gleichzeitige Depletion nicht-BES assoziierter Kopien zurückzuführen sein, da *ESAG8* ausschließlich in den BESs zu finden ist (Berriman et al., 2005). Die Induktion des ST-spezifischen GFP-Reporters ist somit eine spezifische Reaktion auf die Reduktion der ESAGs 1, 2 und 8. Dies zeigt, dass eine Inaktivierung der aktiven BES durch die Reduktion dieser ESAGs unweigerlich

zu einem verlangsamten Zellzyklus und zur Expression ST-spezifischer Gene führt, wodurch die Trypanosomen vollständige Differenzierungskompetenz erlangen. Die induzierte Expression des *VSG121* kann als das Anschalten einer nicht funktionellen BES betrachtet werden. Wird eine BES aktiviert, die keine oder funktionslose *ESAGs* enthält, und die zuvor aktive BES attenuiert, führt dies unweigerlich zu dem ruhenden Zustand der Trypanosomen und befähigt diese zur Differenzierung. Der prä-aktive Status der alten BES ermöglicht jedoch eine schnelle Reaktivierung, was zur Aufhebung des ruhenden Zustandes führt.

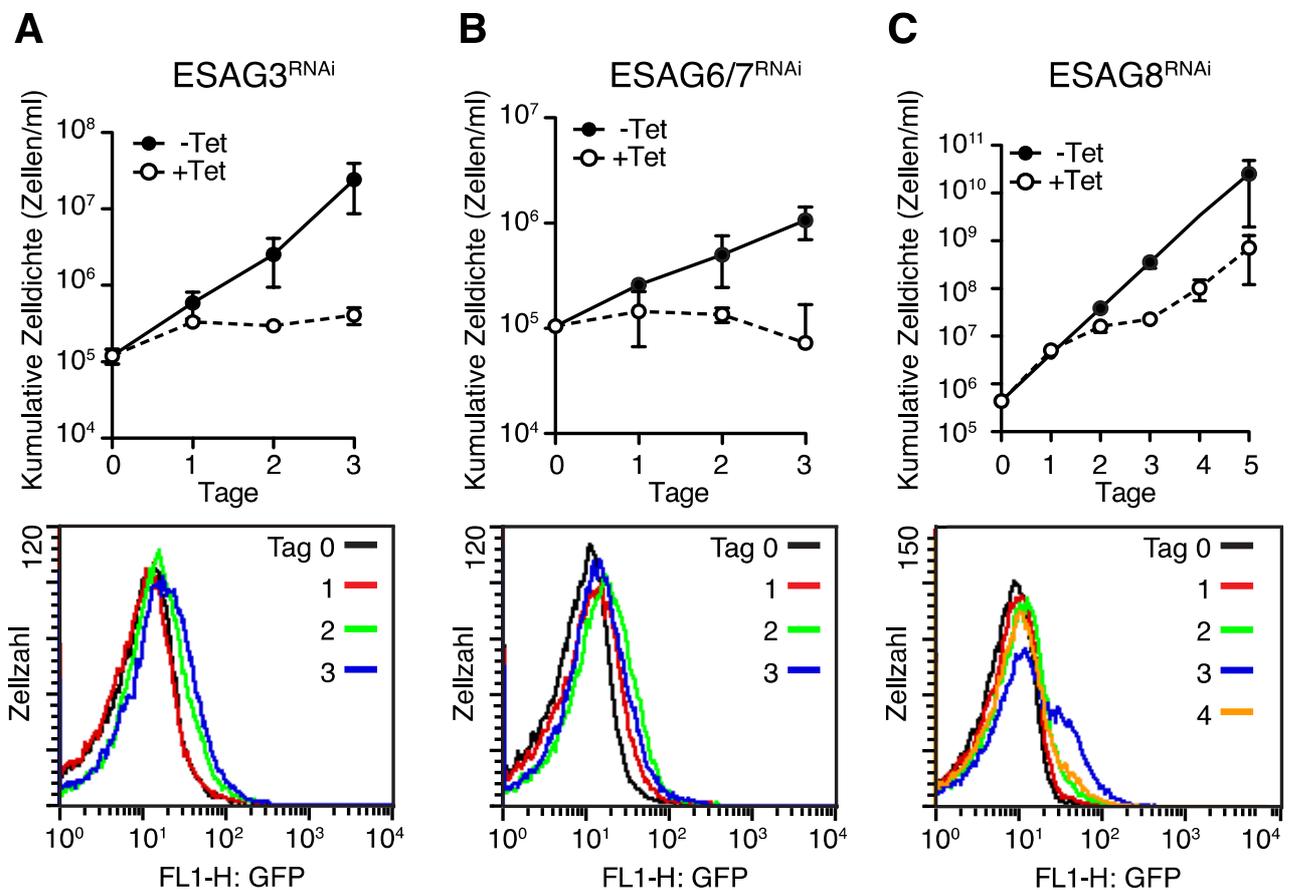


Abbildung 30 Die Induktion des ST-Markers GFP:PAD_{utr} ist spezifisch für die Depletion von drei ESAGs. In der GFP:PAD_{utr} Zelllinie wurde RNAi gegen die *ESAGs* 3 (A), 6/7 (B) und 8 (C) induziert. Alle Wachstumskurven (obere Graphen) zeigen die kumulative Zellzahl/ml von nicht induzierten (-Tet) und induzierten (+Tet) Zellen (Mittelwert ± SD für 2 (*ESAGs* 3, 8) und 3 (*ESAG6/7*) Klonen). Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (untere Graphen) und ist jeweils für einen repräsentativen Klon dargestellt (Die Herstellung der Zelllinien erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von S. Markert).

