



**Etablierung eines induzierbaren *knockdown* des
autophagy-related gene 8 in *Trypanosoma brucei*
mittels RNA Interferenz**

Diplomarbeit

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt von

Stefan Boris Mogk

aus Reutlingen

Tübingen im Januar 2009



Hiermit versichere ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tübingen, den 1. Januar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde vom 05.05.2008 bis 05.01.2009 am Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael Duszenko angefertigt.

Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich nicht nur für die spannende Themenstellung, sondern auch für die Freiheiten, experimentelle Schwerpunkte selbst zu bestimmen. Vielen Dank für die uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft, für Hilfestellungen und Ratschläge. Nicht zuletzt bedanke ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die freundliche Atmosphäre im Labor.

Björn Bassarak, danke, daß Du mir mit Deiner geballten Erfahrung immer die richtige Richtung gewiesen und bereitwillig alle aufkommenden Fragen mit mir erörtert hast. Ohne Deine Vorarbeiten auf dem Themengebiet hätte diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form entstehen können.

Torsten Barth, meinem Nebensitzer wider Willen, danke ich für die täglichen, jedoch nie böartigen Sticheleien. Danke, daß Du mir die Sache mit dem Snickers nachsiehst, dem LAN-Kabel, sowie dem ganzen Rest. Danke, daß Du wenigstens so getan hast, als würdest Du meine Arbeit korrekturlesen. Danke aber auch für viele wertvolle Ratschläge, sowie fachliche Diskussionen. Und zuletzt danke, daß Du meinen Musikgeschmack geduldig ausgehalten hast.

Caroline Schönfeld, vielen Dank, daß Du mich mit Deiner Erfahrung unterstützt hast, wenn mir bei neuen Methoden Chemikalien oder Ahnung fehlten. Danke, daß Du mich auf diversen Festen so fürsorglich bewirtest hast. Und danke, daß Du im Trödler so tapfer warst. Ich hoffe, das erste war nicht das letzte mal.

Gordon Eske, Du hast mir mit Deinem unermüdlichen und aufopferungsvollen Einsatz sehr geholfen. Wenn es gebrannt hat, war "Nunu" zur Stelle, selbst zur mitternächtlichen Zellzahlbestimmung. Vielen Dank. Außerdem bedanke ich mich neben Pizzabaguettes auch dafür, daß Du gelegentlich davon abgesehen hast, meine Ohren mit Deinem Gesang zu beglücken. Brandenburg freilich war eine Ausnahme.

Andrea Wegner, auch Dir danke ich für Deine wertvolle Hilfe im Labor. Mindestens genauso dankbar bin ich jedoch für die erholsamen Turniere am Tischkicker, die Du regelmäßig nur deswegen gewinnst, weil Du Deine Gegner in Grund und Boden quasselst. Danke für die tollen Partys dichtesten Erlebens. Und danke, daß Du bei mir so manchen Laborfrust mit Deiner permanenten guten Laune einfach weggefegt hast.

Derya Demirsal, vielen Dank für die liebevolle Pflege meiner Dauerkulturen, sowie Deine tatkräftige Unterstützung bei allen möglichen Projekten. Danke fürs Mitbringen meines Lieblings-Nudelsalats (ohne den ich sicher schon verhungert wäre), für leckere Zigarren und detaillierte Prophezeiungen, die Du aus meinem Kaffeesatz zu lesen vermochtest.

Viola Denninger, Dir danke ich vor allem dafür, daß Du zu Beginn meiner Arbeit noch bei uns gearbeitet hast. Das fröhliche Lachen aus Deiner Ecke verbreitete immer die erfrischende Botschaft “Alles wird gut”. Ferner bedanke ich mich für Primer und Vorversuche zur 5'-UTR-Bestimmung von ATG8.

Khalid Muhammad danke ich für gute Gespräche und zahlreiche Ideen. Danke, daß ich zu jeder Tages- und Nachtzeit ins Labor kommen konnte, ohne daß es mir langweilig wurde, weil ich garantiert nicht alleine hier war.

Björn Buchholz danke ich für interessante Nebenprojekte und den damit verbundenen Spaß- und Lerneffekt. Ausserdem bedanke ich mich für Espresso und Matetee aus der Schnabeltasse.

Rudolf Koopmann, Du warst schuld daran, daß ich nach dem Cathepsin-Praktikum in der Arbeitsgruppe hängen geblieben bin, was wohl daran lag, das es einfach unglaublich Spaß gemacht hat. Danke.

Astrid Glatz, Dir danke ich von ganzem Herzen, daß Du immer zu mir gestanden und mich unterstützt hast und auch in schwierigen Zeiten für mich da warst. Danke, daß Du an so manchem langen Laborabend geduldig und verständnisvoll auf mich gewartet hast. Am meisten danke ich Dir jedoch für jene Tage, an denen Du mich von der Arbeit losgerissen und dafür gesorgt hast, daß ich das Wesentliche nicht aus den Augen verliere.

Waltraud und Harald Mogk, Euch gilt mein besonderer Dank. Dafür, daß ihr mich in allen Entscheidungen bezüglich meiner Schul- und Hochschulbildung bestärkt, meine gesamte Ausbildung ermöglicht und mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützt habt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.1	Phylogenetische Einordnung	1
1.1.2	Entwicklungszyklus von <i>T. brucei</i>	2
1.1.3	Epidemiologie	4
1.1.4	Pathogenese und Chemotherapie	5
1.1.5	Bedeutung für den Menschen	6
1.1.6	Morphologie und biochemische Besonderheiten	7
1.1.6.1	Morphologie	7
1.1.6.2	<i>variant surface glycoprotein</i> (VSG)	7
1.1.6.3	Polycistronische Transkription und <i>trans</i> -Spleißen	9
1.1.6.4	RNA <i>editing</i>	9
1.1.6.5	Energiestoffwechsel und Glykosomen	10
1.1.6.6	Trypanothion	11
1.2	Autophagie	11
1.3	RNA Interferenz	16
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Software	19
2.1.2	Laborgeräte	19
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	21
2.1.4.1	Stammlösungen	21
2.1.4.2	Medien und Puffer für <i>E. coli</i>	21
2.1.4.3	Medien und Puffer für <i>T. brucei</i>	22
2.1.4.4	Puffer für Gelelektrophorese	25
2.1.4.5	Puffer für <i>Northern blot</i>	25
2.1.4.6	Puffer für <i>Western blot</i>	26
2.1.4.7	Puffer für Elektronenmikroskopie	28
2.1.5	Enzyme	29
2.1.6	Kits	29
2.1.7	Primer	29
2.1.8	Stämme	32
2.1.8.1	<i>E. coli</i>	32
2.1.8.2	<i>T. brucei</i>	32
2.1.9	Chemikalien	32
2.2	Methoden	33

2.2.1	Softwarebasierte Recherche und Auswertung	33
2.2.1.1	Datenbankrecherche im Genom von <i>T.brucei</i>	33
2.2.1.2	<i>Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	33
2.2.1.3	Primerdesign mit <i>Primer3</i>	33
2.2.1.4	<i>RNAi target selection script (RNAit)</i>	33
2.2.1.5	Restriktionsvorhersagen <i>in silico</i>	33
2.2.1.6	Auswertung von Bandenintensitäten	33
2.2.2	Kulturführung von <i>E. coli</i>	34
2.2.2.1	Anzucht in Flüssigkultur	34
2.2.2.2	Anzucht auf Agarplatten	34
2.2.2.3	Herstellung von Stabilaten	34
2.2.3	DNA-Isolierung	34
2.2.3.1	Ethanolpräzipitation	34
2.2.3.2	Mini-Plasmidpräparation	35
2.2.3.3	Midi-Plasmidpräparation	35
2.2.3.4	PCR <i>purification</i>	35
2.2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.2.4	Molekularbiologische Techniken	36
2.2.4.1	Analyse mit Restriktionsendonukleasen	36
2.2.4.2	DNA-Gelelektrophorese	36
2.2.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose	36
2.2.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.2.4.5	<i>Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends with PCR</i>	38
2.2.4.6	Subklonierung	38
2.2.4.7	Ligationsreaktion	39
2.2.4.8	Herstellen chemisch kompetenter <i>XLI Blue</i> Zellen	39
2.2.4.9	Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.2.4.10	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten	40
2.2.5	Kulturführung von <i>T. brucei</i>	40
2.2.5.1	Anzucht und axenische Kultivierung der Blutformen	40
2.2.5.2	Transfektion und Selektion	41
2.2.5.3	Induktion	41
2.2.5.4	Herstellung von Kulturstabilaten	41
2.2.5.5	<i>Giemsa</i> -Färbung und Lichtmikroskopie	42
2.2.6	<i>Northern blot</i>	42
2.2.6.1	RNA-Isolierung	42
2.2.6.2	<i>Dot blot</i> Verfahren	42
2.2.6.3	RNA-Gelelektrophorese	42
2.2.6.4	Kapillar <i>blot</i>	43
2.2.6.5	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	43
2.2.6.6	Hybridisierung, Exposition und Entwicklung	43
2.2.7	<i>Western blot</i>	44
2.2.7.1	Proteinisolierung	44
2.2.7.2	SDS-PAGE	44
2.2.7.3	Transfer und <i>blotting</i>	44
2.2.8	Elektronenmikroskopie	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Klonierung	46

3.1.1	Sequenzanalysen von ATG8	46
3.1.2	Präparation des p2T7 RNAi Vektors	47
3.1.3	ATG8.1 A/B - ATG8.2 triple <i>knockdown</i>	49
3.1.4	ATG8.1 A/B double <i>knockdown</i>	57
3.1.5	ATG8.2 single <i>knockdown</i>	59
3.1.6	alpha-Tubulin <i>knockdown</i>	60
3.2	Transfektion von <i>T. brucei</i>	62
3.2.1	Plasmid-DNA und Zelllinie	62
3.2.2	Elektroporationssystem	63
3.2.3	Initiale Parameter	63
3.2.4	Anpassung der DNA-Menge	66
3.2.5	Anpassung der Hygromycin-Konzentration	67
3.2.6	Einsatz von <i>feeder</i> Trypanosomen	68
3.2.7	HMI-9 Medium	69
3.2.8	Prostaglandin F _{2α} supplementiertes BF-Medium	70
3.3	Sequenzanalyse der 5'- <i>untranslated regions</i>	72
3.3.1	<i>trans</i> -Spleißen und <i>spliced leader</i> Sequenz	72
3.3.2	Primer nichtidentischer Schmelztemperatur	72
3.3.3	Amplifikation von 300 bp Sonden	74
3.3.4	Verschachtelte PCR zur 5'- <i>UTR</i> -Längenbestimmung von ATG8.2	74
3.3.5	SL23se- und AS-Primer gleicher Smt für ATG8.1A und 1B	76
3.3.6	<i>Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends with PCR</i>	77
3.3.7	Sequenzierung und Integration der Ergebnisse	80
3.4	Charakterisierung der rekombinanten Klone	82
3.4.1	alpha-Tubulin	82
3.4.1.1	Optimierung der Induktionsparameter	82
3.4.1.2	Lichtmikroskopische Aufnahmen des <i>FAT</i> Phänotyps	83
3.4.2	ATG8 triple <i>knockdown</i>	84
3.4.2.1	<i>Northern dot blot screening</i>	84
3.4.2.2	Northern Blotting	85
3.4.2.3	Western Blotting	86
3.4.2.4	Wachstumskurven	87
3.4.2.5	Elektronenmikroskopie	88
4	Diskussion	89
5	Abstract	98
A	Appendix	100
A.1	Sequenzanalysen	100
A.1.1	ATG8.1A (Tb927.7.5900)	100
A.1.2	ATG8.1B (Tb927.7.5910)	100
A.1.3	ATG8.2 (Tb927.7.3320)	101
A.1.4	p2T7 RNAi Vektor	101
A.2	Sequenzierungsdaten	102
A.2.1	RNAi Vektoren	102
A.2.1.1	p2T7.ATG8.1-ATG8.2	102
A.2.1.2	p2T7.ATG8.1	103
A.2.1.3	p2T7.ATG8.2	103

A.2.1.4	p2T7.alpha-Tubulin	104
A.2.2	<i>5'-untranslated regions</i> (RACE-PCR)	104
A.2.2.1	ATG8.1A mRNA	104
A.2.2.2	ATG8.1B mRNA	105
A.2.2.3	ATG8.2 mRNA	105
A.2.3	Manuell ausgewertete Rohdaten	106
Literaturverzeichnis		111
Curriculum vitae		123

Abkürzungsverzeichnis

AS	<i>antisense</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AU	<i>arbitrary unit</i>
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonat
BF	Blutform der Trypanosomen
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ddH ₂ O	Aqua bidest., RNase-frei
dsRNA	doppelsträngige RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Glycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FBS	fetales Kälberserum
GE	Gelelektrophorese
GSH	Gluthation (reduzierte Form)
GSH(SPD)GSH	Trypanothion (reduzierte Form)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HYG	Hygromycin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IPS	impacts per second
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RT	reverse Transkriptase
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

<i>SE</i>	<i>sense</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SL</i>	spliced leader
SMB	<i>single marker bloodstream form</i>
SPD	Spermidin
SSC	<i>standard saline citrate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA
TDB	<i>trypanosome dilution buffer</i>
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TOR	<i>target of rapamycin</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 *Trypanosoma brucei*

1.1.1 Phylogenetische Einordnung

Trypanosomen gehören der Ordnung Kinetoplastea an. Die taxonomische Klassifizierung richtet sich nach morphologischen und biologischen Charakteristika. Die Kinetoplastea haben ein einziges großes Mitochondrium, in dem sich der sogenannte Kinetoplast befindet: eine große Menge an fibrillärer DNA (kDNA), der oft in enger Beziehung zur Basis der Geißel steht. Alle Angehörigen dieser Ordnung tragen in mindestens einem der Stadien ihres Lebenszyklus ein oder mehrere Flagellen. Je nach Anzahl der Flagellen leiten sich die Unterordnungen Trypanosomatida (ein Flagellum) und Bodonida (zwei Flagellen) ab. Während die Trypanosomatida selbst sowie die Gattungen *Leishmania*, *Phytomonas* und *Trypanosoma* als monophyletisch gelten, sind die anderen Gattungen vermutlich paraphyletisch. Die Gattung *Trypanosoma* gliedert sich in die beiden Gattungsgruppen *Salivaria* und *Stercoraria*. Die Klassifizierung richtet sich nach dem Vermehrungsort im Vektor und der Übertragungsart. Die Vervielfachung der *Salivaria*-Trypanosomen, die durch den Speichel übertragen werden, findet im vorderen Teil des Verdauungstraktes des Vektors statt. Zu ihnen gehören, neben der Art *T. brucei*, auch *T. congolense* und *T. vivax*, Erreger der Rinderseuche in Afrika, *T. evansi*, der Erreger der Surra und *T. equiperdum*, der die Kreuzlähme bei Pferden verursacht. Unterhalb der Art *T. brucei* werden drei Unterarten und weitere Gruppen ohne taxonomischen Rang unterschieden: *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense*. Die Parasiten der *Stercoraria*-Gruppe vermehren sich im Hinterdarm des Vektors und werden durch die Faeces übertragen. Zu den *Stercoraria* gehört *T. cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit in Mittel- und Südamerika, der durch die Raubwanze übertragen wird. Einige Kinetoplastiden, wie beispielsweise Crithidien, leben ausschließlich im Darm von Arthropoden und vollziehen keinen Wirtswech-

sel. Die Vermehrung ausschließlich in Insekten gilt als ursprünglich; der Wirtswechsel zwischen Insekten und Wirbeltieren ist innerhalb der Trypanosomatida vermutlich mehrmals entstanden.

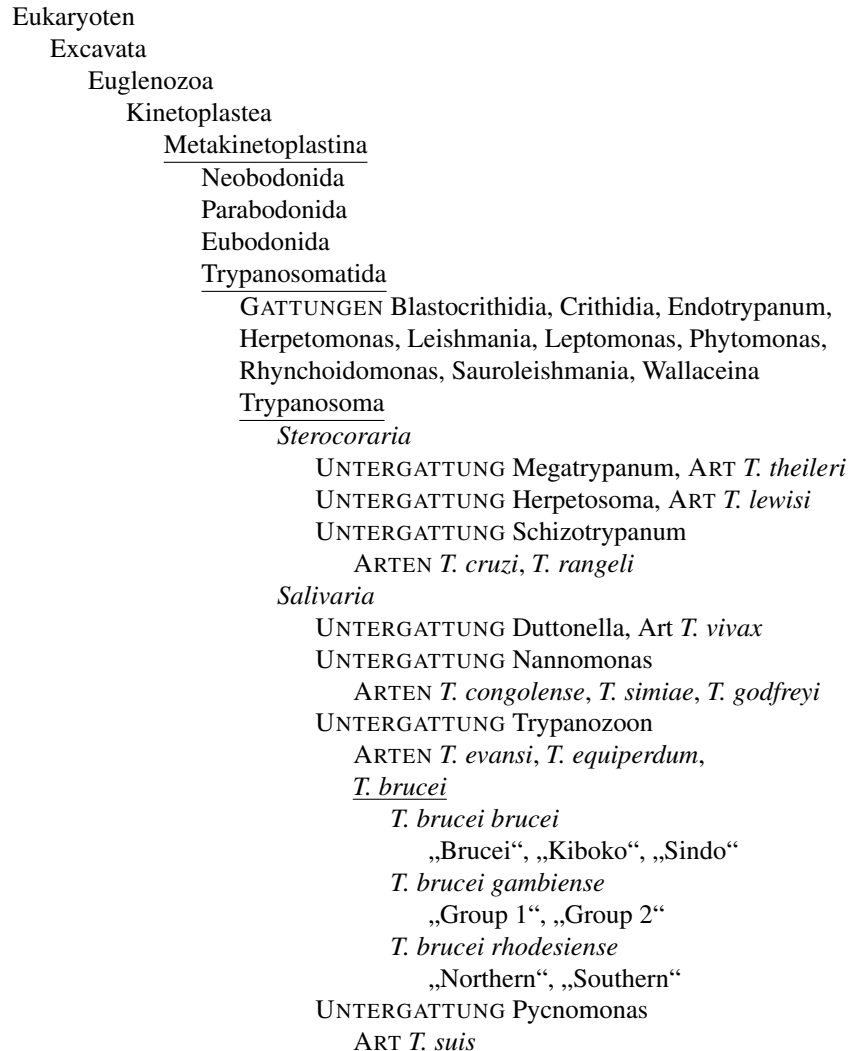


Abbildung 1.1: Taxonomische Einordnung von *T. brucei*

1.1.2 Entwicklungszyklus von *T. brucei*

Trypanosomen unterliegen einem sehr komplexen Lebenszyklus, der verschiedene Stadien beinhaltet. Um den Wirtswechsel von Fliege auf Säuger und umgekehrt zu bewerkstelligen, müssen sie sich an drei verschiedene Umgebungen anpassen: Den Blutkreislauf des Säugers, den Verdauungstrakt der Fliege und schließlich deren Speicheldrüse. Dabei erfahren das Mitochondrium und die Plasmamembran die größte Veränderung, aber auch insgesamt unterscheiden sich die verschiedenen Stadien in ihren zellbiologischen und biochemischen Eigenschaften sowie ihrer Morphologie. Während einer Blutmahlzeit einer infizierten Tsetse-Fliege gelangen etwa 20 000 Trypanosomen über den Spei-

chel der Fliege in den Körper des gebissenen Säugers. Im dermalen Bindegewebe der Einstichstelle kommt es zu einer lokalen Entzündung, dem sogenannten Schanker, dem ersten Symptom der Schlafkrankheit (Barry and Emery, 1984). Die Parasiten gelangen in das gesamte Lymph- und Blutkreislaufsystem. Dort wandeln sich die metazyklischen Parasiten in die proliferierende *long slender* Blutform um, die sich durch binäre Zellteilung vermehren. Dabei führen sie eine geschlossene Mitose durch (Duszenko, 1998). Im Gegensatz zur pro- bzw. metazyklischen Insektenform, welche eine voll funktionsfähige Atmungskette aufweist und hauptsächlich Prolin metabolisiert, besitzt die *long slender* Blutform ein stark zurückgebildetes Mitochondrium, das keines der für den Citratzyklus oder Atmungskette erforderlichen Enzyme enthält. Sie gewinnt ihre Energie ausschließlich aus der im Blut vorhandenen Glucose (Opperdoes and Borst, 1977) und ist verantwortlich für die wellenförmig verlaufende Parasitämie. Ist eine gewisse Zelldichte erreicht, differenziert die *long slender* Form über eine *intermediate* Form zu der im Zellzyklus arretierten *short stumpy* Form. *Short stumpy* Trypanosomen besitzen ein Mitochondrium mit tubulären Cristae, in dem Enzyme wie Pyruvat-Dehydrogenase, Prolinoxidase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase exprimiert werden (Flynn and Bowman, 1973). Insofern stellt die *short stumpy* Form ein Stadium dar, das für das Leben im Darmsystem der Tsetse-Fliege präadaptiert ist. Hier dient Prolin als einzige Energiequelle. Im Blut sind stets beide Formen enthalten, da nicht alle Trypanosomen differenzieren. Um dem Immunsystem des Wirts zu entkommen, exprimieren die Zellen regelmäßig neue VSG Varianten, welche die alte auf der Zelloberfläche ersetzen. In der letzten Phase der Infektion dringen die Trypanosomen über die Blut-Liquor-Schranke in das zentrale Nervensystem ein und lösen eine Meningoenzephalitis aus (Chimelli and Scaravilli, 1997). Die *long slender* Form produziert hauptsächlich $\text{PGF}_{2\alpha}$, das möglicherweise als Wachstumsfaktor fungiert (Kubata et al., 2000). Die *short stumpy* Form hingegen produziert überwiegend Prostaglandin D_2 , welches wie einige seiner Metabolite einen Apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod induziert (Figarella et al., 2006; Figarella et al., 2005). Wird diese also nicht innerhalb der nächsten 3-4 Tage von einer Tsetse-Fliege aufgenommen, stirbt sie ab (Tyler, 2003). Andernfalls entwickelt sich die nicht teilungsfähige, gedrungene *short stumpy* Form innerhalb von 48-72 h im Mitteldarm des Insekts zur prozyklischen Form. Diese weist eine hohe Teilungsrate auf und exprimiert statt VSG Procyclin als Hauptoberflächenprotein (Roditi and Schwarz, 1989). Nach einigen Tagen im Darm wandeln sich die Parasiten zur epimastigoten Form um und wandern anschließend durch das Proventrikulum in die Speicheldrüse (Glättli, 1988). Die epimastigote Form heftet sich an die Mikrovilli der Speicheldrüsen an und wandelt sich in die gedrungene, nicht proliferierende, metazyklische Form um, die erneut für den Säugerwirt infektiös ist. Ihr Oberflächenmantel besteht wiederum aus VSG.