Der Wachstumsphänotyp der *VSG121* Überexpression konnte nicht vollständig durch RNAi gegen die *ESAGs* reproduziert werden. Das liegt wahrscheinlich darin begründet, dass bei der durch die *VSG* Überexpression induzierten BES Attenuierung nicht nur ein, sondern alle *ESAGs* reprimiert werden. Ferner ist hierbei zu beachten, dass die BES Attenuierung nicht mit einem vollständigen Abbruch der *ESAG*-Synthese gleichzusetzen ist, wie es bei der RNAi der Fall ist. Nach der *VSG121* Überexpression blieb die attenuierte BES noch zu etwa 20 % aktiv. Diese Restaktivität scheint ausreichende Mengen an essentiellen *ESAGs* bereitzustellen, um das Überleben der Trypanosomen für einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen zu sichern. Die zellulären Funktionen der *ESAGs* sind bis jetzt kaum geklärt. *ESAG1* ist ein Transmembranprotein, das wahrscheinlich in der Flagellartasche lokalisiert ist, ebenso wie das GPI-verankerte *ESAG2* (Pays et al., 2001). *ESAG8* dagegen lokalisiert im Nukleolus und im Zytoplasma (Hoek et al., 2000), und interagiert womöglich mit einem Protein, das für die Aktivierung des Mitochondriums während der Differenzierung verantwortlich ist (Pérez-Morga & Pays, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass die *ESAGs* bei der Wirts-Pathogen-Interaktion und während der Differenzierung eine wichtige Rolle spielen (Bitter et al., 1998; Pérez-Morga & Pays, 1999; Pays et al., 2001; Hoek et al., 2002; Young et al., 2008; Gluenz et al., 2011; Salmon et al., 2012;). Die konservierte Anordnung der *ESAGs* innerhalb der BESs könnte damit zusammen hängen, dass die Depletion der Proteine in einer bestimmten zeitlichen Ordnung ablaufen muss, um den Differenzierungsprozess einzuleiten und abzuschließen.

6.5 Antigene Variation und Entwicklung in *T. brucei*: Ein integratives Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression eines VSGs zu einer Attenuierung der aktiven BES innerhalb von 8 h führt. Diese Attenuierung beginnt am Telomer und ist wahrscheinlich auf eine Veränderung der Chromatinstruktur zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Attenuierung durch eine VSG genspezifische Repression angestoßen wird und sich durch eine Beteiligung von Dot1b entlang des Chromosoms ausbreitet. Wird die BES attenuiert, kommt es zu einem Abfall der ESAG Transkription. Dies führt innerhalb von 24 h zu einer drastischen Verlangsamung der Zellteilung durch eine verlängerte G1-Phase, begleitet von einer Reduktion der Transkriptionsrate von RNA polymerase I und II exprimierten Genen; die Parasiten treten in eine ruhende Phase ein. Nach Eintritt in diese ruhende Phase beginnen die Zellen, einen stadienspezifischen Oberflächentransporter, das PAD1, zu exprimieren. Dieser Transporter ist charakteristisch für die *Short Stumpy* (ST) Formen, die für den bevorstehenden Wechsel in den Insektenwirt prä-adaptiert und in der G1-Phase arretiert sind. Die ruhenden Trypanosomen werden somit sensitiv für die natürlichen Differenzierungssignale. Sogar bei 37° C unter Blutstromformbedingungen exprimieren die Parasiten in Anwesenheit von *cis*-Aconitat das PZF Oberflächenprotein EP1. In Differenzierungsmedium bei 27° C in der Anwesenheit von *cis*-Aconitat wird die ruhende Phase aufgehoben und die Zellen beginnen, sich vollständig zur Prozyklen Form zu differenzieren. Ohne diese Differenzierungssignale verweilen die Trypanosomen 5 Tage in dem ruhenden Stadium, bevor sie anschliessend die BES reaktivieren und sich das Wachstum normalisiert.

Die Entwicklung zu ST-Formen setzt normalerweise die Anwesenheit eines bis jetzt nicht identifizierten Moleküls voraus, dem *Stumpy* induzierenden Faktor (SIF). Dieser Faktor reichert sich bei hoher Zelldichte an und wirkt über einen cAMP-abhängigen Signalweg. Haben sich die Parasiten zu ST-Formen entwickelt, so sind sie zum Wirtswechsel festgelegt und können nicht wieder zur proliferativen *Long Slender* (LS) Form zurückkehren. Der in dieser Arbeit beschriebene Phänotyp stellt somit einen

bisher unbekanntem Zwischenzustand im Lebenszyklus der Trypanosomen dar und verbindet erstmals die antigene Variation, Wirtsanpassung und Entwicklung miteinander.

Das Wirtsspektrum von *T. brucei* spp. reicht von afrikanischen Wildtieren über domestizierte Nutztiere und Nager bis hin zum Menschen im Falle von *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*. Diese unterschiedlichsten Wirte erfordern spezielle Anpassungen der Parasiten, um in den jeweiligen Bedingungen überleben zu können. Ein Beispiel für die Anpassung an verschiedene Wirtsbedingungen ist die Variation des Transferrin-Rezeptors (Tf-R). Der Tf-R bindet im Blut befindliches Transferrin, wodurch die Eisenaufnahme der Parasiten erfolgt. Dieser wird von den *ESAGs* 6 und 7 kodiert, die sich direkt stromabwärts des Promoters der BESs befinden. Die Sequenz der *ESAGs* 6/7 unterscheidet sich leicht zwischen den einzelnen BES und die Tf-Rs weisen unterschiedliche Affinitäten für Transferrine aus verschiedenen Wirtstieren auf (Bitter et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von Trypanosomen in unterschiedlichen Seren den *in situ* Wechsel zu bestimmten BESs begünstigte (Gerrits et al., 2002). Auch die übrigen *ESAGs* weisen Sequenzunterschiede zwischen den BESs auf, doch die Funktion dieser Gene bei der Wirts-Pathogen-Interaktion ist bisher nicht bekannt. Eine weitere Wirtsanpassung stellt eine ungewöhnliche BES in *T. b. rhodesiense* dar. Die als *R-ES* bezeichnete BES enthält nur noch die *ESAGs* 6/7, eine Kopie des *ESAG5*, ein *VSG* und ein *VSG*-verwandtes Gen, das *Serum-Resistenz- assoziierte-Gen* (SRA). Einzig das von diesem Gen kodierte Protein ermöglicht *T. b. rhodesiense* das Überleben im menschlichen Serum (Xong et al., 1998; Welburn et al., 2001). Das bedeutet, dass die Parasiten beim Eintritt in den menschlichen Wirt nur überleben können, wenn sie diese spezielle R-ES durch einen *in situ* Wechsel aktivieren. Die Aktivierung einer BES ist aber wahrscheinlich kein gerichteter Prozess sondern unterliegt dem Zufallsprinzip. Das hier vorgeschlagene Modell zeigt jedoch, dass die Parasiten durchaus flexibel auf die Aktivierung einer "falschen" BES reagieren können (Abbildung 31). Treten die Parasiten in einen neuen Wirt ein, müssen sie zunächst eine BES aktivieren. Ist die darin befindliche Komposition an *ESAGs* nicht kompatibel mit dem Wirt, kann der Zellzyklus drastisch verlangsamt werden. Die

Expression nicht kompatibler ESAGs führt zu dem Eintritt in einen ruhenden Zustand. In diesem Zustand können die Parasiten (i) sich an die neue BES anpassen, (ii) durch die Tsetsefliege den Säugetierwirt verlassen, (iii) die alte BES re-aktivieren oder (iv) eine neue BES aktivieren. Ist eine geeignete BES aktiviert worden, so sorgt der selektive Druck für die Persistenz dieser und die antigene Variation wird durch die Mechanismen der Genkonversion, des Telomereaustausches und der Bildung von Mosaik-VSGs dominiert. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass *in situ* Wechsel zu Beginn einer Infektion auftreten, später jedoch von den rekombinatorischen Wechselmechanismen abgelöst werden (Morrison et al., 2009). Diese Flexibilität in der frühen Phase der Infektion bietet zum einen ein Zeitfenster für die Anpassung an unterschiedliche Wirtsorganismen und zum anderen die Möglichkeit, einen ungeeigneten Wirt wieder zu verlassen.

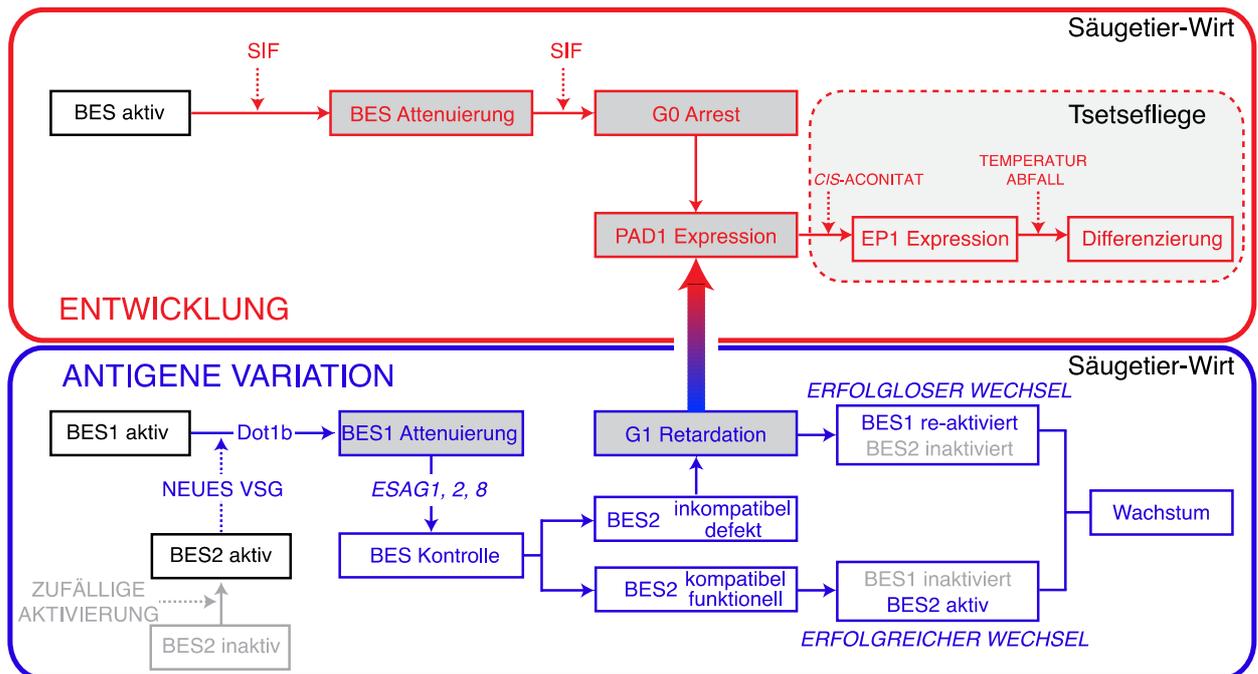


Abbildung 31 Modell für die integrative Rolle der BES Attenuierung während der Antigenen Variation und der Entwicklung in *T. brucei*. Die zufällige Aktivierung einer neuen BES (BES2) führt zu einer kurzzeitigen VSG Überexpression. Eine negative Rückkopplung initiiert die Attenuierung der zuvor aktiven BES (BES1) durch die Histon Methyltransferase Dot1b. Die Qualität der neuen BES wird anhand von ESAG1, 2 und 8 geprüft (BES Kontrolle). Ist die neue BES funktionell und die ESAGs kompatibel mit dem Wirt, kommt es zu einer endgültigen Inaktivierung der BES1, womit ein erfolgreicher *in situ* Wechsel abgeschlossen ist. Wenn die neue BES defekt oder inkompatibel mit dem Wirt ist, d.h. die ESAGs ihre Funktion nicht erfüllen können, verlangsamt sich der Zellzyklus durch eine G1-Retardation. Durch eine Reaktivierung der BES1 kann dieser ruhende Zustand wieder verlassen werden. Dieser Weg wird hier als erfolgloser *in situ* Wechsel bezeichnet. Wird die alte BES nicht reaktiviert, können die Trypanosomen bis zu 5 Tage in diesem ruhenden Zustand verbleiben. Nach etwa 48 h kommt es zur Expression des ST-spezifischen PAD1. Dieser Punkt verbindet die antigene Variation mit der Entwicklung. Durch die Expression des PAD1 werden die Parasiten differenzierungskompetent und können, bei Aufnahme durch die Tsetsefliege, den ungeeigneten Säugetierwirt verlassen. Die Differenzierungskompetenz führt über diesen Weg jedoch nicht zu einer endgültigen Festlegung zur Stadiendifferenzierung. Die konventionelle Differenzierung läuft unabhängig von diesem Mechanismus durch das dominante Signal SIF ab, das im Gegensatz dazu eine endgültige Festlegung zur Stadiendifferenzierung auslöst.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein neuer Mechanismus zur Kontrolle der antigenen Variation in *T. brucei* beschrieben werden. Die einzelnen molekularen Signalwege bleiben zum jetzigen Stand aber unbekannt. Vorläufige Experimente haben jedoch gezeigt, dass es Unterschiede zwischen verschiedenen VSGs gibt. So war es möglich, die aktive *VSG221* BES durch die induzierte Überexpression des *VSG118* zu attenuieren, nicht aber durch die Expression von *VSG060*. Jedoch wurde auch im Falle des *VSG060* das endogene *VSG221* reprimiert (Jones et al., Manuskript in Vorbereitung). Die genspezifische Repression scheint also unabhängig des zugeschalteten VSGs zu operieren, das Signal zur Attenuierung der aktiven BES aber nicht durch alle VSGs gleichermaßen ausgelöst zu werden. Des Weiteren scheint auch die aktive BES Einfluss auf diesen Mechanismus zu haben. In einem initialen Experiment wurde das *VSG221* in einer Zelllinie mit der aktiven *VSG121* BES überexprimiert. Erstaunlicherweise löste diese Kombination keine Attenuierung aus, und auch das endogene *VSG121* blieb unbeeinflusst von der ektopischen *VSG221* Expression. Dies führte dazu, dass nach 24 h eine Gesamtmenge von 200 % *VSG* mRNA vorhanden war (Abbildung 32).

Bereits frühere Arbeiten haben die *VSG121* BES als eine "dominante ES" (DES) beschrieben (Aitcheson et al., 2005). Dabei wurde beobachtet, dass die *VSG121* BES mit erhöhter Wahrscheinlichkeit durch einen *in situ* Wechsel aktiviert wurde, das *VSG121* Gen jedoch selten durch Genkonversion in die aktive *VSG221* BES dupliziert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass sowohl die Architektur der BESs als auch die VSGs selbst Einfluss auf den *in situ* Wechsel haben. Dadurch ließen sich die unterschiedlichen Häufigkeiten erklären, mit denen bestimmte BESs und VSGs durch *in situ* Wechsel angeschaltet werden (Aitcheson et al., 2005). Das Ziel weiterführender Arbeiten sollte es nun sein, den molekularen Signalweg zu identifizieren, der durch die VSG Überexpression die BES Attenuierung signalisiert. Dazu wurden bereits RNA-Sequenzierungen auf den Weg gebracht, die Veränderungen der Genexpression unmittelbar nach VSG Überexpression aufzeigen sollen.