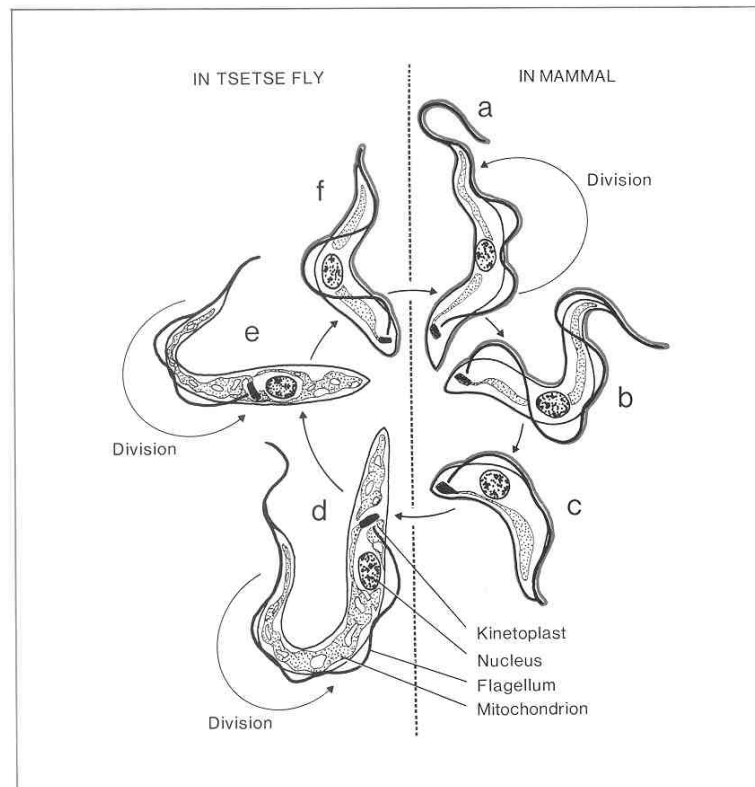


Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *T. brucei*. Eine infizierte Tsetse-Fliege injiziert Trypanosomen in Säugetiere während einer Blutmahlzeit. Die *long slender* Formen (a) vermehren sich über binäre Zellteilung. Mit zunehmender Parasitämie differenzieren sie in *intermediate* (b) und *short stumpy* Formen (c). Letztere sind zu einem erneuten Wirtswechsel in der Lage. Werden *short stumpy* Formen von einer Tsetse-Fliege aufgenommen, wandeln sie sich in deren Proboscis in die prozyklische Form (d) und teilen sich. Nach einigen Tagen wandern sie in die Speicheldrüse des Insekts. Dort liegen sie als epimastigote Form (e) vor und teilen sich erneut. Schließlich reifen sie zur metazyklischen Form (f), die einen weiteren Infektionszyklus beginnen können. (International Laboratory for Research on Animal Diseases, 1991)

1.1.3 Epidemiologie

Parasiten der *Trypanosoma brucei* Gruppe werden durch die Tsetse-Fliege (*Glossina sp.*) übertragen, welche weite Teile Afrikas besiedelt. Auch wenn die drei Arten dieser Gruppe morphologisch nicht zu unterscheiden sind, so variieren sie in ihrer Verbreitung, Wirtsspezifität und bevorzugtem Vektor. Die einzige für den Menschen ungefährliche Art ist wahrscheinlich zugleich die älteste und trägt den Namen *T. brucei brucei*. Normalerweise befällt dieser Parasit Antilopen oder andere in Afrika einheimische Wiederkäuer, ohne bei diesen Tieren Symptome hervorzurufen. Bei eingeführten Nutztieren wie Schafen, Ziegen, Kühen und Schweinen verursacht *T. brucei brucei* jedoch eine Krankheit, die als Nagana bezeichnet wird. So wirkt sich indirekt auch diese *Trypanosoma* Art auf das Leben der Menschen dieses Kontinents aus. Die eigentlichen Erreger der Schlafkrankheit werden in die westafrikanische Art *T. brucei gambiense* und in die ostafrikanische Art

T. brucei rhodesiense unterteilt. Seit 1896 gab es dort drei große Epidemien, die letzte nahm 1970 ihren Anfang und hält noch heute an. Nach Schätzungen der WHO im Jahre 1998 starben jährlich bis zu 40 000 Menschen an dieser Krankheit, wobei die Dunkelziffer vor allem aufgrund schlechter medizinischer Versorgung oder fehlender Diagnose auf 300 000 bis 500 000 Fälle geschätzt wurde. Inzwischen konnte die offizielle Sterberate aufgrund umfangreicher medizinischer Maßnahmen auf 20 000 und die geschätzte Erkrankungsrate auf 50 000 bis 70 000 Fälle pro Jahr reduziert werden (WHO, 2008). Dabei werden die mit Risiko behafteten Länder in vier verschiedene Gruppen aufgeteilt: I. Länder mit hoher Prävalenz, II. Länder mit mittlerer Prävalenz, III. Länder von geringem endemischen Level und IV. Länder von unklarem Status. In Angola, dem Kongo und dem Sudan steht die Schlafkrankheit als Todesursache an erster Stelle. *T. brucei gambiense* wird vor allem von Glossinen der Palpalisgruppe übertragen, welche bevorzugt wasserreiche Gegenden und Uferwälder West- und Zentralafrikas besiedeln. Diese Form der Schlafkrankheit wird als chronisch bezeichnet, da die letzte Krankheitsphase erst nach Jahren auftreten kann. Die ostafrikanische Art *T. brucei rhodesiense* hingegen ist Ursache für die so genannte akute Form. Ihr dienen vor allem Glossinen der Morsitansgruppe, deren Reservoir eher Trockenbuschwälder bilden, als Vektoren. Der Krankheitsverlauf ist analog zu der westafrikanischen Form, geht jedoch schon nach einigen Wochen in das Endstadium über, häufig mit Herzversagen als Todesursache.

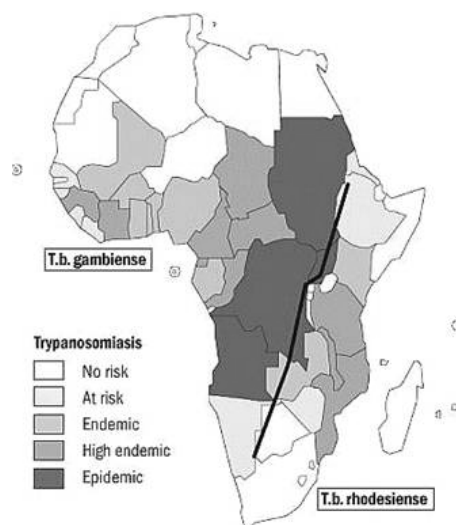


Abbildung 1.3: Verbreitung von *T. brucei* in Afrika (WHO, 2008)

1.1.4 Pathogenese und Chemotherapie

Die Schlafkrankheit verläuft in drei Stadien. Wird sie früh erkannt, ist die Prognose vor allem bei der westafrikanischen Art gut. Allerdings sind die ersten Symptome sehr unspezifisch, so daß die richtige Diagnose oft zu spät erfolgt. Nachdem die Tsetse-Fliege bei ihrer Blutmahlzeit die Parasiten durch die Einstichstelle auf den Wirt übertragen hat, ent-

wickelt sich dort temporär eine kleine weiche, gerötete Schwellung, die auch als “Trypanosomenschanter” bezeichnet wird. Gleichzeitig verteilen sich die Trypanosomen auf die Blut- und Lymphbahnen. Dies kann ca. 2 Wochen dauern (Phase I). Von nun an vermehren sich die Erreger stark und dringen in fast alle Organe vor, was unter anderem eine starke Vergrößerung von Milz und Leber zur Folge hat. Neben starkem Gewichtsverlust leiden die Patienten an Schwellung der Lymphknoten im Nackenbereich (“Winterbottom’s sign”) und phasenweise auftretendem Fieber, oft begleitet von einem juckenden Hautausschlag (Phase II). Nach mehreren Monaten überquert *T. brucei gambiense* die Blut-Hirn-Schranke und leitet somit Phase III des Krankheitsverlaufs ein. Durch den Befall des zentralen Nervensystems entstehen Kopfschmerzen, Ausfallerscheinungen, Sprach-, Gang- und Koordinationsstörungen. Zudem leiden die Patienten tagsüber an Apathie und nachts an Asomnie. Die durch eine Störung des Schlaf-Wachrhythmus verursachten Symptome gaben der Krankheit ihren Namen. Schließlich fallen die Patienten ins Koma. Aufgrund von Mangelernährung oder Sekundärinfektionen nimmt die Krankheit in der Regel einen tödlichen Verlauf, wenn sie unbehandelt bleibt. Bis heute gibt es nur wenige Medikamente, die zur Bekämpfung der Schlafkrankheit einsetzbar sind, und die auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe sind zum großen Teil selbst äußerst toxisch. Das Antiprotozoikum Suramin ist heute Mittel der Wahl im frühen Stadium von *T. brucei rhodesiense* Infektionen. Bei der westafrikanischen Trypanosomiasis hingegen wird Pentamidin zur Behandlung bevorzugt. Haben die Parasiten jedoch die Blut-Hirn-Schranke überschritten, so sind diese Stoffe nicht mehr wirksam. Die Arsenverbindung Melarsoprol war lange das einzige Medikament, das auch in Phase II und III der Krankheit einsetzbar war. Allerdings sterben aufgrund der hohen Toxizität bis zu 10% der Patienten an den damit verbundenen Nebenwirkungen. Durch Zufall wurde 1985 die trypanozide Wirkung von Eflornithin entdeckt, das wesentlich besser verträglich war als Melarsoprol. Diese Substanz wirkt als Inhibitor der Ornithindecaboxylase, die eine wichtige Rolle im Polyaminstoffwechsel der Trypanosomen spielt.

1.1.5 Bedeutung für den Menschen

Die Afrikanische Trypanosomiasis stellt nach wie vor ein großes Problem für die Menschen und Nutztiere des heutigen Afrika dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2008) sind über 60 Millionen Menschen in 36 Ländern südlich der Sahara direkt bedroht. Ein weiteres großes Problem aus volkswirtschaftlicher Sicht liegt in der durch bestimmte Trypanosomenstämme verursachten Viehseuche Nagana. Nach Informationen der Welternährungsorganisation (FAO, 2008) sterben jährlich 3 Millionen Rinder an Nagana mit einem volkswirtschaftlichen Schaden von 4.75 Milliarden US-Dollar. Die enormen Entwicklungs- und Produktionskosten von trypanoziden Medikamenten, sowie die notwendigen hohen therapeutischen Dosen, führen zu Behandlungskosten von ca. 700 US-\$ pro Patient. Dies ist in den Endemiegebieten Afrikas für die betroffenen Menschen

unerschwinglich. Da für die Pharmakonzerne die Bekämpfung der Schlafkrankheit wirtschaftlich nicht interessant ist, findet ein Großteil der Forschung im akademischen Bereich statt, wo die Mittel allerdings bei weitem nicht ausreichen. Man geht davon aus, daß weltweit nur 10% des Forschungsaufwandes in die Erforschung von Krankheiten investiert wird, die 90% der globalen Krankheitslast ausmachen (AOG, 2008). Die Schlafkrankheit ist damit eine der wichtigsten Erkrankungen in der Gruppe der vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*).

1.1.6 Morphologie und biochemische Besonderheiten

1.1.6.1 Morphologie

Trypanosomen sind einzellige Parasiten, deren äußere Gestalt durch parallel verlaufende Mikrotubuli stabilisiert wird. Gebildet wird dieses Zytoskelett aus sechs Tubulin-Arten, von denen δ - und ϵ -Tubulin im Basalkörperchen und Flagellum vorkommen (Berriman et al., 2005). Bei den Blutformen ist die Zellmembran zusätzlich von einem Mantel aus *variant surface glycoprotein* (VSG) umgeben, das gegen Prozyklin ausgetauscht wird, sobald sie sich zu prozyklischen Formen entwickeln. Verankert sind beide Oberflächenmoleküle durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker. Im Laufe des Entwicklungszyklus treten bei *Trypanosoma brucei* sowohl trypomastigote als auch epimastigote Formen auf. Diese Einteilung erfolgt nach der Lage des Flagellumursprungs. Durch den Basalapparat ist das Flagellum im Cytoplasma verankert, durchläuft dann die Flagellumtasche und ein Stück an der äußeren Zellmembran entlang. Bei der Fortbewegung entsteht so der Eindruck einer undulierenden Membran. Aufgebaut ist das Flagellum aus einem Netzwerk von Filamenten, die entlang des Axonems (aus dem typischen $9 \times 2 + 2$ Mikrotubulisystem) läuft. Die Flagellumtasche ist der einzige Ort der Endo- und Exozytose und daher von *coated vesicles* umgeben, die bei Blutformen z.B. VSG nach außen transportieren und wieder aufnehmen. Auf diesem Wege internalisieren und degradieren die Parasiten aber auch Antikörper des Wirts (Morgan et al., 2002a; Morgan et al., 2002b). Stets in der Nähe des Basalapparates befindet sich der Kinetoplast, ein Bereich ineinander verflochtener mitochondrialer DNA-Ringe, den *maxi-* und *minicircles*. Das Mitochondrium selbst erstreckt sich durch die ganze Zelle und besitzt bei den Blutformen wenige, bei den prozyklischen Formen sehr viele Cristae. Neben den für Eukaryonten typischen Strukturen wie Golgi-Apparat, rauem ER und Lysosomen, besitzen Trypanosomen zudem spezielle peroxisomale Organellen, die Glykosomen. In diesen läuft der größte Teil der Glykolyse ab, der Hauptstoffwechselweg der Blutformen. Wichtige Calcium-Speicher stellen die Acidocalcisomen dar, die bei Erhöhung des pH-Wertes Ca^{2+} ins Cytosol freisetzen (Vercesi et al., 1997).

1.1.6.2 *variant surface glycoprotein* (VSG)

Bereits Ende der 60er Jahre wurde der erste experimentelle Hinweis auf eine protektive Proteinhülle bei Trypanosomen gefunden (Vickerman, 1965). Um sich vor dem Immun-

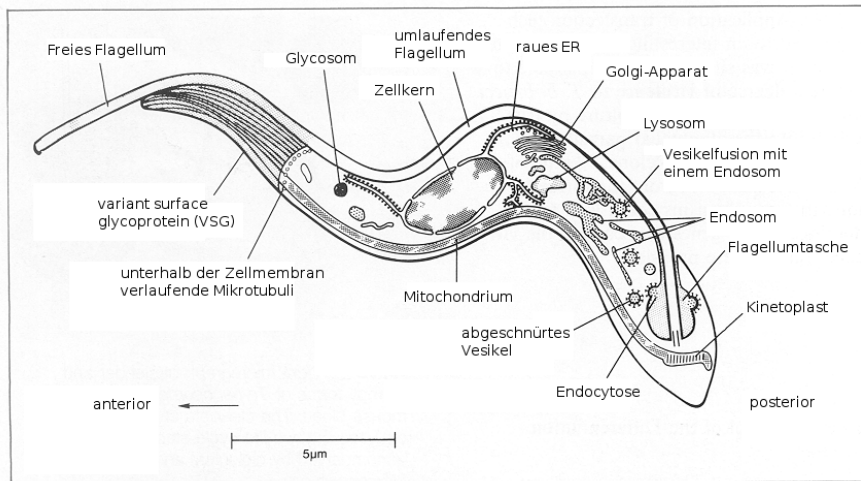


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der *intermediate* Blutform von *T. brucei* (International Laboratory for Research on Animal Diseases, 1991)

system des Säugerwirts zu schützen, besitzen die Blutformen der Trypanosomen einen dichten Oberflächenmantel aus ca. 10^7 Molekülen eines ca. 60 kDa großen Proteins, dem *variant surface glycoprotein* (VSG). Das VSG bildet eine einheitliche, ca. 15 nm dicke Schicht, die elektronenmikroskopisch sichtbar ist und das einzige von aussen zugängliche Antigen des Parasiten darstellt (Cross, 1975). Gegen die immunogenen Proteine werden vom Wirt Antikörper gebildet, was zum größten Teil zur Abtötung der Parasitenpopulation führt. Einige Trypanosomen exprimieren zu dieser Zeit aber bereits eine andere VSG-Variante, die vom Immunsystem noch nicht erkannt wurde und können so die Population wieder regenerieren. Auf diese Weise kommt es zum typischen wellenförmigen Verlauf der Parasitämie (Ross et al., 1991). Außerdem wird das VSG-Repertoire der Trypanosomen, durch fehlerhafte genetische Rekombination, ständig erweitert. Der Mechanismus des sogenannten *antigenic switching* besteht in der Aktivierung eines stillen VSG-Gens, wobei das zu diesem Zeitpunkt aktive Gen gleichzeitig inaktiviert wird. Dies kann z.B. durch Rekombinationsprozesse erfolgen, bei denen ein bis zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiertes Gen in eine telomerständige VSG *expression site* transloziert und in der Folge transkribiert wird (Borst and Ulbert, 2001). Das antigenic switching tritt spontan, d.h. unabhängig von der Immunantwort des Wirts auf, und zwar in Intervallen von etwa 10^{-6} pro Generation bei monomorphen und bis zu 10^{-2} pro Generation bei pleomorphen Stämmen (Lamont et al., 1986). Die jeweilige antigene Determinante wird von dem nach außen gerichteten Aminoterminus bestimmt, der den variablen Teil der unterschiedlichen VSG-Moleküle darstellt. Dagegen bildet der Carboxyterminus, der etwa ein Drittel des Gesamtmoleküls ausmacht, den in allen VSG-Varianten konservierten Anteil des Proteins. Über diesen ist das VSG-Molekül als Homodimer über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker in der Plasmamembran befestigt. Röntgenstrukturanalysen der Kristalle von verschiedenen VSG-Varianten wiesen die Gemeinsamkeit auf, das

die Oberfläche der Trypanosomen durch das Protein jeweils dicht bedeckt ist (Freyman et al., 1984). Eine weitere Gemeinsamkeit aller VSG-Varianten ist die Anwesenheit von N-Glykanen. Bei den prozyklischen Insektenformen von *Trypanosoma brucei* findet man keinen Oberflächenmantel aus VSG-Molekülen, stattdessen eine Expression des plasmamembranständigen Procyclin (Roditi and Clayton, 1999), welches den nötigen Schutz vor dem Verdauungssystem der Tsetse-Fliege bietet.