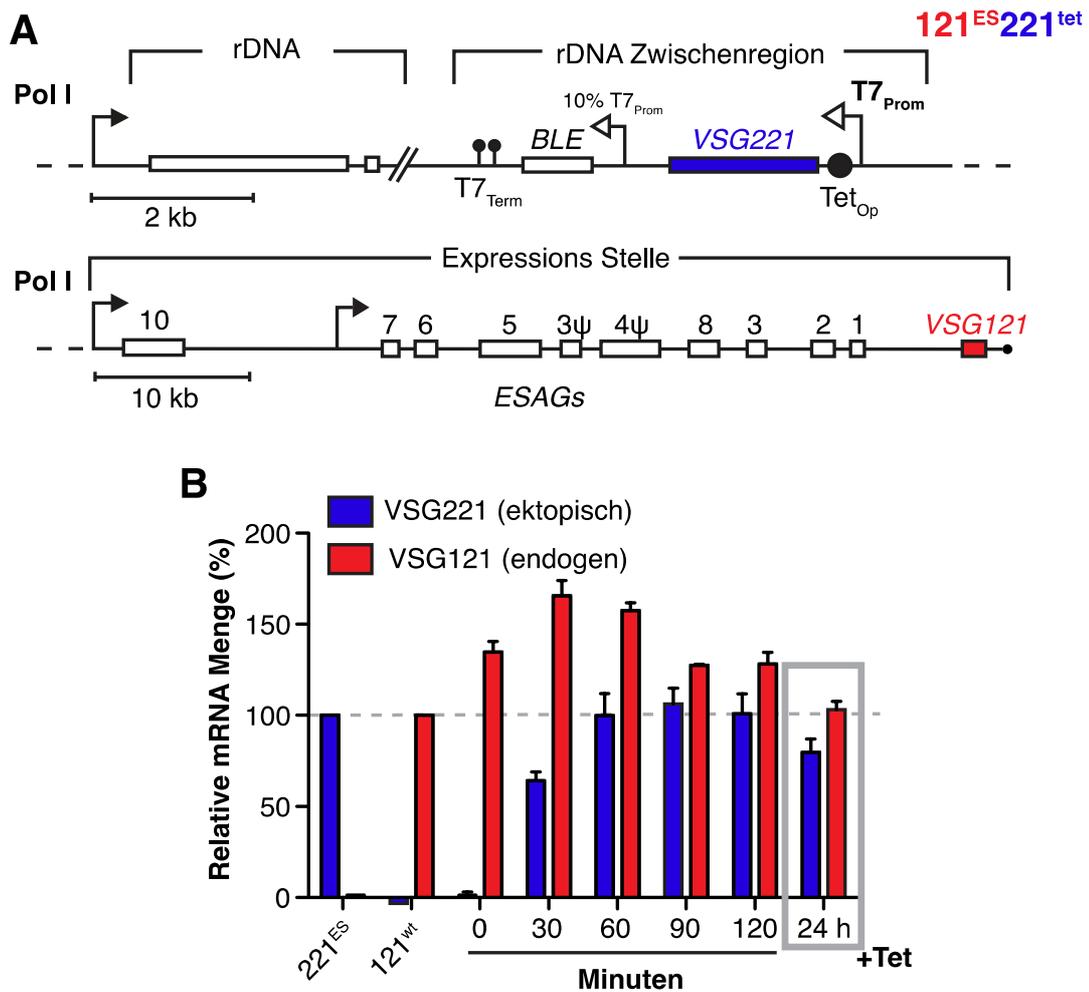


Abbildung 32 Die induzierte Überexpression von VSG221 führt nicht zu einer Attenuierung der VSG121 BES. (A) Illustration der 121^{ES}221^{tet} Zelllinie. Die 121^{ES} Linie exprimiert konstitutiv den Tet-Repressor sowie die T7 RNA Polymerase. In diese Linie wurde ein Plasmid transfiziert, das in die ribosomale Zwischenregion integriert und das ektopische VSG221 enthält, welches durch Tet-Zugabe exprimiert wird. Die aktive VSG121-BES unterscheidet sich in der Zusammensetzung der ESAGs leicht von der VSG221 BES. Zudem besitzt die VSG121 BES zwei Promotorsequenzen (schwarze Pfeile). (B) Quantifizierung der VSG mRNA-Mengen nach Tet-Induktion. Nach verschiedenen Zeiten der VSG221 Expression wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA Dot Blot quantifiziert. Die mRNA Mengen nach 24 h Induktion sind durch einen grauen Kasten hervorgehoben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von 2 unabhängigen Klonen.

8 Literaturverzeichnis

- Aitchison, N., Talbot, S., Shapiro, J., Hughes, K., Adkin, C., Butt, T., et al. (2005). VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1608–1622.
- Alsford, S., & Horn, D. (2012). Cell-cycle-regulated control of VSG expression site silencing by histones and histone chaperones ASF1A and CAF-1b in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research*, 40(20), 10150–10160.
- Alsford, S., Kawahara, T., Isamah, C., & Horn, D. (2007). A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Molecular Microbiology*, 63(3), 724–736.
- Amiguet-Vercher, A., Pérez-Morga, D., Pays, A., Poelvoorde, P., Van Xong, H., Tebabi, P., et al. (2004). Loss of the mono-allelic control of the VSG expression sites during the development of *Trypanosoma brucei* in the bloodstream. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1577–1588.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Neuropsychopharmacology*, 21(3), 381–395.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiases. *Lancet*, 362(9394), 1469–1480.
- Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., et al. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 82(1), 77–87.
- Batram, C. (2009). Functional analysis of the variant surface glycoprotein 3' untranslated region in *Trypanosoma brucei*. Diplomarbeit.
- Bell, S. P. (2002). The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes & Development*, 16(6), 659–672.
- Belotserkovskaya, R., Saunders, A., Lis, J. T., & Reinberg, D. (2004). Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1677(1-3), 87–99.
- Benmerzouga, I., Concepción-Acevedo, J., Kim, H.-S., Vандoros, A. V., Cross, G. A. M., Klingbeil, M. M., & Li, B. (2012). *Trypanosoma brucei* Orc1 is essential for nuclear DNA replication and affects both VSG silencing and VSG switching. *Molecular Microbiology*.

- Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S., & Pays, E. (1995). The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, *14*(12), 2925–2934.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., et al. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, *309*(5733), 416–422.
- Bitter, W., Gerrits, H., Kieft, R., & Borst, P. (1998). The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, *391*(6666), 499–502.
- Boothroyd, C. E., Dreesen, O., Leonova, T., Ly, K. I., Figueiredo, L. M., Cross, G. A. M., & Papavasiliou, F. N. (2009). A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, *459*(7244), 278–281.