1.1.6.3 Polycistronische Transkription und *trans*-Spleißen

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, die einen spezifischen Chromosomensatz besitzen, existieren im Nucleus von *T. brucei* 11 Megabasen-Chromosomen und eine unspezifische Anzahl von *intermediate-sized* Chromosomen von 30-700 kb. Im Jahre 2005 ist es gelungen, das auf den 11 Megabasen-Chromosomen lokalisierte Genom zu entschlüsseln (Berriman et al., 2005), welches insgesamt 26 Megabasen umfasst. Dabei tragen beide DNA-Stränge einander nicht überlappende *gene cluster* (El-Sayed et al., 2003; Hall et al., 2003). Kodiert sind insgesamt 9068 Gene, die, ähnlich wie in Prokaryoten, polycistronisch angeordnet sind. Aus den entstehenden Transkripten werden einzelne Gene durch *trans*-Spleißen freigesetzt. Alle trypanosomalen mRNAs beginnen 5'-terminal mit einer gemeinsamen, 35 Nukleotide umfassenden Sequenz, dem "Spliced Leader" (Parsons et al., 1984) (5'-AACGCTATTA TTAGAACAGT TTCTGTACTA TATTG). Innerhalb eines speziellen Spliceosoms, dessen U1-snRNP durch den SL-snRNP ersetzt ist, werden die ausgespleissten Transkripte auf die Spliced-Leader-Sequenz übertragen. Das SL-snRNP selbst wird bei dieser Reaktion verbraucht (Abbildung 1.5). Als einzige Ausnahme wurde bisher das Gen der Poly-A-Polymerase beschrieben, das ein klassisches *cis*-Intron beinhaltet und durch U1-snRNP prozessiert wird.

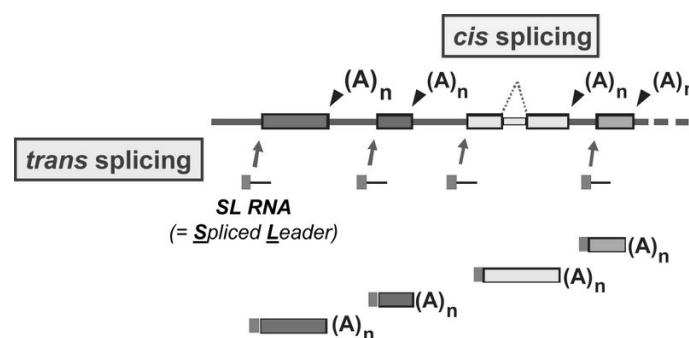


Abbildung 1.5: Spleißvorgänge finden bei Kinetoplastiden, Nematoden und *Ciona intestinalis* *in trans* statt. (Wikipedia, 2008)

1.1.6.4 RNA editing

In den späten 80er Jahren mußte das zentrale Dogma der Molekularbiologie, das den genetischen Informationstransfer von der Basenfolge der DNA zur dreidimensionalen

Struktur der Proteine beschreibt, um den Begriff des RNA *editing* erweitert werden (Benne et al., 1986). Hiermit werden enzymatisch katalysierte Reaktionen zusammengefasst, die post-transkriptional den Informationsgehalt von RNA-Molekülen modifizieren. Zuerst wurde dieser Vorgang in *T. brucei* Arten beschrieben, deren reife mRNA nicht komplementär zu den codierenden Sequenzen kinetoplastider *maxicircles* waren, sondern davon durch präzise Uridyl-Insertionen und Deletionen abwichen. Diese Modifikationen werden durch das Anlagern komplementärer, auf den *minicircles* codierter *guide* RNA gesteuert. Der Editierungsprozess wird folglich durch deren Transkriptionslevel reguliert. Die Modifizierung der mRNA beginnt 3'-terminal, wodurch jede vorherige *guide* RNA die Ankersequenz der Folgenden kodiert und ein sequentielles Vorrücken ermöglicht wird (Sloof and Benne, 1997). Neben den mRNA-Uridylmodifikationen kommt in Trypanosomen ein weiterer Editierungsmechanismus an tRNA vor, der über die hydrolytische Desaminierung eines Cytidin zu einem Uracil die Anticodonspezifität der tRNA verändert (Kapushoc et al., 2000).

1.1.6.5 Energiestoffwechsel und Glykosomen

Glykosomen sind mit den Peroxisomen höherer Eukaryonten und pflanzlichen Glyoxysomen verwandte Organellen. Wie diese besitzen sie eine Membran und keine eigene DNA. Aufbau und Signalpeptide scheinen ähnlich zu den Peroxisomen zu sein (Parsons et al., 2001). Viele glykosomale Proteine besitzen die typische *peroxisomal targeting sequence 1* (PTS-1) am C-Terminus, die auch hier zur Lokalisierung notwendig ist (Sommer et al., 1992). Ist die Glykolyse in höheren Eukaryonten im Cytosol lokalisiert, so läuft sie bei den Kinetoplastiden in den Glykosomen ab. Allerdings gelangt weder ATP noch NAD durch die Glykosomenmembran. Die Energie aus der Glykolyse beziehen die Parasiten so ausschließlich durch die letzten Schritte (Umwandlung des 3-Phosphoglycerats zu Pyruvat), die im Cytosol ablaufen (Duszenko, 1998). Somit ist die Energiebilanz innerhalb des Glycosoms ausgeglichen. Das Endprodukt Pyruvat wird über einen Transporter aus der Zelle ins Medium abgegeben und stellt somit ein direktes Maß für die glykolytische Aktivität von Blutform-Trypanosomen dar. Die Kompartimentierung der Glykolyse stellt eine Variante der Regulation dar, da die typischerweise regulierbaren Enzyme dieses Stoffwechselweges diese Eigenschaft in Trypanosomen nicht besitzen (Opperdoes and Borst, 1977). Um das in der GAPDH-Reaktion im Glycosom entstehende NADH zu regenerieren, benutzen die Parasiten ein besonderes *shuttle* System: Das in der Aldolase-reaktion entstehende Dihydroxyacetonphosphat wird zunächst im Glycosom durch die Glycerinphosphat-Dehydrogenase unter NAD-Bildung zu Glycerin-3-Phosphat reduziert, aus dem Glycosom zum Mitochondrium transportiert, wo es durch die trypanosomale Alternative Oxidase (TAO) zu Dihydroxyacetonphosphat reoxidiert wird. Als Elektronenakzeptor fungiert molekularer Sauerstoff, wodurch auch im Medium von Blutform-Trypanosomen, trotz der nicht vorhandenen Atmungskette, ein erheblicher Sauerstoffverbrauch nachweisbar und essentiell ist (Clarkson et al., 1989). Da in dem zurückgebildeten

Mitochondrium der BF-Trypanosomen weder der Citratzyklus noch die Atmungskette ablaufen, stellt die Glycolyse die einzige energieliefernde Reaktionskette dar. Daher ist ein extrem hoher Glucosedurchsatz notwendig, den die Trypanosomen mithilfe dieses Kompartiments vollziehen. Glycosomen können wie Peroxisomen und Glyoxisomen zu den *microbodies* gezählt werden, da sie neben der praktisch identischen Erscheinungsform auch einen ähnlichen Satz an Enzymen besitzen (z.B. Katalase in Crithidien, Enzyme für die β -Oxidation von Fettsäuren in *Trypanosoma brucei*). Desweiteren weisen sie im Saccharosegradienten die gleiche Dichte wie Peroxisomen und Glyoxisomen auf (Borst, 1986).

1.1.6.6 Trypanothion

Die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts ist für jede Zelle von hoher Bedeutung. Höhere Eukaryonten besitzen dafür das Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin), das vor allem zur Beseitigung freier Radikale (über die Glutathion-Peroxidase), zum antioxidativen Schutz von Cysteinresten von Proteinen, als Konjugatbildner während der Biotransformation und für verschiedene biosynthetische Reaktionen (z.B. Peptidoleukotriene) verwendet wird. Trypanosomen besitzen keine Katalase und keine selenhaltige Glutathion-Peroxidase. Etwa 70% ihres Glutathions wird in Trypanothion umgewandelt (Fairlamb and Cerami, 1992). Es ist der essentielle Redox-Mediator in Crithidia, Leishmania und Trypanosoma (Fairlamb et al., 1985) und besteht aus zwei Molekülen Glutathion, die über das Polyamin Spermidin miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus spielt es eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Redoxverhältnisse und trägt über die Trypanothion-Peroxidase direkt zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies bei (Keiser et al., 2001). Trypanothion wird *de novo* aus Spermidin, Glutathion und ATP synthetisiert (Koenig et al., 1997). Außerdem ist der charakteristische Polyaminstoffwechsel der Kinetoplastiden für die Biosynthese von Trypanothion essentiell. Herunterregulation der Trypanothion-Reduktase in *Trypanosoma brucei* führt zu einer Zunahme der Wasserstoffperoxidempfindlichkeit, Verlust der Virulenz und zum Arrest der Proliferation (Dumas et al., 1997).

1.2 Autophagie

Eukaryotischen Zellen steht mit den Lysosomen ein Kompartiment zum hydrolytischen Abbau von nicht mehr benötigtem Zellmaterial oder endozytierten Substanzen zur Verfügung. Gleichzeitig ermöglichen sie die Wiederverwertung von chemischen Grundbaustoffen wie Aminosäuren, Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinbasen. Im einfachsten Fall handelt es sich dabei um einen unspezifischen Prozess, der einen kontinuierlichen Umsatz von Biomolekülen ermöglicht. Komplexere Formen des lysosomalen Abbaus zur Nährstoffversorgung umfassen die Lysosomenfusion mit Phagosomen oder, nach der Rezeptorvermittelten Endozytose, mit Endosomen. Ferner dienen Lysosomen der intrazellulären

Abwehr, indem sie intrazelluläre Bakterien oder Viren zersetzen (Kirkegaard et al., 2004). Die verschiedenen Formen der Autophagie sind vergleichsweise spezifisch und hoch reguliert. So werden beispielsweise bei unzureichendem Nährstoffangebot nicht-essentielle Zellbestandteile selbstverdaut, um das Überleben der Zellen zu ermöglichen. Hierzu werden ausreichend vorhandene Organellen von sogenannten präautophagischen Strukturen umschlossen. Dabei handelt es sich vermutlich um Membranen endoplasmatisch-retikulären Ursprungs. Die so entstandenen Vesikel fusionieren mit Lysosomen zu Autophagosomen. Sobald Nährstoffe wieder in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, können fehlende Organellen resynthetisiert werden. Anderenfalls begehen betroffene Zellen in altruistischer Weise einen programmierten Zelltod (PCD), und lösen sich geordnet in vesikuläre Strukturen auf (*blebbing*). Damit erhöht sich das lokale Nährstoffangebot für benachbarte Zellen. Diese Form der Autophagie wird PCD Typ II genannt (Levine and Yuan, 2005; Maiuri et al., 2007). Auch im Rahmen der Anpassung an diskontinuierliche Umgebungsbedingungen steht mit der Autophagie ein geeigneter Mechanismus zur Verfügung, um obsolete Organellen zu entfernen. Dasselbe gilt während der Differenzierung. Spezielle Varianten der Autophagie umfassen den Abbau von Peroxisomen (Pexophagie) und von Mitochondrien (Mitophagie) (Dunn et al., 2005; Mijaljica et al., 2007). Zusammenfassend ist Autophagie ein verbreiteter und unentbehrlicher Mechanismus bei Differenzierungen, Stress, oder während Hungerphasen. Die zahlreichen Konditionen, die zum Auftreten von Autophagie führen, bedingen eine komplexe Regulation mit einer Fülle involvierter Faktoren und Wechselwirkungen (Codogno and Meijer, 2005; Yorimitsu and Klionsky, 2005). Bei bioinformatischen Untersuchungen wurde nur eine begrenzte Anzahl von Autophagie-relevanten Genen in *T. brucei* identifiziert. Da die Ordnung der Kinetoplastea zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution entstanden ist, besteht die Möglichkeit, daß die zur Autophagie führenden Signalwege in ihrer ursprünglichen und wenig komplexen Form konserviert wurden (Denninger et al., 2008).

Makroautophagie bezeichnet den Einschluss von Zellbestandteilen in ein von einer Doppelmembran umgebenes Vesikel, dem sogenannten Autophagosom. Dieses entsteht aus präautophagischen Membranstrukturen, die vermutlich *de novo* synthetisiert werden. Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert daraufhin mit einem Lysosom. Mikroautophagie bezeichnet hingegen den Einschluss von zytosolischen Bestandteilen direkt durch das Lysosom, formal analog zu endozytotischen Prozessen. In beiden Fällen endet das abzubauen Material noch membranumschlossen im Lysosom, um dort degradiert zu werden. Die dritte Art der Autophagie ist die Chaperon-vermittelte Autophagie, die bisher nur in Säugern beschrieben wurde und eine sekundäre Antwort auf das Aushungern von Zellen ist. Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Arten, ist hier eine direkte Translokation der Proteine über die Lysosomenmembran beteiligt.

Die Entstehung der autophagosomalen Strukturen ist von zwei Proteinkonjugationssystemen abhängig, die von autophagischen Proteinen (*autophagy-related genes*, ATG) ge-

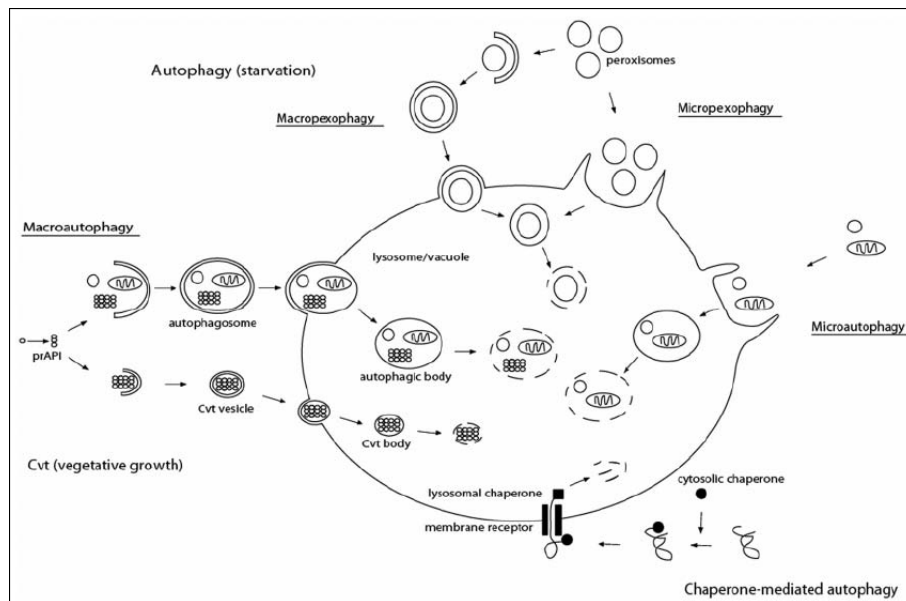


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung von Autophagie und verwandten Prozessen, die am Transport von Proteinen, Proteinkomplexen und Organellen (Peroxisomen, Mitochondrien) zu Lysosomen (oder Vakuolen) beteiligt sind. Der *cytoplasm-to-vacuole* (Cvt) Weg wurde bislang nur in *S. cerevisiae* beschrieben; der Chaperon-vermittelte Weg nur in Säugerzellen (Herman et al., 2006)

bildet werden. Zwei Ubiquitin-ähnliche Systeme spielen dabei eine besondere Rolle in der Entstehung von Autophagosomen (Ohsumi and Mizushima, 2004). Das erste ist das ATG12 System, wobei das Ubiquitin-ähnliche ATG12 auf ATG5 übertragen wird. Vermittelt wird dieser Prozess von ATG7, einem E1 (*ubiquitin activating enzyme*)-ähnlichen Enzym und von ATG10, einem E2 (*ubiquitin conjugating enzyme*)-ähnlichen Enzym. Das ATG12-ATG5 Konjugat bildet mit ATG16 einen Komplex (Kuma et al., 2002), der vermutlich auf der Membran einen Belag bildet und die Formation der sich abschnürenden Vesikel unterstützt. Das zweite Ubiquitin-ähnliche Protein, ATG8, ist ebenfalls an der Entstehung von Autophagosomen beteiligt (Abbildung 1.7). ATG8 wird proteolytisch von ATG4 (*autophagin*) prozessiert, so daß C-terminal ein Glycinrest exponiert wird. Hierüber wird ATG8 an Phosphatidylethanolamin konjugiert, unter Beteiligung von ATG7 und ATG3, ebenfalls einem E2-ähnlichen Enzym (Ichimura et al., 2000). Dadurch wird das zuvor zytosolische ATG8 an Membranen assoziiert. Bevor das Autophagosom mit dem Lysosom fusioniert, wird ATG8 durch ATG4 abgespalten und kann wiederverwendet werden (Kirisako et al., 2000). Das Genom von *T. cruzi* enthält alle wesentlichen Komponenten des ATG8 Systems (ATG3, ATG4, ATG7, ATG8), während die Hauptbestandteile des ATG12 Systems nicht vorhanden sind (ATG5, ATG10, ATG12) (Alvarez et al., 2008). Zu ATG8 selbst wurden zwei Orthologe in *T. cruzi* identifiziert. Im Gegensatz zu TcATG8.1 kann TcATG8.2 kein ATG8 in *Saccharomyces cerevisiae* substituieren, so daß dessen Funktion noch unklar ist. Auch in *T. brucei* wurden bisher keine Orthologe des ATG12 Systems nachgewiesen. Jedoch enthält das Genom drei potentielle

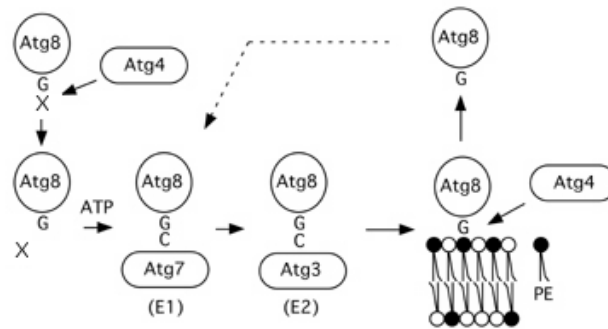


Abbildung 1.7: Konjugation von ATG8 an Phosphatidylethanolamin (Ohsumi et al., 2004)

ATG8-Orthologe (TbATG8.1A, TbATG8.1B und TbATG8.2), sowie Orthologe zu ATG3, ATG4 und ATG7 (Herman et al., 2006). Darüber hinaus verfügt *T. brucei* über weitere Schlüsselproteine der Autophagie (Abbildung 1.8). Zu Beginn der Signalkaskade steht die PI₃ Kinase TOR (*target of rapamycin*), die das Zellwachstum mit der Verfügbarkeit von Energie und Nährstoffen koordiniert. Physiologisch wird TOR dabei z.B. von der AMP-aktivierten Proteinkinase bei Energiemangel indirekt gehemmt, oder als Reaktion auf eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren durch die Proteinkinase B indirekt aktiviert. Damit wirkt TOR entgegengesetzt zu FOXO. Das Makrolidantibiotikum Rapamycin aus *Streptomyces hygroscopicus* kann in einem Komplex mit FKBP (*FK506 binding protein*) an TOR binden. Dabei wird TOR inhibiert und der Zelle ein Nährstoffmangel suggeriert, mit weitreichenden Folgen wie Arrest des Zellzyklus und Initiierung der Autophagie.

Physiologisch tritt Autophagie in *T. brucei* während der Differenzierung auf. Gerade bei Kinetoplastiden wird jeder Differenzierungsschritt von tiefgreifenden morphologischen und metabolischen Veränderungen begleitet, um eine optimale Anpassung an die unterschiedlichen Wirte zu erreichen. Beispielsweise benötigen Blutformen Glykosomen zur Energiegewinnung, während prozyklische Formen ihre Energie über Citratzyklus und Atmungskette gewinnen. Vermutlich werden beim Übergang von *long slender* zu *short stumpy* Blutformen, sowie der darauf folgenden Differenzierung zur Insektenform Glykosomen autophagisch abgebaut und durch neu gebildete ersetzt. Dieser Vorgang wird auch als Glykophagie bezeichnet (Rigden et al., 2005; Herman et al., 2008). Experimentell kann Autophagie induziert werden durch Aushungern (1-3 h) in Aminosäure-freiem *trypanosome dilution buffer* (TDB), mit Rapamycin, H₂O₂ oder Dihydroxyaceton. Wasserstoffperoxid wird in Blutformen unter Stressbedingungen und bei Prostaglandin D₂-induzierter Apoptose gebildet (Figarella et al., 2006). Bei Zugabe von H₂O₂ zum Medium überwiegen jedoch andere, membranschädigende Effekte. Dabei versuchen die Zellen, Defekte mittels Autophagie zu beheben. Dihydroxyaceton gelangt durch Aquaglyceropore in das Zytoplasma (Uzcategui et al., 2004). Da Dihydroxyacetonphosphat ein Intermediat der Glycolyse ist, kann Dihydroxyaceton als Kohlenstoffquelle von der Glycerolkinase in den Energiestoffwechsel eingeschleust werden. Allerdings führen größere Mengen zu

einem Zellzyklusarrest in der G₂-Phase und zu Autophagie, erhöhter Membranpermeabilität und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. All dies zeigt, daß Autophagie kein solitärer Vorgang ist, sondern eng mit Apoptose und Nekrose verknüpft ist.

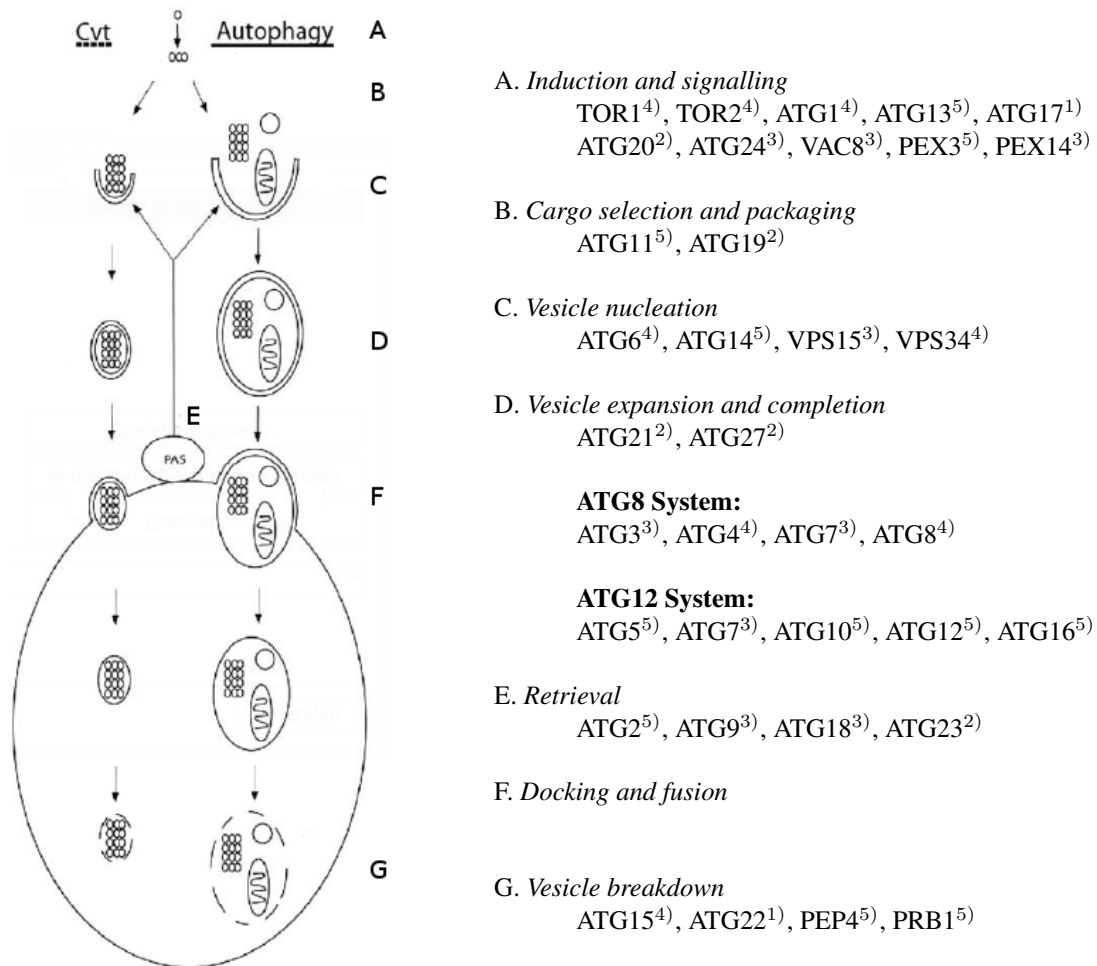


Abbildung 1.8: Darstellung der wichtigsten Proteine, die am *cytoplasm-to-vacuole* und Autophagie Weg in *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt sind, und ihrer potentiellen Orthologe in Trypanosomatiden (Herman et al., 2006). Erläuterungen: 1) Proteine sind spezifisch für Autophagie in Hefen. 2) Proteine sind spezifisch für den *cytoplasm-to-vacuole* Transport in Hefen. 3) Bei Genvergleichen wurde mindestens ein Ortholog in Trypanosomatid-Datenbanken gefunden. 4) Es ist wahrscheinlich, daß Orthologe in Trypanosomatiden existieren. 5) Es wurden bisher keine Orthologe gefunden.

1.3 RNA Interferenz

RNA Interferenz beschreibt einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Expression einzelner Gene hemmt, z.B. zum Zweck der Genregulation oder auch zur Abwehr von RNA-Viren. Da die Transkription selbst nicht abgeschaltet wird, jedoch bereits produzierte und neu entstehende mRNA rasch und selektiv abgebaut wird, spricht man auch von post-transkriptionellem *gene silencing*. Beim Vorgang der RNA Interferenz ist stets RNA als zielerkennendes Molekül beteiligt. Dabei kann es sich um *micro* RNA handeln, die auf eigenen pri-miRNA-Genen codiert wird, oder um *small interfering* RNA (siRNA), die aus längerer freier dsRNA entsteht. Diese kann beispielsweise viraler Herkunft sein, oder im Rahmen biochemischer Forschung vom Experimentator in die Zellen eingeschleust werden. Die dsRNA (oder *hairpin* RNA) wird von der Typ-III-Ribonuklease Dicer zu einer 21 bp dsRNA geschnitten. Das Enzym Dicer ist ein Protein, das zwei RNase-III-Domänen, eine PAZ-Domäne, eine dsRNA-Bindestelle und eine Helicase-Domäne besitzt. Es liegt in der Zelle assoziiert mit Proteinen der *argonaute* Familie vor, die wichtige Funktionen bei der RNAi wahrnehmen. Auf dem Dicer-dsRNA Komplex assembliert nun der Ribonukleoprotein-Komplex RISC (*RNA induced silencing complex*). RISC besteht neben den Endonucleasen Dicer und *argonaute 2* aus einem dsRNA-bindenden Protein (TRBP/R2D2/Loquacious/RDE4). Ein Strang der 21 bp dsRNA wird von *argonaute 2* geschnitten und entfernt. Die Auswahl, welcher der beiden komplementären RNA-Stränge abgebaut wird, findet anhand der Stabilität der Enden des RNA-Duplexes statt. Danach dissoziiert Dicer von RISC ab. Bindet die targetierende einzelsträngige siRNA nun spezifisch an ihre Ziel mRNA, so wird diese endonukleolytisch von *argonaute 2* geschnitten. Die Restfragmente werden durch unspezifische Exonukleasen abgebaut.

Interessanterweise fehlen bei *Leishmania ssp.* und *T. cruzi* eine oder mehrere Komponenten des RNAi Weges, nicht jedoch in *T. brucei* (DaRocha et al., 2004). Hier ist die RNAi für *loss-of-function* Studien die Methode der Wahl. Die induzierbare Transkription von dsRNA ermöglicht selbst die Phänotypisierung von potentiell letalen *knockdown* Varianten. Hierfür stehen z.B. die *T. brucei* Zelllinien SMB (*single marker bloodstreamform*) (Wirtz and Clayton, 1995; Wirtz et al., 1999), *bloodstreamform 1313-514*, und *procyclic form 1313-1333* zur Verfügung. Eine Kopie der auszuschaltenden Zielsequenz wird in einen RNAi Vektor zwischen zwei gegenläufige T7 *promotor* und Tet Operator Regionen kloniert. Das resultierende Plasmid inseriert über homologe Rekombination in das Trypanosomengenom. Die verwendeten Trypanosomen exprimieren T7 Polymerase unter einem Tetracyclin-abhängigen *promotor*, sowie den Tet-Repressor. Das System ist damit doppelt-induzierbar und ermöglicht so eine geringe Hintergrundexpression, ohne Einbußen der Interferenzleistung (Alibu et al., 2005). Die Zelllinie *1313-514* trägt die genetische Informationen für die T7 RNA Polymerase und den Tetracyclin Repressor auf

getrennten Inserts, wodurch eine Selektion mit zwei Antibiotika (G418 und Bleomycin) erforderlich wird. Bei SMB Zellen ist nur eine Selektion mit G418 indiziert.

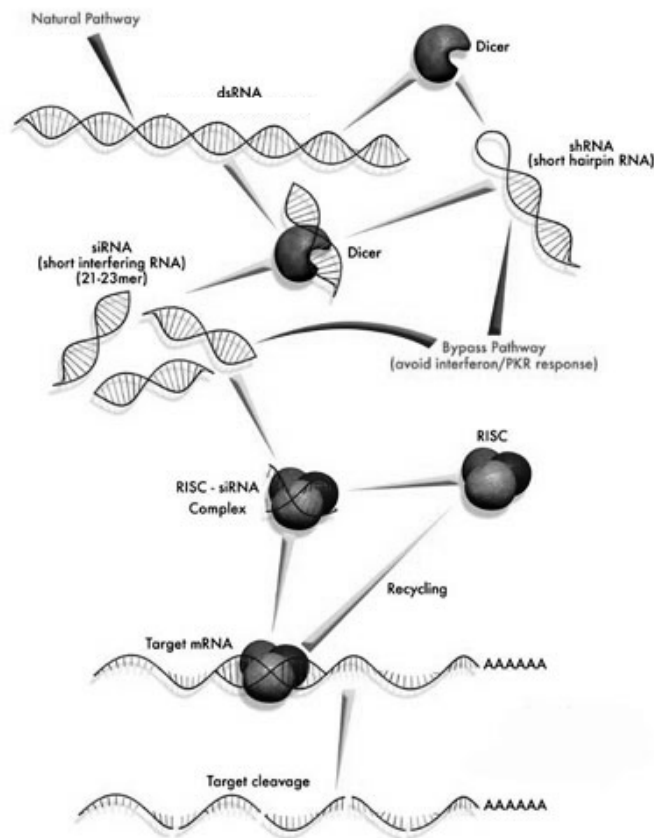


Abbildung 1.9: Mechanismus der RNA Interferenz (Cann, 2008)

1.4 Zielsetzung

Bisherige Untersuchungen deuteten darauf hin, daß in *T. brucei* ein wenig komplexer, evolutiv ursprünglicher Autophagiemechanismus konserviert wurde (Denninger et al., 2008). Der Einschluß von zu degradierendem Zellmaterial in Autophagosomen (Abbildung 1.8, *Vesicle expansion and completion*) schien ausschließlich auf dem ATG8-System zu basieren, da wesentliche Komponenten des alternativen ATG12-Systems bioinformatisch in Trypanosomen nicht nachgewiesen werden konnten (Alvarez et al., 2008; Herman et al., 2006). ATG8 selbst sollte daher eine zentrale Rolle zukommen, da es durch seine Konjugation an Phosphatidylethanolamin als unmittelbarer Interaktionspartner der Lipidmembranen fungiert (Ohsumi et al., 2004). In *T. brucei* wurden drei potentielle Orthologe des ATG8 identifiziert (Herman et al., 2006). Um zu eruieren, welche morphologischen Veränderungen in ATG8-defizienten Trypanosomen auftreten, bzw. ob der Verlust von ATG8 über einen noch unbekanntem Umgehungsweg kompensiert werden kann, wurden genetisch veränderte Trypanosomen benötigt. Ziel der Arbeit war es, eine transgene *T. brucei*

brucei Zelllinie zu generieren, deren ATG8-Synthese induzierbar mittels RNA Interferenz blockiert werden konnte. Im Detail sollten hierfür die ATG8-Orthologe analysiert und kloniert werden. Die Konstruktion von RNAi Vektoren sollte sowohl für einen kombinierten ATG8.1 A/B-ATG8.2 triple *knockdown*, als auch für einen ATG8.1 A/B double *knockdown* und ATG8.2 single *knockdown* erfolgen. Da *T. cruzi* ATG8.1, nicht jedoch *T. cruzi* ATG8.2 erfolgreich zur ATG8-Substitution in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wurde (Alvarez et al., 2008), könnten die single und double *knockdown* Konstrukte für zukünftige Untersuchungen von Bedeutung sein. Für die vorliegende Arbeit sollten Blutform-Trypanosomen mit dem triple *knockdown* Konstrukt transfiziert werden. Hierfür sollte die Methode der Elektroporation im Labor für Blutformen etabliert werden, was die Optimierung zahlreicher Parameter einschloss. Als *proof of concept* sollten α -Tubulin defiziente Kontrollzellen hergestellt werden, die sich aufgrund ihres Phänotyps leicht charakterisieren lassen. Im *Northern dot blot* Verfahren sollte der am besten induzierbare ATG8 defiziente Klon ermittelt werden. Eine Funktionskontrolle sollte über den Nachweis der zur RNA Interferenz eingebrachten dsRNA mittels *Northern Blot* erfolgen. Um die mRNA *level* kontrollieren zu können, sollten spezifische *Northern Blot* Sonden konstruiert werden, die möglichst nicht mit der dsRNA überlappen. Hierfür mussten aufgrund der geringen Größe der Gene die 5'-*untranslated regions* mit einbezogen werden, deren Längen jedoch zuvor bestimmt werden mussten. Das Wachstumsverhalten der generierten Zelllinie sollte unter (nicht-) autophagischen Bedingungen charakterisiert werden. Eine abschließende Phänotypisierung war ausdrücklich nicht Ziel der vorliegenden Arbeit. Dennoch wurden erste Versuche unternommen, die ATG8 Expression auf Proteinebene mittels *Western Blots* zu kontrollieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Wenn nicht anders angegeben wurden sämtliche Laborchemikalien p.a. vom günstigsten Anbieter bezogen.

2.1.1 Software

<i>BibTex</i> V0.99c, <i>KBibTex</i> V0.2.1	General Public License (GPL)
<i>Chromas</i> V2.31	Technelysium Pty, Tewantin, AUS
<i>DNAMAN</i> V4.15	Lynnon BioSoft, Quebec, CDN
<i>F-View Soft Imaging System</i>	Olympus, Hamburg
<i>GATCViewer</i> V1.00	GATC Biotech, Konstanz
<i>GIMP</i> V2.4.6	General Public License (GPL)
<i>Kile</i> V2.0.1	General Public License (GPL)
<i>OpenOffice</i> V2.4	SUN Microsystems, Kirchheim
<i>PDFLaTeX</i> V3.141592-1.30.5-2.2	General Public License (GPL)
<i>QuantityOne</i> V4.6.3	BioRad Laboratories, München

2.1.2 Laborgeräte

<i>Bio-Dot microfiltration apparatus</i>	BioRad Laboratories, München
Brutschrank 37°C	Infors, Bottmingen, CH
CO ₂ -Brutschrank, 37°C	Heraeus, Osterode
Entwickler SRX-101A	Konica, Langenhagen
Filmkassette X-Omatic	Kodak, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg

Gelfotoapparatur CS1	Cybertech, Ingolstadt
Gelkammer Blue Marine 100	Serva, Heidelberg
Gelkammer Blue Marine 200	Serva, Heidelberg
<i>GenePulser II</i>	BioRad Laboratories, München
Hämozytometer (Tiefe 0.02 mm)	Brand, Wertheim
Heizblock neoBlock I	neoLab, Heidelberg
Invertmikroskop ID02	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Bachofer, Reutlingen
LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus, Hanau
Mikrozentrifuge Amicon MC-13	Heraeus, Osterode
MiniCycler	MJ Research, Waltham, USA
pH Meter	WTW, Weilheim
Photometer Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Wien, CH
<i>Power Supply</i> EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg
Schüttler Certomat® R	BBraun, Melsungen
TEM, EM109	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom OM U3 C.	Reichert, Wien, AU
UV Transilluminator TFX-20M	Gibco BRL, Life technologies
<i>vacuum concentrator</i>	Bachofer, Reutlingen
Vortex-Genie	Bender&Hobein, Zürich, CH

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

6, 12, 24, 48, 96 <i>well</i> Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem®Cups	Plano, Marburg
Centricon <i>centrifugal filters</i>	Millipore, Schwalbach
Cryo-Röhrchen (1.5ml)	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Elektroporationsküvetten 2 mm	BioRad Laboratories, München
Hybond™ - N+	Amersham Biosciences, Freiburg
Kulturflaschen T-25, T-75, T-175	Greiner, Frickenhausen
Kulturröhrchen 5 ml	Greiner, Frickenhausen
Kupfernetzchen, 400 <i>mesh</i>	Plano, Marburg
Küvetten 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Negativfilm Kokak 125 ASA	Kodak, Stuttgart
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	American Can Co, Chicago, USA
Reaktionsgefäße 1.5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sterilfilter	Nalge, Hereford, UK
Whatman Papier	Whatman, Maidstone, USA

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Stammlösungen

Agar (2x)	40 g/l Agar-Agar in ddH ₂ O
Ampicillin (1000x)	50 mg/ml in 70% Ethanol
dATP 100 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
L-Cystein 100x	18.2 mg/ml
G418 (Geneticin)	50 mg/ml
<i>Giemsa</i> Stammlösung	Fluka, Buchs, CH
Hygromycin B	50 mg/ml
Pen/Strep 100x	5 mg/ml
Pyruvat 1000x	110 mg/ml
Thymidin 1000x	39 mg/ml
X-Gal	40 mg/ml in Dimethylformamid

BCS 1000x

Bathocuproinsulfonat	28.2 mg/ml
----------------------	------------

2.1.4.2 Medien und Puffer für *E. coli*

LB Medium (2X)

Bacto-Trypton	20 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	20 g
ddH ₂ O	950ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.0
<i>autoklavieren</i>	

SOB

Trypton	20.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	0.5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>autoklavieren</i>	
1M MgCl ₂ (steril)	10 ml
1M MgSO ₄ (steril)	10 ml

SOC

2M Glucose (steril)	1 ml
SOB	ad 100 ml

TSS

PEG 6000	1 g
DMSO	0.5 ml
MgCl ₂ O * 6 H ₂ O	102 mg
LB-Medium	ad 10 ml

2.1.4.3 Medien und Puffer für *T. brucei***Blutformgrundmedium**

Das MEM-Medium wurde nach Standardprotokoll (EAGLE, 1959) hergestellt und beinhaltet Modifikationen nach (Duszenko et al., 1985) und (Duszenko et al., 1992).