- Boulton, S. J. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *The EMBO Journal*, *17*(6), 1819–1828.
- Breidbach, T., Ngazoa, E., & Steverding, D. (2002). *Trypanosoma brucei*: in vitro slender-to-stumpy differentiation of culture-adapted, monomorphic bloodstream forms. *Experimental Parasitology*, *101*(4), 223–230.
- Bridges, D. J. D., Pitt, A. R. A., Hanrahan, O. O., Brennan, K. K., Voorheis, H. P. H., Herzyk, P. P., et al. (2007). Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics*, *8*(1), 83–99.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, *65*(1), 175–187.
- Carruthers, V. B., Navarro, M., & Cross, G. A. (1996). Targeted disruption of expression site-associated gene-1 in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *81*(1), 65–79.
- Chaves, I., Rudenko, G., Dirks-Mulder, A., Cross, M., & Borst, P. (1999). Control of variant surface glycoprotein gene-expression sites in *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, *18*(17), 4846–4855.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., & Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, *78*(5), 823–834.
- Czichos, J., Nonnengaesser, C., & Overath, P. (1986). *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. *Experimental Parasitology*, *62*(2), 283–291.

- Dean, S., Marchetti, R., Kirk, K., & Matthews, K. R. (2009). A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal. *Nature*, *459*(7244), 213–217.
- Denninger, V., Fullbrook, A., Bessat, M., Ersfeld, K., & Rudenko, G. (2010). The FACT subunit TbSpt16 is involved in cell cycle specific control of VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, *78*(2), 459–474.
- DePamphilis, M. L., Blow, J. J., Ghosh, S., Saha, T., Noguchi, K., & Vassilev, A. (2006). Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Current Opinion in Cell Biology*, *18*(3), 231–239.
- Duraisingh, M. T., Voss, T. S., Marty, A. J., Duffy, M. F., Good, R. T., Thompson, J. K., et al. (2005). Heterochromatin Silencing and Locus Repositioning Linked to Regulation of Virulence Genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, *121*(1), 13–24. d
- Dzikowski, R., Frank, M., & Deitsch, K. (2006). Mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites is regulated independently of antigen production. *PLoS Pathogens*, *2*(3), e22.
- Dzikowski, R., Li, F., Amulic, B., Eisberg, A., Frank, M., Patel, S., et al. (2007). Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites. *EMBO Reports*, *8*(10), 959–965.
- Ehlers, B., Czichos, J., & Overath, P. (1987). RNA turnover in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(3), 1242–1249.
- Engstler, M., & Boshart, M. (2004). Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development*, *18*(22), 2798–2811.
- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., & Overath, P. (2007). Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell*, *131*(3), 505–515.
- Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grünfelder, C. G., Schwarz, H., Boshart, M., & Overath, P. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 7), 1105–1115.
- Evans, S. K., Sistrunk, M. L., Nugent, C. I., & Lundblad, V. (1998). Telomerase, Ku, and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*, *107*(6-7), 352–358.
- Ferguson, M. A., Haldar, K., & Cross, G. A. (1985). *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1, 2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(8), 4963–4968.