CaCl ₂ * 2H ₂ O	265 mg
KCl	400 mg
MgSO ₄ * 7xH ₂ O	200 mg
NaCl	6800 mg
HEPES	140 mg
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.4
L-Arginin HCl	126 mg
L-Histidin HCl x H ₂ O	42 mg
L-Isoleucin	52 mg
L-Leucin	52 mg
L-Lysin	73 mg
L-Methionin	60 mg
L-Phenylalanin	100 mg
L-Threonin	48 mg
L-Tryptophan	100 mg
L-Tyrosin	100 mg
L-Valin	46 mg
L-Ornithin HCl	50 mg
Glucose * H ₂ O	5940 mg
Adenosin	12 mg
MEM-nichtessentielle AS	10 mg
MEM-Vitaminlösung	10 mg
Phenolrot	10 mg
<i>sterilfiltrieren</i>	0.22 µm

Blutformkulturmedium

NaHCO ₃ (75.0mg/ml)	30 ml
L-Glutamin (29.2mg/ml)	10 ml
L-Cystein (3.03mg/ml)	10 ml
Thymidin (0.39mg/ml)	10 ml
Hypoxanthin 100x	10 ml
BCS 1000x	2 ml
BSA/Myristinsäure	20 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
FBS (30min @ 56°C)	150 ml
Blutformgrundmedium	ad 1000 ml
<i>pH-Wert kontrollieren</i>	7.4
<i>sterilfiltrieren</i>	0.22 µm

BSA/Myristinsäure

fettfreies BSA	1 g
ddH ₂ O	20 ml
Myristinsäurelösung	24 mg in 100 µl EtOH

Cytomix Puffer pH 7.6

EGTA	0.38 g
KCl	4.44 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	9.6 mg
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	505 mg
Glucose	2.5 g
BSA	50 mg
HEPES	2.98 g
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (10x)	50 ml
Hypoxanthin (100x)	5 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.6
<i>sterilfiltrieren</i>	0.22 µm

Einfriermedium

TDB	77 ml
87% (v/v) Glycerol	23 ml

HMI-9 Kulturmedium

IMDM Grundmedium	890 ml
------------------	--------

Hypoxanthin 100x	11 ml
L-Cystein 100x	11 ml
Pyruvat 1000x	1.11 ml
Thymidin 1000x	1.11 ml
BCS 1000x	1.11 ml
2-Mercaptoethanol	15.5 μ l
Pen/Strep 100x	11 ml
<i>pH-Wert kontrollieren</i>	7.4
<i>sterilfiltrieren</i>	0.22 μ m
FBS (30min @ 56°C)	110 ml
Serum Plus TM	110 ml

Hypoxanthin 100x:

NaOH	0.4 g
ddH ₂ O	100 ml
Hypoxanthin	1.36 g
<i>ggf. im Ultraschallbad lösen</i>	

IMDM Grundmedium

IMDM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ddH ₂ O	ad 900 ml
Natriumbicarbonat	3.02 g
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.1-7.3
ddH ₂ O	ad 1000 ml

K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM (10x)

1M K ₂ HPO ₄	8.66 ml
1M KH ₂ PO ₄	1.34 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml
<i>pH-Wert kontrollieren</i>	7.6

TDB pH 7.0

Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O	4.3 g
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	1.12 g
KCl	0.37 g
NaCl	4.67 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.25 g
Glucose * H ₂ O	3.96 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

<i>pH-Wert einstellen</i>	7.0
<i>sterilfiltrieren</i>	0.22 μm

Weise Puffer

Na_2HPO_4	861 mg
KH_2PO_4	25 mg
ddH ₂	ad 100 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.2

2.1.4.4 Puffer für Gelelektrophorese**TAE (50x)**

Tris	242 g
Essigsäure	57.1 ml
NA_2EDTA	37.2 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	8.0

2.1.4.5 Puffer für Northern blot**FA Gel Laufpuffer (1x)**

FA Gel Puffer (10x)	100 ml
Formaldehyd (37%)	20 ml
ddH ₂ O	880 ml

FA Gel Puffer (10x)

MOPS	41.86 g
Na-Acetat	4.102 g
EDTA	3.72 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Hybridmix

SDS	35 g
EDTA	186 mg
500mM Na_2HPO_4 (pH 7.2)	ad 500 ml

RNA Ladepuffer (5x)

ges. Bromphenolblaulösung	16 μl
500mM EDTA (pH 8)	80 μl
Formaldehyd (37%)	720 μl

100% Glycerol	2 ml
Formamid	3084 μ l
FA Gel Puffer (10x)	4 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml

SSC

NaCl	175.3 g
Na-Citrat * 2 H ₂ O	88.2 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.0

stripping buffer

SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Waschpuffer

SDS	10 g
500mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7.2)	ad 80 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

2.1.4.6 Puffer für Western blot**AP-Puffer**

NaCl	8.77 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2.03 g
Tris-HCl	2.42 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	8.9

blocking Lösung

Milchpulver	10% in 2fach PBS
-------------	------------------

Lysepuffer

Tris HCl	7.85 g
NaCl	8.7 g
Nonidet P40	10 μ l
Natriumdesoxycholat	5 g
EDTA	292 μ g
SDS	1 g
Proteaseinhibitorlsg.	1 ml

ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.4

Nachweislösung

Toluidin-BCIP	500 µl
NBT	1000 µl
AP-Puffer	ad 100 ml

PBS (2x)

KCl	0.40 g
KH ₂ PO ₄	0.48 g
NaCl	16.00 g
Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	7.26 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.4

Proteaseinhibitorlg. (1000x)

Pepstatin	0.70 mg
Chymostatin	0.60 mg
Leupeptin	0.42 mg
DMSO	ad 1ml

running buffer

Tris	3.04 g
Glycin	14.42 g
SDS	1 g
ddH ₂ O	ad 1000ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	8.3

Sammelgel (für 2 Gele)

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.75 ml
ddH ₂ O	4.20 ml
Acrylamid	1.00 ml
10% SDS	60 µl
10% APS	30 µl
TEMED	6 µl

Transferpuffer

10% SDS	3.75 ml
---------	---------

Glycin	2.93 g
Methanol	200 ml
Tris	5.82 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	9.2

Trenngel (für 2 Gele)

1 M Tris-HCl (pH 8.8)	4.30 ml
ddH ₂ O	3.30 ml
Acrylamid	3.80 ml
10% SDS	114 μ l
10% APS	39 μ l
TEMED	12 μ l

Waschpuffer

NaCl	8.77 g
Tris-HCl	1.21 g
Tween 20	1.00 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml
<i>pH-Wert einstellen</i>	7.4

2.1.4.7 Puffer für Elektronenmikroskopie**Cacodylatpuffer (2x)**

Na-Cacodylat * 3 H ₂ O	4.28 g
Saccharose	8 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer	2% in 1x Puffer
Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer	3% OsO ₄ 1:1 in 2x Puffer

Osmiumtetroxid-Lösung (3%)

Osmiumtetroxid	0.25 g
ddH ₂ O	8.18 ml

Uranylacetat (5%)	50 mg/ml
-------------------	----------

2.1.5 Enzyme

<i>Bse</i> YI	NEB, Frankfurt a.M.
Crimson <i>Taq</i>	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Eam</i> 1105I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hpa</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HotStarTaq MasterMix</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Not</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
OmniScript RT	QIAGEN, Hilden
<i>Pvu</i> II	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sap</i> I (<i>Lgu</i> I)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taa</i> I (<i>Tsp</i> 4CI, <i>Hpy</i> CH4III)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
TdT	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Kits

Megaprime DNA <i>labeling systems</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
NEBlot DNA <i>labeling Kit</i>	NEB, Frankfurt a.M.
<i>NucleoBond</i> PC-100	Macherey-Nagel, Düren
<i>PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAquick gel extraction</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAprep spin miniprep</i>	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
<i>TOPO TA cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Primer

Alle Primer von Invitrogen, Karlsruhe wurden als 100 μ M Stammlösungen bei -20°C gelagert und für Polymerasekettenreaktionen in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Die angegebenen Hybridisierungspositionen werden im Anhang A.1 näher erläutert. Manche Primer wurden um Restriktionsstellen und *clamps* verlängert (*), oder enthalten eine Anker-Sequenz (**).

Primer	Sequenz	Gen	von	bis	t_m [°C]
RNA Interferenz					
ATG8.1(A&B)- se-TripleKO (*)	5'-tagt- ACTGT-CCGATA- TTGGTGAGTTAGACAGG- 3'	8.1A	#116	#138	59.9
		8.1B	#125	#147	59.9

ATG8.1(A&B)- as-TripleKO (*)	5'-agct-GCTGGG-TAG- GAAACCGTCTTCATC- CTT-3'	8.1A	#295	#315	57.8
		8.1B	#305	#325	57.8
ATG8.2-se- TripleKO (*)	5'-tagt-CCCAGC-AAC- ACATTCCCATCCTTTGC- 3'	8.2	#86	#105	59.8
ATG8.2-as- TripleKO (*)	5'-agct-ACTGT-TCTTTT- GCCCTTGCGTAAAT-3'	8.2	#334	#353	59.7
ATG8.1(A&B)- se-LinkerPCR	5'-CCGATATTGGTGAGT- TAGACAGG-3'	8.1A	#116	#138	59.9
		8.1B	#125	#147	59.9
ATG8.1(A&B)- as-LinkerPCR (**)	5'-cgtttaaacttacggaccgtca- ATAGGAAACCGTCTT- CATCCTT-3'	8.1A	#295	#315	58.2
		8.1B	#305	#325	58.2
ATG8.2-se- LinkerPCR (**)	5'-tgacggtcgtaagttaaacg- AACACATTCCCATCC- TTTGC-3'	8.2	#86	#105	59.8
ATG8.2-as- LinkerPCR	5'-TCTTTTGCCCTTGCG- TAAAT-3'	8.2	#334	#353	59.7
Untranslated Region					
SL23se	5'-CGCTATTATTAGAAC- AGTTTCTG-3'	SL	-	-	54
VD8.1Aas:	5'-CGGATTCATTCAATC- GCTTTACCAG-3'	8.1A	#31	#55	61
VD8.1Bas:	5'-CATCCGACTGTCGGC- TCTCAAAGG-3'	8.1B	#38	#61	62
VD8.2as:	5'-TACAGTCCAGCTCGC- GCTGCACC-3'	8.2	#171	#193	61
ATG8.1A- UTR-length- as	5'-ATGGTTGGGGTGACT- CT-3'	8.1A	#68	#84	53.1
ATG8.1B- UTR-length- as	5'-CCTTTCACGCACCTTT- 3'	8.1B	#66	#81	52.6

5'-RACE AP	5'-GGCCACGCGTCGACT- AGTACTTTTTTTTTTTTTT- TTTT-3'	(dA) _n	-	-	43
5'-RACE AU- AP	5'-GGCCACGCGTCGACT- AGTAC-3'	RACE AP	-	-	63.1
Northern Blotting Sonden					
ATG8.1Ase- Northern	5'-GTGCACGTCACCTTT- CACTG-3'	8.1A	#-249	#-230	60.4
ATG8.1Aas- Northern	5'-CGGATTCATTCAATC- GCTTT-3'	8.1A	#36	#55	60.0
ATG8.1Bse- Northern	5'-CATTCGCTCGTTTGT- TGTTG-3'	8.1B	#-218	#-199	60.3
ATG8.1Bas- Northern	5'-ATGCCTTTCACGCAC- CTTT-3'	8.1B	#66	#84	60.7
ATG8.2se- Northern	5'-CGAACATGTTTGTGC- AGCTT-3'	8.2	#-278	#-259	59.9
ATG8.2as- Northern	5'-CTGGTACCGGTAGTG- TGAAGG-3'	8.2	#4	#24	59.5
ATG8.1Ase- 209bp- Northern	5'-GAGGGCAAAGGG- GTAAACAC-3'	8.1A	#-124	#-105	60.7
ATG8.1Aas- 209bp- Northern	5'-AATGGTTGGGGTGAC- TCTTG-3'	8.1A	#66	#85	59.8
ATG8.1Bse- 206bp- Northern	5'-CCAGCGCTAGAAAAC- AAATTTTA-3'	8.1B	#-113	#-91	59.8
ATG8.1Bas- 206bp- Northern	5'-ACGATCCGGATGCCT- TTC-3'	8.1B	#76	#93	61.0
ATG8.2se- 215bp- Northern	5'-GTTGGCGGGAGTTGT- TAGAT-3'	8.2	#-167	#-148	59.1
ATG8.2as- 215bp- Northern	5'-GCGTTCAGCAAAACT- ACGTG-3'	8.2	#29	#48	59.5

2.1.8 Stämme

2.1.8.1 *E. coli*

<i>TOP10 competent cells</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>XL1 Blue competent cells</i>	Stratagene, Heidelberg
RNAi Vektor p2T7:TABlue	(Field, 2008)

2.1.8.2 *T. brucei*

Alle Transfektionsexperimente wurden mit Klonen der Zelllinie SMB (*single marker bloodstreamform*) durchgeführt, die von der klonalen Zelllinie MITat1.2 abgeleitet wurden (Wirtz and Clayton, 1995). SMB Zellen exprimierten die T7-Polymerase und den Tetracyclin-Repressor (T7RNAP::TETR::NEO) und ermöglichten in Verbindung mit dem Plasmid p2T7:TABlue die induzierbare Transkription dsRNA und damit einen Dicer/RISC vermittelten *knockdown* des betreffenden Zielgenes.

Genomische DNA und cDNA wurden aus Klonen der Zelllinie BF221 erhalten. Dabei handelte es sich um den monomorphen Stamm MITat 1.2 (*Molteno Institute Trypanozoon antigenic type*, Cambridge) (Cross, 1975) mit der VSG-Antigenvariante 221 *Trypanosoma brucei brucei*. Dieser Stamm wurde in Uganda aus dem EATRO 427 Stamm isoliert.

2.1.9 Chemikalien

Agarose NEEO <i>Ultra Quality</i>	Roth, Karlsruhe
DNA <i>loading dye</i> (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
<i>FastRuler low range</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler 1kb</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler low range</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler ultra low range</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
NBT	32.7 mg/ml in 70% DMF
Primärer Antikörper	<i>Rabbit anti-ATG8</i> (1000x)
Prostaglandin F _{2α}	Cayman Chemical, Tallinn, EST
Sekundärer Antikörper	<i>Swine anti-Rabbit</i> , AP (10000x)
Serum Plus ®	SAFC Biosciences, Andover, UK
Toluidin-BCIP	28.16 mg/ml in DMF

2.2 Methoden

2.2.1 Softwarebasierte Recherche und Auswertung

2.2.1.1 Datenbankrecherche im Genom von *T.brucei*

Verwendete Sequenzen wurden aus der Genomdatenbank *Trypanosoma brucei* GeneDB (GeneDB, 2008) bezogen. Die Daten wurden vom *The Institute for Genomic Research* (TIGR, 2008) und *Wellcome Trust Sanger Institute* (Sanger, 2008) bereitgestellt und basieren auf dem Stamm TREU927/4 GUTat10.1.

2.2.1.2 *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*

Die Analyse von Sequenzhomologien, sowie die Auswertungen der Sequenzierungsergebnisse wurden mit *bl2seq* (NCBI, 2008) des *National Center of Biotechnology Information* durchgeführt.

2.2.1.3 Primerdesign mit *Primer3*

PCR Primer wurden mit dem webbasierten Interface *Primer3* (v.0.4.0) (Rozen and Skaletsky, 2000) ausgewählt. Alle angegebenen Schmelztemperaturen entsprechen den hiermit erhaltenen Berechnungen.

2.2.1.4 *RNAi target selection script (RNAit)*

Die Eignung unterschiedlicher Sequenzen für RNA Interenzen wurde mit dem TrypanoFAN *RNAit* Interface (RNAit, 2008) untersucht. Hierbei wurden Primerdesign (*Primer3*) und *BLAST*-Suche (NCBI) nach *off-target* Effekten kombiniert.

2.2.1.5 Restriktionsvorhersagen *in silico*

Zur Berechnung erwarteter Fragmentlängen nach dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde das Programm *DNAman* (V4.15) verwendet. Hierbei war insbesondere zu beachten, daß diese Softwareversion offensichtlich keine Restriktionsstellen cyclischer DNA erkennt, die sich über Anfang und Ende der eingegebenen Sequenz erstrecken. In diesem Fall reichte es nicht aus, das Plasmid als cyclisch zu kennzeichnen. Zusätzlich mussten einige Nukleotide vom Ende der FASTA-Datei an deren Anfang übertragen werden.

2.2.1.6 Auswertung von Bandenintensitäten

Die Auswertung von DNA oder rRNA Konzentrationen nach Gelelektrophoresen, bzw. die Quantifizierung von *Northern blot* Hybridisierungen, wurde mit der Basic-Version der Software *QuantityOne* (V4.6.3) durchgeführt. Die betreffenden Banden wurden mit rechteckigen ROIs markiert, gegen einen durchschnittlichen Hintergrundbereich bereinigt und die Intensitäten über den markierten Flächeninhalt integriert. Verglichen wurden schließlich die ausgegebenen Volumenintensitäten (Adj.Vol.INT*mm²).

2.2.2 Kulturführung von *E. coli*

2.2.2.1 Anzucht in Flüssigkultur

Kulturröhrchen wurden mit 3ml LB-Medium (1x) und 3 μ l bis 6 μ l (entsprechend maximal 100 μ g/ml) Ampicillin befüllt und mit wenigen Eiskristallen aus *E. coli*-Stabilaten inokuliert. Alternativ wurden Klone von LB-Agarplatten mit einer sterilen Pipettenspitze oder Impföse gepickt und in das Medium überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C mit 200 rpm inkubiert. Um größere Volumina zu erhalten, wurden am Folgetag 100 ml LB-Medium (100 μ l Ampicillin) mit 100 μ l der Vorkultur angeimpft.

2.2.2.2 Anzucht auf Agarplatten

250 ml Agar (2x) wurden in der Mikrowelle geschmolzen, mit 250 ml LB-Medium (2x) und 500 μ l Ampicillin (Endkonzentration 50 μ g/ml) aufgefüllt und steril in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden diese bei 4 °C bis zur Benutzung gelagert. Sollte eine blau/weiß-Selektion das Screening nach Rekombinanten erleichtern, wurden die Platten vor der Benutzung mit 40 μ l X-Gal (40 mg/ml) bestrichen. Einige Mikroliter Bakteriensuspension wurden auf den Agar pipettiert und mit einem Drygalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Alternativ wurde mit einer Pipettenspitze oder Impföse ein Verdünnungsausstrich vorgenommen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Herstellung von Stabilaten

850 μ l einer *E. coli*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 150 μ l Glycerol (100%) gemischt und in ein 2 ml Cryo-Röhrchen gefüllt. Das Gemisch wurde geschüttelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.3 DNA-Isolierung

2.2.3.1 Ethanolpräzipitation

Für eine schnelle und kostengünstige Plasmidisolierung wurde auf die Puffer der Plasmidpräparationskits zurückgegriffen. Es wurden 1.5 ml einer Bakteriensuspension 1 min bei Raumtemperatur mit 13 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 μ l P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 150 μ l P2 und vorsichtigem Invertieren folgte eine 5-minütige Lyse. Die Neutralisation mit 210 μ l N3 fand nach erneutem Invertieren unter Eiskühlung statt. Das Präzipitat wurde 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes 1.5 ml Eppendorfcup überführt. Durch Zugabe von 900 μ l tiefgekühltem Ethanol (-20 °C) wurde die Plasmid-DNA gefällt und 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C abgetrennt. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert, bis zu 45 min getrocknet und in 50 μ l ddH₂O gelöst.

2.2.3.2 Mini-Plasmidpräparation

1.5 ml einer Bakterienkultur wurden abzentrifugiert, in 250 μ l P1 resuspendiert und 2-3 min mit 250 μ l P2 unter mehrmaligem Invertieren alkalisch lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 350 μ l N3, und erneutem Invertieren. Das entstandene Präzipitat wurde 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in eine *QIAprep spin* Säule überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde die Säule mit 0.5 ml PB und 0.75 ml PE gewaschen und trocken zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde mit 50 μ l ddH₂O eluiert.

2.2.3.3 Midi-Plasmidpräparation

50 ml einer Bakterienkultur ($OD_{600nm}=3-6$) wurden 15 min bei 5 000 g und 4 °C abzentrifugiert und in 8 ml S1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 8 ml S2 wurde mehrmals invertiert und die Zellen 2-3 min bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurde 8 ml eiskaltes S3 zugegeben, nochmals invertiert und die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde filtriert und in mit Puffer N2 äquilibrierte *NucleoBond* Säulen gefüllt. Die Säulen wurden mit 12 ml N3 gewaschen und mit 5 ml N5 eluiert. Die Lösung wurde mit 3.5 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Ethanol (70%) gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und mit 150 μ l ddH₂O gelöst.

2.2.3.4 PCR purification

Zu einem Volumenteil des PCR Ansatzes wurden 5 Teile Puffer PBI gemischt und in eine *QIAquick spin* Säule überführt. Die Lösung wurde 1 min zentrifugiert, mit 0.75 ml PE gewaschen, trocken zentrifugiert und gebundenes PCR Produkt mit mindestens 10 μ l ddH₂O eluiert.

2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden 1:50 Verdünnungen in ddH₂O hergestellt und spektrometrisch in 100 μ l Küvetten bei 260 nm gemessen. Eine Extinktionseinheit entspricht dabei 50 μ g/ml dsDNA bzw. 40 μ g/ml ssRNA. Zusätzlich wurden Proteinkontaminationen über den Quotienten E_{260nm}/E_{280nm} bestimmt, der für reine DNA theoretisch bei 1.8 bzw. für reine RNA bei 2.0 liegt. Alle Messungen wurden automatisiert gegen die Trübung bei 320 nm bereinigt.

Bei Proben mit geringen DNA-Konzentrationen wurde alternativ eine Agarose-Gelelektrophorese mit geschätzten 20-80 ng DNA durchgeführt und die Bandenintensitäten mit Größenmarkern bekannter Konzentration verglichen (Kapitel 2.2.1.6).

2.2.4 Molekularbiologische Techniken

2.2.4.1 Analyse mit Restriktionsendonukleasen

Folgende Restriktionsenzyme und Puffer (je 10x) kamen zum Einsatz:

Enzym	Schnittstelle	Puffer	T _{Optimum}	Inaktivierung
<i>Bse</i> YI	5'...C CCAGC...3' 3'...GGTC G...5'	NEB3	37 °C	20 min 65 °C
<i>Eam</i> 1105I	5'–GACNNN NNGTC–3' 3'...CTGNN NNNCAG...5'	Tango	37 °C	20 min 65 °C
<i>Not</i> I	5'...GC GGCCGC...3' 3'...CGCCGG CG...5'	Buffer O	37 °C	20 min 80 °C
<i>Pvu</i> II	5'...CAG CTG...3' 3'...GTC GAC...5'	Buffer G	37 °C	20 min 80 °C
<i>Sap</i> I	5'...GCTCTTC(N) ₁ ...3' 3'...CGAGAAG(N) ₄ ...5'	Tango	37 °C	20 min 65 °C
<i>Taa</i> I	5'...ACN GT...3' 3'...TG NCA...5'	Tango	65 °C	∅

Das Volumen eines Restriktionsverdau wurde in der Regel auf 20 μ l eingestellt. Die DNA Konzentration sollte maximal 1 μ g/ μ l betragen und der Puffer einfach konzentriert sein. 1 U eingesetztes Enzym ist vom Hersteller definiert als die Aktivität, die 1 μ g λ DNA pro Stunde prozessiert.

2.2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0.8% (15 kbp-1 kbp), 1% (10 kbp-500 bp) und 2% (2.5 kbp-100 bp) (w/v) Agarose gegossen. Dafür wurde Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in der Mikrowelle in 50 ml TAE (1x)-Puffer gelöst. Nach kurzem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden der Lösung 3-4 μ l Ethidiumbromid zugesetzt und gut gemischt. Die noch warme Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und der Kamm in die dafür vorgesehenen Halterungen platziert. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit TAE (1x) gefüllte Gelapparatur überführt, mit DNA-Proben beschickt (inkl. DNA loading dye (1x)) und 45 min bei 80 V (konstante Spannung) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht fotografiert.

2.2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Die Gelextraktion erfolgte nach dem *QIAquick* Protokoll. Eine DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und in 3 μ l QG-Puffer pro mg Agarosegel aufgenommen. Das Gel wurde 10 min bei 50 °C geschmolzen und mit 1 μ l Isopropanol pro mg Gel gemischt. Die Lösung wurde 1 min durch eine *QIAquick* Silicagelsäule zentrifugiert, je 1 min mit 0.5 ml QG und 0.75 ml PE gewaschen, und 1 min trocken zentrifugiert. Die DNA wurde mit mindestens 30 μ l ddH₂O eluiert.

2.2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktionen wurden mit *hot-start* fähigen *Taq*-Polymerasen von QIAGEN (*HotStarTaq MasterMix*) und NEB (*Crimson Taq*) durchgeführt. Je nach benötigter

Ausbeute wurden 50 μl oder 100 μl angesetzt. Die 100 μM Primerstammlösungen wurden vor Gebrauch 1:10 verdünnt. Für eine 100 μl PCR nach dem QIAGEN Protokoll wurden 50 μl *HotStarTaq MasterMix* (2.5 U DNA Polymerase, Endkonzentration je 200 μM dNTP in 1x PCR Puffer), jeweils 5 μl verdünnte *sense* und *antisense* Primerlösung (entsprechend 0.5 μM Endkonzentration) und maximal 2 μg Template DNA in PCR Reaktionsgefäße pipettiert. Unter Verwendung des NEB Protokolls wurden Puffer, Polymerase und dNTPs einzeln zugegeben. Die Endkonzentrationen waren identisch. Im Thermocycler erfolgte eine initiale Aktivierung der Polymerase 15 min bei 95 °C. dsDNA wurde 1 min bei 94 °C denaturiert. Die Primer hybridisierten 1 min bei 50-68 °C an die Template DNA (meist 4 °C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur), gefolgt von 1 min Elongation bei 72 °C. Es wurden zwischen 25 und 50 Zyklen durchgeführt. Der finale Extensionsschritt betrug 10 min bei 72 °C. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Gegebenenfalls wurde das Thermocyclerprogramm um weitere Schritte ergänzt.

touchdown PCR

Bei der *touchdown PCR* wurde die Spezifität der Primerbindung durch zyklusweise Annäherung der *annealing temperature* an die zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers erhöht. Wenn die *annealing temperature* zu Beginn über der zu erwartenden T_m gewählt wird, binden die Primer ausschließlich und damit hochspezifisch an die DNA. So werden Primerdimere und Artefakte verringert, und es vermehrt sich vorzugsweise das gewünschte Amplikon.

quick&dirty PCR

Um eine größere Anzahl transformanter Klone zu untersuchen, mussten zahlreiche Polymerasekettenreaktionen parallel durchgeführt werden. Aus Gründen der Zeitersparnis wurde auf Plasmidisolierungen verzichtet. Statt dessen wurden Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und zum Inokulieren der PCR-Ansätze verwendet. Beim initialen Aktivierungsschritt lysierten die Zellen und die *template DNA* wurde freigesetzt.

PCR Ligation

Die Ligation zweier PCR-Produkte liess sich unter PCR-Bedinungen durchführen, wenn der *sense* Primer des ersten Produktes und der *antisense* Primer des zweiten Produktes zueinander komplementäre Ankersequenzen besaßen. Beide PCR-Produkte wurden getrennt voneinander amplifiziert, aufgereinigt und kombiniert. Die Mischung wurde 1:1 mit *HotStarTaq MasterMix* versetzt und wie oben beschrieben ligiert.

2.2.4.5 Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends with PCR

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 2 μl Puffer RT (10x), 2 μl dNTP-Mix (5 mM pro dNTP), 2 μl *antisense* Primer, 1 μl RNase-Inhibitor (10 U/ μl), 1 μl reverse Transkriptase (4 U/ μl), 2 μg RNA und ad 20 μl ddH₂O für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert. Das Reaktionsprodukt wurde über eine Silicagel-Säule (PCR *purification*, Kapitel 2.2.3.4) aufgereinigt und mit 10 μl EB-Puffer eluiert.

Polydesoxyadenylierung (Oligo-(dA) *tailing*)

Mit 10 μl cDNA, 1 μl dATP (100 mM), 4 μl TdT-Puffer (5x), 1 μl terminaler Desoxynukleotidyltransferase und ad 20 μl ddH₂O wurde das (dA) *tailing* 15 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 70 °C gestoppt.

touchdown PCR

Eine *touchdown* PCR wurde durchgeführt mit 25 μl *HotStarTaq MasterMix*, 5 μl Primer AP, 5 μl *antisense* Primer, 5 μl polydesoxyadenylierter cDNA und ad 50 μl ddH₂O. Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen der beteiligten Primer wurde der Hybridisierungsschritt über 20 Zyklen von initialen 58 °C um je 0.4 °C pro Zyklus gesenkt. Danach folgten weitere 20 Zyklen mit einer konstanten Hybridisierungstemperatur von 50 °C.

nested PCR

Ausgehend von 5 μl des *touchdown* PCR Produkts wurde eine konventionelle PCR mit 5 μl AUAP und 5 μl verschachteltem *antisense* Primer gestartet. Die Hybridisierungstemperatur betrug 57 °C. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

2.2.4.6 Subklonierung

Für die Topoisomerase-gestützte *TA* Subklonierung wurden 0.5-40 μl PCR Produkt, 1 μl *salt solution*, 5 μl ddH₂O und 1 μl *TOPO* Vektor gemischt und 5-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 2 μl des Ligationsansatzes wurden zu einem Vial *OneShot® TOP10*-Zellen pipettiert. Diese wurden 5 bis 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis gekühlt und mit 250 μl SOC 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 10-50 μl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-XGal-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.4.7 Ligationsreaktion

Für die Ligationsreaktionen mussten die molaren Stoffmengen der eingesetzten DNA betrachtet werden, die sich aus Masse und Anzahl der Basenpaare berechnen liessen (*picomol-ends* Berechnung): Die Molmasse eines dNMP beträgt durchschnittlich 326 g/mol = $3.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\text{pmol}$, oder reziprok 3030 pmol/ μg pro Basenpaar. Für die eingesetzte Stoffmenge Plasmid gilt:

$$PicomolEnds_{Plasmid}[\text{pmol}] = \frac{3030}{Basenpaare_{Plasmid}} \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{g}} \times Masse_{Plasmid}[\mu\text{g}] \quad (2.1)$$

Da für die Ligationsansätze zwischen 1-10 Teile Insert mit einem Teil Plasmid inkubiert werden können, gilt:

$$PicomolEnds_{Insert}[\text{pmol}] = PicomolEnds_{Plasmid}[\text{pmol}] \times Multiplikator \quad (2.2)$$

Analog zu Gleichung 2.1 ist für die resultierende Masse des Insert:

$$Masse_{Insert}[\mu\text{g}] = \frac{PicomolEnds_{Insert}[\text{pmol}]}{\frac{3030}{AnzahlBasenpaare_{Insert}} \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{g}}} \quad (2.3)$$

Mit Gleichungen 2.1 und 2.2:

$$Masse_{Insert}[\mu\text{g}] = \frac{\frac{3030}{Basenpaare_{Plasmid}} \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{g}} \times Masse_{Plasmid}[\mu\text{g}] \times Multiplikator}{\frac{3030}{AnzahlBasenpaare_{Insert}} \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{g}}} \quad (2.4)$$

Dies entspricht der im OpenWetWare Wiki (OpenWetWare, 2008) beschriebenen Formel:

$$Masse_{Insert}[\text{ng}] = Multiplikator \times \frac{Basenpaare_{Insert}}{Basenpaare_{Plasmid}} \times Masse_{Plasmid}[\text{ng}] \quad (2.5)$$

200 ng Vektor wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss des Inserts, 2 μl Ligationspuffer (10x) und 1 μl T4 DNA Ligase (400 U) in einem 20 μl Reaktionsansatz inkubiert. Die Reaktion fand im Thermocycler für 1 h bei 22 °C (Temperaturoptimum der T4 DNA Ligase), 8 h bei 16 °C, 9 h bei 4 °C (erleichterte TA-Anlagerung) statt. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65 °C.

2.2.4.8 Herstellen chemisch kompetenter *XLI Blue* Zellen

Kompetente Zellen wurden nach der PEG/DMSO Methode (Chung et al., 1989) hergestellt. Dazu wurde ein Verdünnungsausstrich von *XLI Blue* auf LB-Agarplatten mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin bei 37 °C über Nacht inkubiert. Ein Klon wurde gepickt und in 3.5 ml LB-Medium (mit Tetracyclin) inokuliert und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt. 1 ml der Vorkultur wurde zum Animpfen einer 100 ml Hauptkultur genutzt. Diese wurde bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.4 oder 0.7 geschüttelt, 5 min bei 4 500 rpm

und 4 °C abzentrifugiert und in 10 ml TSS resuspendiert. Die Zellen wurden in 100 μ l Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.9 Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 0.1-100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Die Zellen wurden 20 min auf Eis gekühlt und exakt 45 Sekunden lang einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis gekühlt, mit 0.9 ml vorgewärmtem SOC Medium versetzt und 30 min bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. 200 μ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.10 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Sequenzierungen werden bei GATC (GATC Biotech, 2008) in Auftrag gegeben. Hierfür wurden PCR-Produkte durch Gelextraktion aufgereinigt und so in 30 μ l gelöst, daß die DNA Konzentration 10-50 ng/ μ l entsprach. Die Konzentration von Plasmidlösungen sollte hingegen zwischen 30-100 ng/ μ l betragen. Sequenzierungsprimer wurden bei GATC synthetisiert oder, falls vorhanden, 30 μ l einer 1:10 verdünnten Stammlösung (entsprechend 10 μ M) eingeschickt.

2.2.5 Kulturführung von *T. brucei*

2.2.5.1 Anzucht und axenische Kultivierung der Blutformen

Die axenische Kultivierung erfolgte aus Stabilaten. Diese wurden sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoff-Behälter unter fließendem warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon *tube* mit 10 ml kaltem BF-Kulturmedium überführt, und 5 min bei 3 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1.5 ml verworfen, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:100 ausgezählt. Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurde eine Vorkultur auf 1-2.5e5/ml angesetzt, während der die Zellen von einer *lag* Phase in eine exponentielle Wachstumsphase übergehen. Aus dieser wurde eine Hauptkultur (1e5/ml) gestartet, die bei ca 3e6/ml die stationäre Phase erreichte und in der Folge in die Absterbephase überging. Dauerkulturen wurden täglich verdünnt, so daß die Zelldichte stets zwischen 1e5/ml und 1e6/ml lag. Die Zellen differenzierten dann nicht zur *short stumpy*-Form und gingen nicht in die stationäre Phase über.

Zur Kultivierung der Zellen wurden Kulturflaschen verwendet, die über einen Sterilfilter den Gasaustausch mit der im Brutschrank herrschenden Atmosphäre gewährleisteten. Um ein optimales Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu erreichen, wurden 5-10 ml (20-30 ml, 50-60 ml) Kulturen in T-25 (T-75, T-125)-Flaschen gefüllt. 24 *well* Platten wurden mit 1 ml pro *well* beschickt. Der verwendete Brutschrank hielt eine wassergesättigte Atmosphäre mit einem 5%-igen Kohlendioxid-Anteil bei 37 °C aufrecht.

2.2.5.2 Transfektion und Selektion

Eine SMB-Dauerkultur in BF-Medium wurde 5 min bei 3 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und in vorgewärmtem HMI-9 wieder aufgenommen. Durch tägliche Verdünnung wurde die Zelldichte zwischen 1e5/ml und 1e6/ml gehalten. Mit 0.04 µl (2 µg) G418 pro ml Kulturmedium wurde der Verlust der für T7 RNA Polymerase und Tetracyclin-Repressor codierenden Gene verhindert. Für die Elektroporation wurden 2.5e7 Zellen 10 min bei 1000 g und 4 °C abzentrifugiert und in 25 ml eisgekühltem Cytomix gewaschen, erneut zentrifugiert und in 440 µl Cytomix resuspendiert. Die Zelldichte wurde aus einer 1:100 Verdünnung ermittelt. 10 µl (10 µg) *NotI* linearisiertes Plasmid wurde zugegeben und die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Ein Puls von 1.4 kV, 25 µF und ∞ Ω wurde gesetzt, und die Küvette danach sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden gezählt, komplett in 36 ml vorgewärmtes HMI-9 überführt, erneut gezählt und bei 37 °C und 5% CO₂ 6 h inkubiert. Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden 1.44 µl (2 µg/ml) G418 und 1.8 µl (2.5 µg/ml) Hygromycin zugegeben. Die Kultur wurde auf 24 *well* Platten verteilt (1 ml/*well*). Nach 5 Tagen wurden positive *wells* ausgezählt und durch schrittweise Verdünnung in größere Volumina überführt. Ab 10 ml Gesamtvolumen konnte im Rahmen weiterer Verdünnungen auf BF-Medium gewechselt werden. Zugegebenes Medium wurde schrittweise gemischt, um die Adaption zu erleichtern (100%, 66%, 33%, 0% (v/v) HMI-9 in BF-Medium).

2.2.5.3 Induktion

Erfolgreich transfizierte Klone wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf 1e5-5e5/ml verdünnt. Die einzustellende Zelldichte war abhängig vom erwarteten Wachstumsverhalten der Zellen und sollte so gewählt werden, daß 1e6/ml während des Inkubationszeitraumes (i.d.R. 24 h) nicht überschritten wurden. Beispielsweise führten α-Tubulin-defiziente Trypanosomen nur noch eine weitere Zellteilung durch, wodurch die Ausgangskonzentration erhöht werden konnte. Die Kulturen wurden in 60 ml BF-Medium angesetzt und mit 0.5 µg/ml (Kapitel 3.4.1.1) bis 10 µg/ml (Djikeng et al., 2004) Tetracyclin 24 h induziert. Der Nachweis dsRNA konnte frühestens nach 5h erfolgen.

2.2.5.4 Herstellung von Kulturstabilaten

Bei einer Zelldichte von 1e6/ml wurde eine Kultur steril in 50 ml Falcon *tubes* überführt, 10 min bei 3 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, in 10 ml TDB gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in TDB aufgenommen und auf 1e8/ml eingestellt. Unter ständiger Eiskühlung wurden die Zellen 1:1 mit Einfriermedium gemischt und sofort à 500 µl in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden schonend für 1 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.5.5 Giemsa-Färbung und Lichtmikroskopie

Für eine Übersichtsfärbung wurde eine *Giemsa* Lösung aus 800 μl *Giemsa* Stammlösung und 10 ml Weise-Puffer angesetzt. Mehrere Mikroliter einer Zellkultur wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Zellen wurden 3-5 min mit Methanol entwässert und danach 25-30 min mit *Giemsa* Lösung angefärbt. Der Objektträger wurde mit abgekochtem dH_2O abgespült, mit einem Deckglas versehen und unter dem Mikroskop (PHACO und DIC) betrachtet. Aufgenommene Bilder wurden mit *GIMP* bearbeitet.

2.2.6 Northern blot

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von 10 μg RNA wurden ca. 3×10^7 Trypanosomen benötigt. Alle Arbeiten erfolgten mit RNase-freiem Arbeitsmaterial. Die Zellen wurden 10 min bei 3 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und mit einem RNeasy Kit wie folgt prozessiert: Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Zellpellet in 350 μl Puffer RLT resuspendiert und mit 350 μl 70% (v/v) Ethanol gemischt. Das Lysat wurde in RNeasy Ionenaustauschersäulen überführt, 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert und mit 700 μl Puffer RW1 gewaschen. Die Säule wurde auf ein neues Auffanggefäß gesteckt und zweimal mit 500 μl Puffer RPE gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule 1 min bei 13 000 rpm getrocknet. Die Elution erfolgte mit 30 μl ddH_2O .

2.2.6.2 Dot blot Verfahren

Benötigt wurden 2-5 μg gesamt-RNA in 10 μl ddH_2O pro Dot (Djikeng et al., 2004). Die Proben wurden mit 20 μl Formamid, 7 μl Formaldehyd und 2 μl SSC (20x) versetzt und 15 min bei 68 °C inkubiert. Um eine Wiederanlagerung von ssRNA zu verhindern, wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit 78 μl SSC (20x) komplettiert.

Eine Nitrocellulosemembran wurde zugeschnitten, 1 h in SSC (20x) gewässert und in die mit 0.1 N NaOH gereinigte Dot-Blot Apparatur eingelegt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde ein Vakuum vorgelegt, mit dem die vollständig beschickten Kammern jeweils durch die Membran entleert wurden. Alle Kammern wurden zweimal mit 1 ml SSC (10x) gewaschen, danach die Proben aufgetragen, abgesaugt und zweimal mit 1 ml SSC (10x) gewaschen. Die Dots wurden 5 min im Wasserstrahl-Vakuum vorgetrocknet, die Nitrocellulosemembran entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung der RNA erfolgte beidseitig je 150 Sekunden unter ultraviolettem Licht (230 nm)

2.2.6.3 RNA-Gelelektrophorese

Es wurden 2.4 g Agarose eingewogen und in 200 ml FA Gel Laufpuffer (1x) in der Mikrowelle gelöst. In die noch warme Lösung wurden unter dem Abzug 3.6 ml Formaldehyd (37%) und 8 μl Ethidiumbromid zugegeben. Das Gel wurde in einen Schlitten (16x16 cm)

gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur gelagert. Für jede Probe wurden 10 μg RNA in 20 μl ddH₂O mit 4 μl RNA Ladepuffer (5x) gemischt, 15 min bei 68 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Geltaschen wurden beschickt und die Elektrophorese 2 h bei 120 V durchgeführt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Dabei dienten die rRNA-Banden bei 2250 b, 1850 b und 1350 b als Ladekontrolle.