- Fey, K. (2011). Funktionsanalyse der C-terminalen Domäne des variablen Oberflächenglykoproteins von *Trypanosoma brucei* am Beispiel von MITat1.6. Diplomarbeit.
- Figueiredo, L. M., & Cross, G. A. M. (2010). Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 148–154.
- Figueiredo, L. M., Janzen, C. J., & Cross, G. A. M. (2008). A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biology*, 6(7), e161.
- Fleischmann, A., Abdus-Saboor, I., Sayed, A., & Shykind, B. (2013). Functional interrogation of an odorant receptor locus reveals multiple axes of transcriptional regulation. *PLoS Biology*, 11(5), e1001568.
- Fleischmann, A., Shykind, B. M., Sosulski, D. L., Franks, K. M., Glinka, M. E., Mei, D. F., et al. (2008). Mice with a “Monoclonal Nose”: Perturbations in an Olfactory Map Impair Odor Discrimination. *Neuron*, 60(6), 1068–1081.
- Frank, M., Dzikowski, R., Costantini, D., Amulic, B., Berdougou, E., & Deitsch, K. (2006). Strict pairing of var promoters and introns is required for var gene silencing in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9942–9952.
- Freitas-Junior, L. H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S. A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O. K., Rojas-Meza, A. P., et al. (2005). Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites. *Cell*, 121(1), 25–36.
- Gao, Q., Reynolds, G. E., Innes, L., Pedram, M., Jones, E., Junabi, M., et al. (2007). Telomeric transgenes are silenced in adult mouse tissues and embryo fibroblasts but are expressed in embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(12), 3085–3092.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498–511.
- Gasser, S. M., & Cockell, M. M. (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene*, 279(1), 1–16.
- Gerrits, H., Mussmann, R., Bitter, W., Kieft, R., & Borst, P. (2002). The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(2), 237–247.

- Giresi, P. G., Kim, J., McDaniel, R. M., Iyer, V. R., & Lieb, J. D. (2007). FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Research*, 17(6), 877–885.
- Glover, L., & Horn, D. (2006). Repression of polymerase I-mediated gene expression at *Trypanosoma brucei* telomeres. *EMBO Reports*, 7(1), 93–99.
- Glover, L., Alford, S., Beattie, C., & Horn, D. (2007). Deletion of a trypanosome telomere leads to loss of silencing and progressive loss of terminal DNA in the absence of cell cycle arrest. *Nucleic Acids Research*, 35(3), 872–880.
- Glueck, E., Barker, A. R., & Gull, K. (2011). An expanded family of proteins with BPI/LBP/PLUNC-like domains in trypanosome parasites: an association with pathogenicity? *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 966–970.
- Goldshmidt, H., Matas, D., Kabi, A., Carmi, S., Hope, R., & Michaeli, S. (2010). Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000731.
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., & Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, 63(4), 751–762.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., & Ohrlein, A. (1986). A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell*, 45(6), 837–846.
- Gruszynski, A. E., van Deursen, F. J., Albareda, M. C., Best, A., Chaudhary, K., Cliffe, L. J., et al. (2006). Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(2), 211–223.
- Grünfelder, C. G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.-D., Boshart, M., & Overath, P. (2002). Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(8), 547–559.
- Grünfelder, C. G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.-D., Morgan, G. W., et al. (2003). Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 2029–2040.
- Günzel, M. (2010). Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei*. Dissertation.
- He, C. Y. (2004). Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology*, 165(3), 313–321.

- Hertz-Fowler, C., Figueiredo, L. M., Quail, M. A., Becker, M., Jackson, A., Bason, N., et al. (2008). Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, *3*(10), e3527.
- Hewitt, S. L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthoey, J., et al. (2009). RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nature Immunology*, *10*(6), 655–664.
- Hoeijmakers, J. H., Frasch, A. C., Bernards, A., Borst, P., & Cross, G. A. (1980). Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes. *Nature*, *284*(5751), 78–80.
- Hoek, M., Engstler, M., & Cross, G. A. (2000). Expression-site-associated gene 8 (ESAG8) of *Trypanosoma brucei* is apparently essential and accumulates in the nucleolus. *Journal of Cell Science*, *113* (Pt 22), 3959–3968.
- Hoek, M., Zanders, T., & Cross, G. A. M. (2002). *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *120*(2), 269–283.
- Horn, D., & McCulloch, R. (2010). Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(6), 700–705.
- Hughes, K., Wand, M., Foulston, L., Young, R., Harley, K., Terry, S., et al. (2007). A novel ISWI is involved in VSG expression site downregulation in African trypanosomes. *The EMBO Journal*, *26*(9), 2400–2410.
- Imai, T., Suzuki, M., & Sakano, H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science*, *314*(5799), 657–661.
- Janzen, C. J., Lander, F., Dreesen, O., & Cross, G. A. M. (2003). Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research*, *32*(22), 6575–6584.
- Janzen, C. J., Hake, S. B., Lowell, J. E., & Cross, G. A. M. (2006). Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Cell*, *23*(4), 497–507.
- Jung, D., & Alt, F. W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*, *116*(2), 299–311.
- Khan, M., Vaes, E., & Mombaerts, P. (2011). Regulation of the probability of mouse odorant receptor gene choice. *Cell*, *147*(4), 907–921.
- Kim, H.-S., Park, S. H., Günzl, A., & Cross, G. A. M. (2013). MCM-BP Is Required for Repression of Life-Cycle Specific Genes Transcribed by RNA Polymerase I in the Mammalian Infectious Form of *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, *8*(2), e57001.

- Kohno, K. (2010). Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *Journal of biochemistry*, *147*(1), 27–33.
- Koumandou, V. L., Natesan, S. K. A., Sergeenko, T., & Field, M. C. (2008). The trypanosome transcriptome is remodelled during differentiation but displays limited responsiveness within life stages. *BMC Genomics*, *9*, 298.
- Kraut-Cohen, J., & Gerst, J. E. (2010). Addressing mRNAs to the ER: cis sequences act up! *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(8), 459–469.
- LaCount, D. J., Bruse, S., Hill, K. L., & Donelson, J. E. (2000). Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *111*(1), 67–76.
- Landeira, D., Bart, J.-M., Van Tyne, D., & Navarro, M. (2009). Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *The Journal of Cell Biology*, *186*(2), 243–254.
- Lewcock, J. W., & Reed, R. R. (2004). A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(4), 1069–1074.
- Liang, X.-H., Haritan, A., Uliel, S., & Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell*, *2*(5), 830–840.
- Liu, H.-S., Jan, M.-S., Chou, C.-K., Chen, P.-H., & Ke, N.-J. (1999). Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *260*(3), 712–717.
- Lomvardas, S. S., Barnea, G. G., Pisapia, D. J. D., Mendelsohn, M. M., Kirkland, J. J., & Axel, R. R. (2006). Interchromosomal Interactions and Olfactory Receptor Choice. *Cell*, *126*(2), 11–11.
- Lustig, Y., Sheiner, L., Vagima, Y., Goldshmidt, H., Das, A., Bellofatto, V., & Michaeli, S. (2007). Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Reports*, *8*(4), 408–413.
- Lyons, D. B., Allen, W. E., Goh, T., Tsai, L., Barnea, G., & Lomvardas, S. (2013). An epigenetic trap stabilizes singular olfactory receptor expression. *Cell*, *154*(2), 325–336.
- MacGregor, P., & Matthews, K. R. (2012). Identification of the regulatory elements controlling the transmission stage-specific gene expression of PAD1 in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, *40*(16), 7705–7717.

- MacGregor, P., Savill, N. J., Hall, D., & Matthews, K. R. (2011). Transmission stages dominate trypanosome within-host dynamics during chronic infections. *Cell Host & Microbe*, *9*(4), 310–318.
- MacGregor, P., Szöör, B., Savill, N. J., & Matthews, K. R. (2012). Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(6), 431–438.
- Magklara, A., Yen, A., Colquitt, B. M., Clowney, E. J., Allen, W., Markenscoff-Papadimitriou, E., et al. (2011). An epigenetic signature for monoallelic olfactory receptor expression. *Cell*, *145*(4), 555–570.
- Mandava, V., Fernandez, J. P., Deng, H., Janzen, C. J., Hake, S. B., & Cross, G. A. M. (2007). Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *156*(1), 41–50.
- Marcello, L., & Barry, J. D. (2007). Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Research*, *17*(9), 1344–1352.
- Marsellach, F.-X., Huertas, D., & Azorín, F. (2006). The multi-KH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p contributes to the regulation of telomeric silencing. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(26), 18227–18235.
- Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, *118*(Pt 2), 283–290.
- Michishita, E., McCord, R. A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., et al. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, *452*(7186), 492–496.
- Mishra, K., & Shore, D. (1999). Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by Rif proteins. *Current Biology*, *9*(19), 1123–S2.
- Morrison, L. J., Majiwa, P., Read, A. F., & Barry, J. D. (2005). Probabilistic order in antigenic variation of *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology*, *35*(9), 961–972.
- Morrison, L. J., Marcello, L., & McCulloch, R. (2009). Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cellular Microbiology*, *11*(12), 1724–1734.
- Muñoz-Jordán, J. L., Davies, K. P., & Cross, G. A. (1996). Stable expression of mosaic coats of variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei*. *Science*, *272*(5269), 1795–1797.

- Navarro, M., & Gull, K. (2001). A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 414(6865), 759–763.
- Nguyen, M. Q., Zhou, Z., Marks, C. A., Ryba, N. J. P., & Belluscio, L. (2007). Prominent Roles for Odorant Receptor Coding Sequences in Allelic Exclusion. *Cell*, 131(5), 1009–1017.
- Overath, P., & Engstler, M. (2004). Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Molecular Microbiology*, 53(3), 735–744.
- Pays, E., Guyaux, M., Aerts, D., Van Meirvenne, N., & Steinert, M. (1985). Telomeric reciprocal recombination as a possible mechanism for antigenic variation in trypanosomes. *Nature*, 316(6028), 562–564.
- Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L., & Pérez-Morga, D. (2001). The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 114(1), 1–16.
- Pedram, M., Sprung, C. N., Gao, Q., Lo, A. W. I., Reynolds, G. E., & Murnane, J. P. (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1865–1878.
- Pérez-Morga, D., & Pays, E. (1999). A protein linked to mitochondrion development in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 101(1-2), 161–172.
- Poon, S. K., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., & Kelly, S. (2012). A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. *Open biology*, 2(2), 110037–110037.
- Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B., & Boshart, M. (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1), 269–280.
- Roditi, I., Schwarz, H., Pearson, T. W., Beecroft, R. P., Liu, M. K., Richardson, J. P., et al. (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology*, 108(2), 737–746.
- Rudenko, G. (2010). Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. *Essays in Biochemistry*, 48(1), 201–219.
- Salmon, D. D., Vanwalleghem, G. G., Morias, Y. Y., Denoëud, J. J., Krumbholz, C. C., Lhommé, F. F., et al. (2012). Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science*, 337(6093), 463–466.