2.2.6.4 Kapillar blot

Die Gelkammer wurde mit SSC (20x) gefüllt. Eine Nitrocellulosemembran wurde zugeschnitten, 1 h in SSC (20x) gewässert. Der RNA-Kapillartransfer erfolgte nach Vorschrift in Sandwich-Anordnung. Nach 24 h wurde der Blot entnommen, zweimal kurz in SSC (2x) gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung der RNA erfolgte beidseitig je 150 Sekunden unter ultraviolettem Licht (230nm)

2.2.6.5 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Für die Synthese $\alpha^{32}\text{P}$ dATP-markierter Sonden wurden Kits der Firmen Amersham (Megaprime Kit) und New England Biolabs (NEBlot Kit) verwendet. Beide Kits basierten auf dem Einsatz randomisierter Oligodesoxynukleotidprimer, die denaturierte *template* DNA an multiplen Stellen binden. Der von (Feinberg and Vogelstein, 1983; Feinberg and Vogelstein, 1984) etablierte Einsatz von Hexanukleotiden wurde von Amersham (bzw. NEB) zur Effizienzsteigerung weiterentwickelt. Hier stellten Nonamerprimer (bzw. Octamer-) eine freie 3'-OH Funktion für das 3' \rightarrow 5' *exo*⁻ Klenow-Fragment der DNA-abhängigen DNA-Polymerase I zur Verfügung.

Bei Einsatz des Megaprime (NEBlot) Kits wurden 40 ng Template DNA ad 21 μl (ad 33 μl) verdünnt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Sofortige 5-minütige Eiskühlung verhinderte eine Wiederanlagerung komplementärer DNA-Stränge. Nacheinander wurden 5 μl Primer und 5 μl Puffer (5 μl kombinierte Primer/Puffer-Lösung), jeweils 4 μl (2 μl) dCTP, dGTP, dTTP, sowie 5 μl \cong 2000 kBq $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (110 TBq/mmol) zugegeben. Die Kettenverlängerung erfolgte 15 min (60 min) bei 37 °C und wurde durch Zugabe von 5 μl 0.2M EDTA pH 8.0 gestoppt. Da die Sonden einzelsträngig vorliegen müssen, wurde der Ansatz erneut 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur Hybridisierung auf Eis gelagert.

2.2.6.6 Hybridisierung, Exposition und Entwicklung

500 mg BSA (1% (w/v)) und 500 ml Lachssperma (1 mg/ml) wurden in 50 ml Hybridmix gelöst. Der Blot mit der quervernetzten RNA wurde 10-15 min in der vorbereiteten Lösung bei 68 °C geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte 24 h im Wasserbad bei 68 °C. Es folgte ein 20-minütiger Waschschriff bei 68 °C in 50 ml Waschpuffer mit 250 mg BSA (0.5% (w/v)), sowie zwei weitere Waschschriffe in 50 ml BSA-freiem Waschpuffer. Der Blot wurde in eine zugeschnittene Frischhaltefolie eingewickelt und die gebundene Aktivität mit einem Geiger-Müller-Zähler gemessen. Die

Radioaktivität wurde um die örtliche Hintergrundstrahlung (Nullpunktmessung) bereinigt. Der so ermittelte Wert diente als Anhaltspunkt zur Berechnung der erforderlichen Belichtungszeit: $110 \text{ IPS} \hat{=} 5 \text{ h}$. Der Röntgenfilm wurde bei -80°C unter Lichtausschluss exponiert und anschließend in einem Röntgenentwickler entwickelt. Zuletzt wurde der Blot dreimal für 20 min bei 68°C in je 50 ml *stripping buffer* gewaschen, wonach er für weitere Hybridisierungen wiederverwendet werden konnte.

2.2.7 Western blot

2.2.7.1 Proteinisolierung

Pro Probe wurden 5×10^6 Zellen abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und unter Eiskühlung 15 min in Lysepuffer lysiert. Die Membranfraktion wurde 1 min bei 13 000 g abgetrennt. Mit Centricons (15 min bei 3 500 rpm) wurden alle Proteine größer als 30 kDa entfernt. Danach wurde die Lösung mit 10 kDa Centricons auf $100 \mu\text{l}$ eingengt und zweimal mit PBS verdünnt, sowie erneut eingengt.

2.2.7.2 SDS-PAGE

Die zu untersuchenden Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist in Kapitel 2.1 aufgelistet. Die Kammern wurden vor Gebrauch sorgfältig mit Aqua dest. und Ethanol gesäubert. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Die Polymerisationszeit beider Gele betrug ca. 45 min. Die Proben wurden zuvor zur Reduktion und Entfaltung 5 min bei 100°C mit der entsprechenden Menge Probenpuffer erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (200 V) unter Wasserkühlung. Sobald die Laufmittelfront (Bromphenolblau) das Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet.

2.2.7.3 Transfer und blotting

Um das Gel zu blotten, wurden drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier, die ebenfalls getränkte Nitrocellulosemembran und dann das Gel vorsichtig auf die Anodenplatte gelegt. Die Schichten wurden mit weiteren drei Lagen Whatman-Papier bedeckt. Bei jedem Schritt wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen Membran, Gel und Filterpapier verblieben. Die blotting Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen und mit 1-2 kg beschwert. Nach 1 h bei 12 V wurde die Membran entnommen und über Nacht in blocking Lösung abgesättigt. Am nächsten Tag wurde die Membran 5 mal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen, dann mit der primären Antikörper-Lösung in eine Folie eingeschweißt und unter Schütteln 1 h inkubiert. Waschen und Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper erfolgten analog. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgten in TBS, da die Alkalische Phosphatase des zweiten Antikörpers mit

Phosphatpuffer inaktiviert würde. Vor der Entwicklung wurde nochmals gewaschen, um dann nach Zugabe der Nachweislösung die Farbreaktion unter ständiger Beobachtung zu starten. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und auf Filterpapier getrocknet.

2.2.8 Elektronenmikroskopie

Für die TEM wurden 1×10^8 Zellen 10 min bei 3 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und zweimal mit TDB gewaschen. Nach der Fixierung mit 2% Glutaraldehyd für 1 h bei 4 °C, wurden die Zellen viermal mit Cacodylatpuffer gewaschen und nochmals 1 h bei 4 °C in 1.5% Osmiumtetroxid fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut einmal mit Cacodylatpuffer und dreimal mit ddH₂O gewaschen, um sie schließlich 1 h bei Raumtemperatur mit 0.5% Uranylacetat zu kontrastieren. Zur Entwässerung wurde einmal mit ddH₂O und jeweils 5 min mit 50%, 70%, 95%, dreimal mit 100% Ethanol und dreimal mit Propylenoxid gewaschen. Für die Einbettung der Zellen wurden diese in 50% Eponharz (in Propylenoxid) aufgenommen. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Probe mittels reinem Eponharz in Beem-Cups überführt und nochmals 1 h stehen gelassen. Zur endgültigen Aushärtung wurde das Eponharz im Überstand gewechselt, und die Probe 12 h bei 45 °C und 24 h bei 60 °C polymerisiert. Nach der Aushärtung des Harzes wurden die Beem-Cups entfernt und die Spitze der Einbettung zu einem Trapez mit einer Basislänge von ca. 0.5 mm getrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit dem Kupfergrid gefischt. Um die Schnitte anzufärben, wurde ein Tropfen einer Uranylacetatlösung auf Parafilm gegeben, die Grids mit der Oberseite nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrastierung wurden die gefärbten Grids mit ddH₂O gewaschen, für 45 Sekunden in eine Bleicitrat-Lösung gedippt, dann mit einem scharfen Strahl sterilfiltriertem ddH₂O abgespült, getrocknet und unter dem Elektronenmikroskop betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung

3.1.1 Sequenzanalysen von ATG8

In *Trypanosoma brucei* stellten die drei Gene ATG8.1A (Tb927.7.5900 bzw. Tb07.10C21.-50), ATG8.1B (Tb927.7.5910 bzw. Tb07.10C21.40) und ATG8.2 (Tb927.7.3320 bzw. Tb07.28B13.800) potentielle Orthologe zu *Saccharomyces cerevisiae* ATG8 dar (Herman et al., 2006). Solange nicht geklärt war, welches der Orthologe in Trypanosomen tatsächlich an autophagischen Prozessen beteiligt war, sollte zunächst eine Phänotypisierung auf der Grundlage eines triple *knockdown* durchgeführt werden.

Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang (Kapitel A.1) aufgelistet. Sequenzvergleiche (NCBI, 2008) von ATG8.1A und ATG8.1B ergaben eine 95% Homologie auf Nukleotidebene (285 von 297 verglichenen Basen identisch). ATG8.1A bestand aus 351 Nukleotiden, deren Translationsprodukt C-terminal auf Glycin endet. Damit lag ATG8.1A bereits in der aktiven Form vor und muss nicht mehr von ATG4 (*autophagin*) proteolytisch aktiviert werden. Das größere ATG8.1B (363 Nukleotide) war um einen Cysteinrest verlängert, die Freilegung des reaktiven Glycinrestes erfolgte durch ATG4-vermittelte Spaltung (Ichimura et al., 2000). Für die Positionen #92-#339 (Kapitel A.1) in ATG8.1A, bzw. #101-#348 in ATG8.1B bestand ein 248 Nukleotide umfassender Bereich vollständiger Sequenzhomologie. Ein kombinierter *knockdown* erschien hier besonders leicht zugänglich, da entsprechend ausgewählte siRNA den Abbau der Gentranskripte sowohl von ATG8.1A, als auch ATG8.1B initiieren konnte. ATG8.2 wies zu den Genen ATG8.1A und ATG8.1B keine Homologie auf Nukleotidebene auf. Ein triple *knockdown* aller ATG8-Gene erforderte daher die Konstruktion eines Vektors, der siRNA sowohl für ATG8.1A/B, als auch ATG8.2 generierte. Dennoch war das 405 Nukleotide große ATG8.2 auf Proteinebene zu 34% zu den ATG8.1 Homologen identisch. C-terminale Aminosäure war Glycin,

wodurch die direkte Konjugation an Phosphatidylethanolamin ohne ATG4-Prozessierung möglich sein sollte.

3.1.2 Präparation des p2T7 RNAi Vektors

Das TrypanoFAN Projekt (Field, 2008) stellte mit dem Plasmid p2T7 ein System zur Verfügung, das einen induzierbaren RNAi *knockdown* in *T. brucei* ermöglicht. Der Vektor (Abbildung 3.1) erlaubte die direkte TA-Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen in *Eam1105I*-Schnittstellen. Das integrierte Gen für Ampicillinresistenz ermöglichte die Selektion von transformanten *E. coli* Zellen, ein *LacZ-stuffer* in der Klonierungsstelle diente der IPTG-induzierten blau/weiß-X-Gal-Selektion von Rekombinanten. Die Aufnahme in Trypanosomen erfolgte mittels Elektroporation des *NotI*-linearisierten Vektors. Über ribosomale *spacer* Regionen inserierte der Vektor via homologer Rekombination in das Trypanosomengenom. Der Verlust des Konstrukts wurde über Hygromycin-vermittelten Selektionsdruck verhindert. Zur Expression von dsRNA mussten die Wirtszellen über T7 Polymerase, zur Induzierbarkeit zusätzlich über Tet-Repressor verfügen (T7RNAP::TETR::NEO) (Wirtz et al., 1999; Shi et al., 2000). Das Gen NeoR codierte für Resistenzen gegen Neomycin, Kanamycin und Geneticin (G418). Es konnte sowohl pro-, als auch eukaryontisch exprimiert werden. Entsprechend wirkten diese drei Antibiotika hemmend auf NeoR^{neg} Bakterien. Eukaryonten sind nur G418-sensitiv: Da Neomycin und Kanamycin keinen zytostatischen/-toxischen eukaryontischen Effekt hatten, wurde der Verlust von T7-RNA-Polymerase und Tetracyclin-Repressor über NeoR^{pos} Selektion in Trypanosomen nur durch G418 verhindert. p2T7 enthielt in *sense* und *antisense* Richtung T7 *promotor* und Tet *repressor* Regionen, sowie je zwei hintereinander gereichte T7 *terminator* Regionen (Alibu et al., 2005):

Position	Länge	Gen
#0001-0592	592 bp	rDNA <i>spacer targeting fragment</i>
#0593-3116	2524 bp	Vektor (pUC/pGEM)
#3117-3412	296 bp	<i>T. brucei</i> Aktin mRNA 3'
#3413-4435	1023 bp	Hygromycin B Phosphotransferase ORF
#4436-4570	135 bp	<i>T. brucei</i> Aktin mRNA 5'
#4571-4865	295 bp	rDNA <i>promotor</i>
#4866-5338	473 bp	2x T7 <i>terminator</i>
#5339-5358	20 bp	T7 <i>promotor</i>
#5359-5418	60 bp	Tet Operator
#5419-6231	813 bp	LacZ <i>stuffer</i>
#6232-6318	87 bp	Tet Operator
#6319-6338	20 bp	T7 <i>promotor</i>
#6339-6740	402 bp	2x T7 <i>terminator</i>

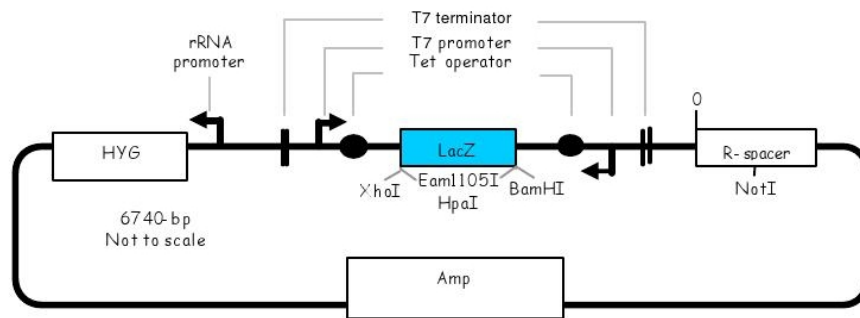
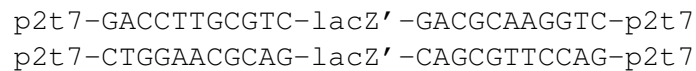


Abbildung 3.1: p2T7 RNAi Vektor (Field, 2008)

Das Plasmid p2T7:TABBlue wurde in *E. coli* vermehrt, bei einer OD_{600nm} von 1.8 in einer Midi-Plasmidpräparation aufgereinigt und spektrometrisch quantifiziert. 28 μg Plasmid wurden mit 10 U *Eam1105I* 3 Stunden beiderseits der Klonierungsstelle geschnitten, so daß überhängene T-Enden entstanden (Abbildung 3.2). Die Vollständigkeit der Restrikti-

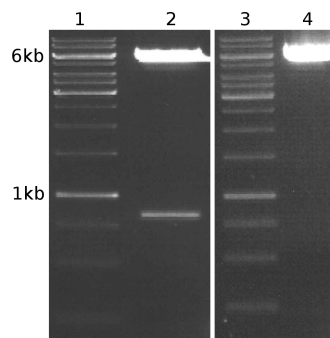


/ Eam1105I \



Abbildung 3.2: Vorbereiten der p2T7 Klonierungsstelle

on wurde mit geringen Volumina gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3.3). Im Vergleich mit dem Größenmarker *GeneRuler* 1kb lieferte das linearisierte Plasmid eine einzelne Bande bei 6000 bp (erwartet: 5927 bp), der *LacZ* *stuffer* lag zwischen 750 bp und 1000 bp (erwartet: 813 bp). Der restliche Restriktionsansatz wurde mittels Gelextraktion aufgereinigt und als $c=0.22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($OD_{260nm/280nm}=2.20$) in 100 μl ddH₂O eluiert.

Abbildung 3.3: 1% (w/v) Agarose-GE, 1:GeneRuler 1kbp, 2:p2T7 *Eam1105I*, 3:GeneRuler 1kbp, 4:p2T7 *Eam1105I* nach Gelextraktion

3.1.3 ATG8.1 A/B - ATG8.2 triple knockdown

Primerdesign

Für den homologen Sequenzbereich von ATG8.1A und ATG8.1B (und ebenso für einen Teilbereich des Gens ATG8.2) wurden geeignete Primer konstruiert, die 5'-terminal um verschiedene Restriktionsschnittstellen ergänzt wurden. Insbesondere wird auf die Erkennungsstelle für *Bse*YI am 3'-Terminus von ATG8.1A hingewiesen. Dieselbe Erkennungsstelle wurde am 5'-Terminus des ATG8.2 PCR-Produkts eingeführt. Durch den Verdau beider Schnittstellen liessen sich zueinander komplementäre Enden darstellen, die eine Ligation beider Amplimere ermöglichten. Vier Nukleotide umfassende *clamps* erleichterten dabei die Anlagerung der Restriktionsenzyme. Für eine PCR wurden 50 ng BF221 genomische DNA als *template* eingesetzt. Mit 30 Zyklen und einer *annealing temperature* von 54 °C wurde für das Primerpaar ATG8.1(A&B)-*se/as*-TripleKO (Kapitel 2.1) ein Produkt von 219 bp erwartet, für ATG8.2-*se/as*-TripleKO ein Produkt von 287 bp. Abbildung 3.4 a) zeigt die zugehörigen Banden bei gelelektrophoretischer Kontrolle.

Das ATG8.1 Amplimer enthält eine Schnittstelle für *pvu*II, wobei Abbauprodukte von

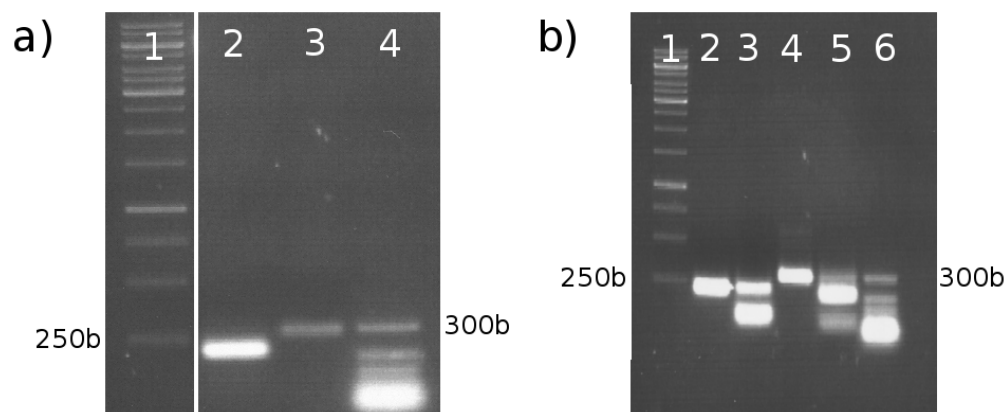


Abbildung 3.4: a) 1% (w/v) Agarose-GE. 1:GeneRuler 1kb, 2:ATG8.1 PCR, 3:ATG8.2 PCR, 4:GeneRuler ultra low range; b) 1% (w/v) Agarose-GE, 1:GeneRuler 1kb, 2:ATG8.1, 3:ATG8.1/*pvu*II, 4:ATG8.2, 5:ATG8.2/*Sap*I, 6:GeneRuler ultra low range

ATG8.1:
 TAGT-**ACTGT**-CCGATATTGGT**GAGTTAGACAGG**-TGTAATTTCTCGTCCCATCTGATCTAACGGT**CGGACAGTTTGT**CAGCGTGC
 TACGCAAACGTGTGCAGCTGGAAGCCGAATCTGCACTCTCGTTTTATACCAATGACACAGTACTCCCTCCAGTGCACAAATGGCGG
 ACATTACTCCAAATAT-AAGGATGAAGACGGTTTCCTA-**CCCAGC**-AGCT (219 bp)

ATG8.2:
 TAGT-**CCCAGC**-AACACATTCCCATCCTTTGC-GAGCCCACTTCAGCCGCTAGCGCCTCTACACCGCGTGATGTGAGGCTCTTCTCC
 ACACGGCAGCAGGTGCAGCGCGAGCTGGACTGTAATAAGTTTCTTCTCCCTGAAACTGCTACCGTTATGGAGTTCATGATGGCGCTG
 CGGCAGCGGCTGCTGCTAGAAAGAGGGTCAAGCCGTATTTGTGTTTATAGGAAATGAACTACCGCCGAACAGTGCCTTGGGAGAC
 -ATTTACGCAAGGGCAAAGA-**ACAGT**-AGCT (287 bp)

Abbildung 3.5: PCR Produkte für ATG8.1(A&B)-*se/as*-TripleKO und ATG8.2-*se/as*-TripleKO

101 bp und 118 bp Länge entstehen. ATG8.2 wird von *SapI* in 82 bp und 205 bp fragmentiert. Ein Restriktionsverdau mit 10 μ l PCR Ansatz lieferte dabei das in Abbildung 3.4 b) gezeigte Bandenmuster. Die korrekte Amplifikation von ATG8.1 und ATG8.2 mit den vorliegenden Sonden wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

Sequenzierungslauf	abgedeckter Bereich	Fehler	Bewertung
ATG8.1 <i>forward</i>	#145 - #315 (Endposition)	Lesefehler @ #155 Deletion @ #156	<i>antisense run</i> ok Rohdaten ok (vgl. Abb. 3.6)
ATG8.1 <i>reverse</i>	#115 (Endposition) - #269	Lesefehler @ #242 Lesefehler @ #243	in <i>sense run</i> ok in <i>sense run</i> ok
ATG8.2 <i>forward</i>	#121 - #353 (Endposition)	Lesefehler @ #135	in <i>antisense run</i> ok
ATG8.2 <i>reverse</i>	#86 (Endposition) - #321	Lesefehler @ #318	in <i>sense run</i> ok

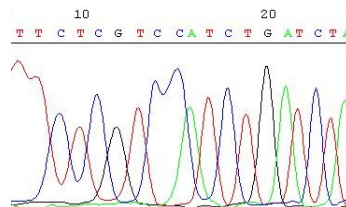


Abbildung 3.6: ATG8.1 *sense* Rohdaten @ #155-6: Die automatisiert ausgelesene Sequenz (...TCCNTCTG...) beinhaltet eine nicht erkannte Base, sowie die Auslassung eines Adenins, das in den Rohdaten jedoch vorhanden ist. In *antisense* Richtung ist die Sequenz vollständig korrekt (...TCCCATCTG...).