- Schwede, A., Jones, N., Engstler, M., & Carrington, M. (2011). The VSG C-terminal domain is inaccessible to antibodies on live trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175(2), 201–204.
- Schwede, A., Kramer, S., & Carrington, M. (2012). How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? *Protosplasma*, 249(2), 223–238.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., & Sakano, H. (2004). One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics : TIG*, 20(12), 648–653.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., & Sakano, H. (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science*, 302(5653), 2088–2094.
- Sheader, K., Vaughan, S., Minchin, J., Hughes, K., Gull, K., & Rudenko, G. (2005). Variant surface glycoprotein RNA interference triggers a precytokinesis cell cycle arrest in African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8716–8721.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., & Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna*, 6(7), 1069–1076.
- Shykind, B. M., Rohani, S. C., O'Donnell, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Sun, Y., et al. (2004). Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell*, 117(6), 801–815.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., et al. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, 82(1), 101–110.
- Smith, T. K., Vasileva, N., Gluenz, E., Terry, S., Portman, N., Kramer, S., et al. (2009). Blocking variant surface glycoprotein synthesis in *Trypanosoma brucei* triggers a general arrest in translation initiation. *PLoS ONE*, 4(10), e7532.
- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D., & Rajewsky, K. (1997). B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity*, 6(3), 225–233.
- Stanne, T. M., & Rudenko, G. (2010). Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 136–147.
- Steverding, D., Stierhof, Y. D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A. G., & Overath, P. (1994). ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *European Journal of Cell Biology*, 64(1), 78–87.

- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., et al. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, *82*(1), 89–100.
- Swamy, L., Amulic, B., & Deitsch, K. W. (2011). *Plasmodium falciparum* var gene silencing is determined by cis DNA elements that form stable and heritable interactions. *Eukaryotic Cell*, *10*(4), 530–539.
- Taylor, J. E., Rudenko, G. (2006). Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends in Genetics*, *22*(11), 614–620.
- Thon, G., Baltz, T., & Eisen, H. (1989). Antigenic diversity by the recombination of pseudogenes. *Genes & Development*, *3*(8), 1247–1254.
- Turner, C. M., & Barry, J. D. (1989). High frequency of antigenic variation in *Trypanosoma brucei* rhodesiense infections. *Parasitology*, *99 Pt 1*, 67–75.
- Uhl, B. (2009). Development of a Quantitative Real-Time PCR Protocol for Expression Studies in *Trypanosoma brucei*. Diplomarbeit.
- van Deursen, F. J., Shahi, S. K., R Turner, C. M., Hartmann, C., Matthews, K. R., Clayton, C. E., & Guerra-Giraldez, C. (2001). Characterisation of the growth and differentiation in vivo and in vitro-of bloodstream-form *Trypanosoma brucei* strain TREU 927. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *112*(2), 163–171.
- van Luenen, H. G. A. M., Kieft, R., Mussmann, R., Engstler, M., Riet, ter, B., & Borst, P. (2005). Trypanosomes change their transferrin receptor expression to allow effective uptake of host transferrin. *Molecular Microbiology*, *58*(1), 151–165.
- Vanhamme, L., Poelvoorde, P., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., & Pays, E. (2000). Differential RNA elongation controls the variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, *36*(2), 328–340.
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., & Boshart, M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *Journal of Cell Science*, *110 (Pt 21)*, 2661–2671.
- Welburn, S. C., Picozzi, K., Fèvre, E. M., Coleman, P. G., Odiit, M., Carrington, M., & Maudlin, I. (2001). Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *The Lancet*, *358*(9298), 2017–2019.
- Wheeler, R. J. (2010). The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in Parasitology*, *26*(9), 457–464.

- Wickstead, B. (2004). The Small Chromosomes of *Trypanosoma brucei* Involved in Antigenic Variation Are Constructed Around Repetitive Palindromes. *Genome Research*, 14(6), 1014–1024.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99(1), 89–101.
- Woodward, R., & Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 95 (Pt 1), 49–57.
- [WHO] World Health Organization. "African trypanosomiasis or sleeping sickness." *World Health Organization Fact Sheet* 2013 (2013): 259.
- Xong, H. V., Vanhamme, L., Chamekh, M., Chimfwembe, C. E., Van Den Abbeele, J., Pays, A., et al. (1998). A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*, 95(6), 839–846.
- Yang, X., Figueiredo, L. M., Espinal, A., Okubo, E., & Li, B. (2009). RAP1 Is Essential for Silencing Telomeric Variant Surface Glycoprotein Genes in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 137(1), 99–109.
- Young, R., Taylor, J. E., Kurioka, A., Becker, M., Louis, E. J., & Rudenko, G. (2008). Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC Genomics*, 9, 385.

9 Anhang

9.1 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Engstler im Zeitraum von April 2009 bis Oktober 2013 angefertigt.

Gemäß § 4, Abs. 3, Nr. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg erkläre ich hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 30.10.2013

Christopher Batram

9.2 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Christopher Batram, Nicola G. Jones, Sebastian M. Markert and Markus Engstler.
"Expression site attenuation links antigenic variation and development in
Trypanosoma brucei." (Eingereicht; Bestätigung und Manuskript liegen bei)

9.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christopher Batram
Geburtsdatum: 27.01.1983
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Werdegang

Seit 01.04.2009	Doktorand/Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Würzburg am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie
Oktober 2003 bis Januar 2009	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt; Abschluss: Diplom
Juli 2002 bis April 2003	Grundwehrdienst
1994 - 2002	Gymnasium Süderelbe (Hamburg) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Christopher Batram

Würzburg, den 30.10.2013

9.4 Danksagungen

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei

Markus, für dieses spannende Projekt und die Unterstützung über die gesamte Zeit hinweg.

Prof. Dr. Thomas Rudel, für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Nicola, für eine tolle Zusammenarbeit und viele hilfreiche Diskussionen.

Tim, für seine Expertise in der Mikroskopie und immer wieder hilfreiche Anmerkungen.

Kathrin, Ines, Reinhild, Barti, Jamin, und Marius, für eine Atmosphäre im Labor, die man wohl besser nicht hätte haben können.

Uli und alle anderen Helfer am Lehrstuhl, die die Arbeit überhaupt ermöglichen.

Janne und Nicolai, für wertvolle Diskussionen und Tipps.

Susanne K., für Radioaktivität ;-)

Dem gesamten Lehrstuhl Zoo I, für eine unvergessliche Zeit.

Jana und Andi, für einfach Alles!

Meinen Eltern, die mir alles ermöglicht haben.

Catarina, die immer an mich glaubt und mich unterstützt, wo es nur geht!