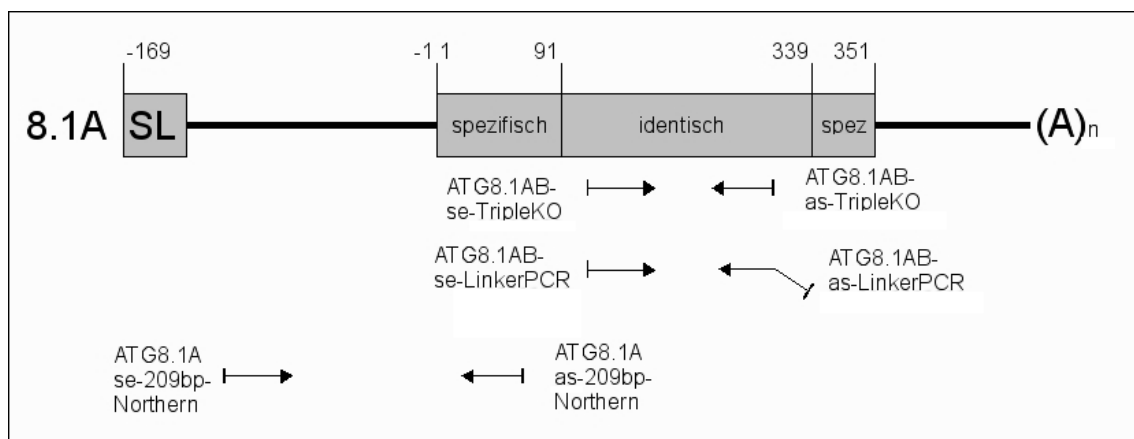
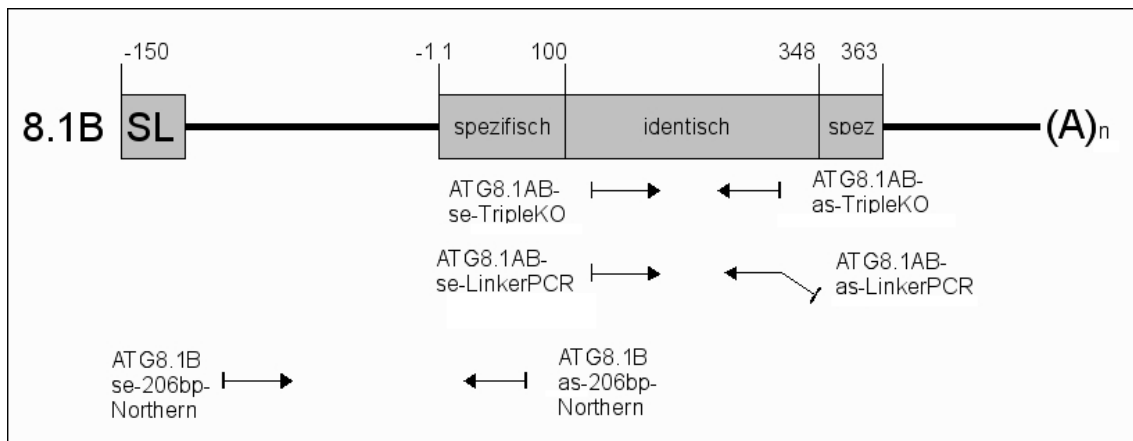
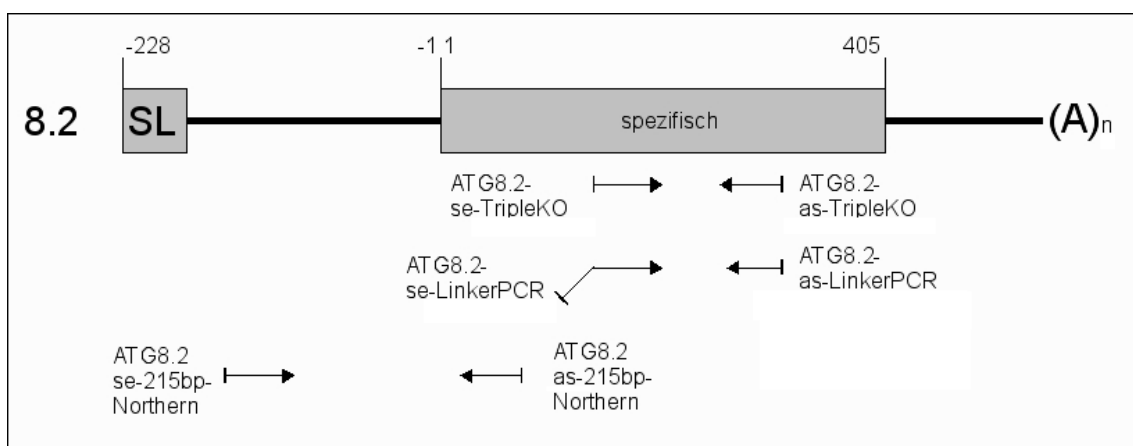


Abbildung 3.7: Position der für RNAi und *Northern blot* eingesetzten Primer für ATG8.1A

RNAi Konstruktion mit Subklonierung

Die PCR Produkte sollten über eine Subklonierung in einen *TOPO* Vektor eingebracht werden, um sie in *E. coli* weiter zu amplifizieren. Dieses Vorgehen hätte beliebig viel

Abbildung 3.8: Position der für RNAi und *Northern blot* eingesetzten Primer für ATG8.1BAbbildung 3.9: Position der für RNAi und *Northern blot* eingesetzten Primer für ATG8.2

Ausgangsmaterial für nachfolgende Schritte geliefert. Zudem lassen sich Nukleinsäuren, die *in vivo* vermehrt wurden, leichter enzymatisch prozessieren, als die unmittelbaren PCR Produkte. Für die Subklonierung wurde das *TOPO TA cloning* Kit verwendet, das PCR Produkte mit 3'-terminalen Adenosin-Überhängen in wenigen Schritten in *E. coli* kloniert. Dies wird über einen linearisierten Subklonierungsvektor erreicht, dessen Enden von einzelnen 3'-Thymidin-Überhängen flankiert werden, die jeweils kovalent an eine Tyrosinseitenkette der Topoisomerase I gebunden sind. Die so konservierte Energie wird nach Anlagerung der PCR-Produkte zur Ligation genutzt. Die Wiedergewinnung aus den Plasmiden hätte über die *TOPO* Schnittstellen erfolgen können; ATG8.1 und ATG8.2 wären danach über eine sticky end-Ligation der *Bse*YI Schnittstelle verknüpft worden.

<p>ATG8.1 (A&B) SE: 5'-tagt-ACTGT-CCGATATGGTGAGTTAGACAGG-3' AS: 5'-agct-GCTGGG-TAGGAAACCGTCTTCATCCTT-3'</p>	<p>ATG8.2 SE: 5'-tagt-CCCAGC-AACACATTCCCATCCTTTGC-3' AS: 5'-agct-ACTGT-TCTTTTGCCCTTGGCGTAAAT-3'</p>
5'-clamp-TaaI-ATG8.1 (A&B)-BseYI-clamp-A-3'	5'-clamp-BseYI-ATG8.2-TaaI-clamp-A-3'
3'-A-clamp-TaaI-ATG8.1 (A&B)-BseYI-clamp-5'	3'-A-clamp-BseYI-ATG8.2-TaaI-clamp-5'
5'-tagt- ACTGT-ATG8.1 (A&B)-CCCAGC-agct -A-3'	5'-tagt- CCCAGC-ATG8.2-ACAGT-agct -A-3'
3'-A-atca-TGACA-ATG8.1 (A&B)-GGGTCG-tcga-5'	3'-A-atca-GGGTCG-ATG8.2-TGTCAtcga-5'

```

| Subklonierung in TOPO Vektor und Wiedergewinnung |
| über TOPO Schnittstelle (HindIII, KpnI, SacI, |
| BamHI, SpeI) und BseYI |
5'-TOPO-tagt-ACTGT-ATG8.1 (A&B) -C-3'          5'-CCAGC-ATG8.2-ACAGT-agct-TOPO-3'
3'-TOPO-atca-TGACA-ATG8.1 (A&B) -GGGTC-5'      3'-G-ATG8.2-TGTCA-tcga-TOPO-5'

\          sticky-end Ligation          /
\    PCR mit ATG8.1SE und ATG8.2AS    /

5'-tagt-ACTGT-ATG8.1 (A&B) -CCCAGC-ATG8.2-ACAGT-agct-A-3'
3'-A-atca-TGACA-ATG8.1 (A&B) -GGGTCG-ATG8.2-TGTCA-tcga-5'

\ in p2T7 ligieren /

p2t7-GACCTT-tagt-ACTGT-ATG8.1 (A&B) -CCCAGC-ATG8.2-ACAGT-agct-AAGGTC-p2t7
p2t7-CTGGAA-atca-TGACA-ATG8.1 (A&B) -GGGTCG-ATG8.2-TGTCA-tcga-TTCCAG-p2t7

```

ATG8.1 und ATG8.2 wurden amplifiziert (ATG(A&B)-se/as-TripleKO, ATG8.2-se/as-TripleKO, 40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C) und gemäß dem Invitrogen *TOPO TA cloning* Protokoll in chemisch kompetente *TOP10* Zellen kloniert. Für ATG8.1 sind nur

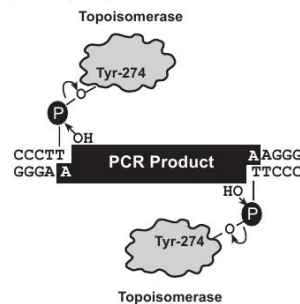


Abbildung 3.10: Ligation mit Invitrogen *TOPO TA cloning* Kit

blaue und hellblaue Transformanten gewachsen. Es war deshalb davon auszugehen, daß die aufgenommenen Plasmide selbstligiert wurden. Für ATG8.2 wurden blaue und weiße Kolonien erhalten. Aus beiden Ansätzen wurden einige blaue und weiße (bzw. hellblaue) Klone gepickt und in Flüssigkultur angezüchtet. Die Plasmidisolierung wurde nach dem Ethanolpräzipitationsprotokoll durchgeführt. Bei einer anschließenden Restriktionsanalyse wurden folgende Fragmentlängen erwartet:

TOPO		TOPO.ATG8.1	TOPO.ATG8.2	
<i>pvuII</i>	<i>SapI</i>	<i>pvuII</i>	<i>pvuII</i>	<i>SapI</i>
2433,	1922,	2433,	2433,	1922,
717	1799,	717,	717,	1702,
421	210 bp	360,	708,	384,
360 bp		340,	360 bp	210 bp
		300 bp		

Für hellblaue ATG8.1-Kolonien entsprachen die vier Banden einem selbstligierten (nicht inserierten) *TOPO* Vektor (Abbildung nicht gezeigt). Auch bei wiederholten Subklonierungen wurden keine rein weissen Kolonien erhalten. Hier lag kein korrekter Einbau des

PCR-Produktes vor. Der Plasmidverdau weißer ATG8.2-Kolonien ergab nur drei eindeutig definierbare Banden. Die gelelektrophoretische Auflösung der *pvuII* Fragmente mit 360/421 bp für selbstligierte Vektoren und 708/717 bp für rekombinante Vektoren war nicht optimal. Dennoch wies die weiße Kolonie bei ca 700 bp eine Doppelbande auf, während die blaue Kolonie zwischen 250 und 500 bp eine Doppelbande lieferte. Für den

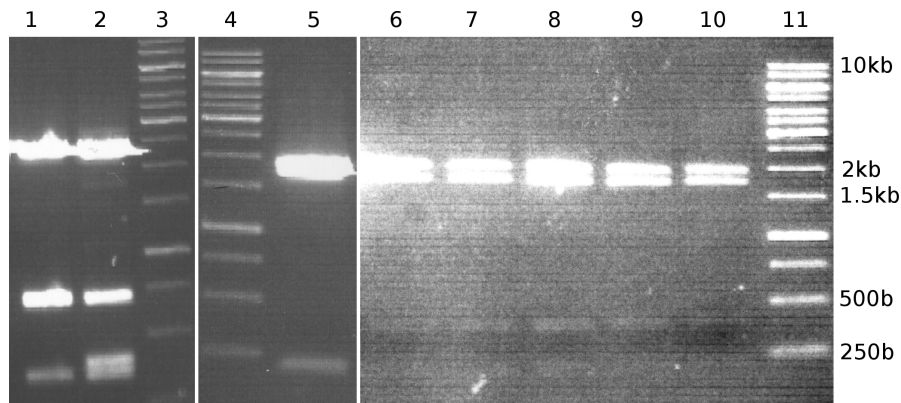


Abbildung 3.11: Alle Klone TOPO.ATG8.2. 1:weißer Klon I (*pvuII*), 2:blau (*pvuII*), 3+4:*GeneRuler* 1kb, 5:blau (*SapI*), 6-10:weiße Klone I-V (*SapI*), 11:*GeneRuler* 1kb

Verdau mit *SapI* entsprachen die Banden der blauen und weißen Kolonien den *in silico* Vorhersagen. Bei den rekombinanten Plasmiden trat wie erwartet eine Bande bei 384 bp. Die erhaltenen Daten bestätigten, daß ATG8.2 erfolgreich in den *TOPO* Vektor subkloniert und in *TOP10* Zellen vermehrt wurde. Entsprechende Versuche für ATG8.1 blieben erfolglos.

RNAi Konstruktion ohne Subklonierung

Für ATG8.2 wurden rekombinante *TOPO-TOP10* Zellen erhalten, nicht jedoch für ATG8.1. Somit konnten die zur konventionellen Ligation beider PCR Produkte notwendigen Stoffmengen nicht über Subklonierungsverfahren *in vivo* dargestellt werden. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, die PCR Produkte direkt zu prozessieren, d.h. auf eine intermediäre Subklonierung zu verzichten. Die Amplimere wurden über eine PCR *purification* aufgereinigt, unmittelbar mit *BseYI* verdaut, über eine Gelextraktion aufgereinigt und anschließend ligiert. Die dabei zu erwartende geringe Ausbeute könnte theoretisch durch PCR Amplifikation des ATG8.1-ATG8.2 Addukts kompensiert werden. Tatsächlich wurden Fragmente korrekter Größe erhalten (Abb. 3.12), die jedoch bei eingehender Untersuchung als fehlerhaft eingestuft werden mussten.

RNAi Konstruktion mit PCR Ligation

Die PCR Ligation stellt eine Methode dar, die Einzelstränge zweier PCR Produkte über Primer-gekoppelte Ankersequenzen zu hybridisieren und zu doppelsträngiger DNA aufzufüllen (Richmond and Smith, 2007). Damit wäre eine Subklonierung nicht notwendig.

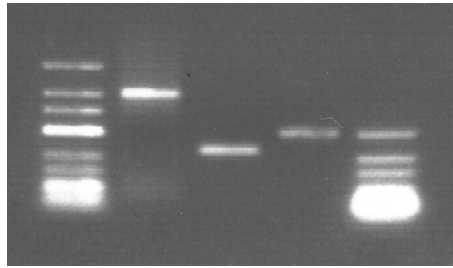


Abbildung 3.12: 1:GeneRuler low range, 2:PCR mit ATG8.1(A&B)-se-TripleKO und ATG8.2-as-TripleKO, 3:ATG8.1, 4:ATG8.2, 5:GeneRuler ultra low range

Die zu Beginn verwendeten Primer wurden entsprechend angepasst, d.h. ATG8.1(A&B)-se-LinkerPCR und ATG8.2(A&B)-as-LinkerPCR wiesen keine Restriktionsstellen und *clamps* mehr auf. In ATG8.1(A&B)-as-LinkerPCR und ATG8.2-se-LinkerPCR wurden die Restriktionsstellen und *clamps* zudem gegen einen 22 Nukleotide umfassenden Anker ausgetauscht, so daß die Ankersequenzen der genannten Primer zueinander komplementär waren. Ferner wurde die Primersequenz aus ATG8.1(A&B)-as-TripleKO bei ATG8.1(A&B)-as-LinkerPCR um ein Adenosin verlängert, um die Komplementarität zum 3'-A-Überhang des ATG8.2 PCR Produktes zu gewährleisten. Dabei stieg die Schmelztemperatur auf 58.2 °C.



Ausgehend von jeweils 1 µl BF221 genomischer DNA (50 ng/µl) wurden die PCR Produkte mit den neuen Primern (40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C) in guter Ausbeute erhalten (ATG8.1: 223bp und ATG8.2: 290 bp, Abbildung 3.13 links). ATG8.2 wurde dabei etwas schwächer amplifiziert.

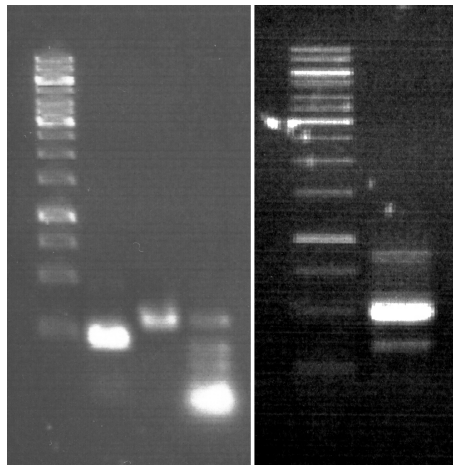


Abbildung 3.13: 1% (w/v) Agarose-GE, links: 1:GeneRuler 1kb, 2:ATG8.1, 3:ATG8.2, 4:GeneRuler ultra low range, rechts: 1:GeneRuler 1kb, 2:ATG8.1-ATG.8.2-Addukt

Die PCR Ansätze wurden mittels PCR *purification* aufgereinigt, die Eluate vereinigt und mit *HotStarTaq MasterMix* versetzt. Die Ligation erfolgte in 40 Zyklen mit 57 °C *annealing temperature*. Der Ligationsansatz lieferte in einer 1% (w/v) Agarose-Gelelektrophorese noch keine definierte Bande bei 491bp (nicht gezeigt). Allerdings wurden 7 μ l erfolgreich als *template* einer weiteren PCR mit den randständigen Primern eingesetzt (Abbildung 3.13 rechts). Der PCR Ansatz wurde in einem 1% (w/v)-igem Agarosegel

ATG8.1-Linker-ATG-8.2: Länge: 491 bp (492 bp mit A-Überhang)
 CCGATATTGGTGAGTTAGACAGG-TGTAAATTTCTCGTCCCCTCTGATCTAACGGTCGGACAGTTTGTTCAGCGTGCTACGCAAACGTGT
 GCAGCTGGAAGCCGAATCTGCACTCTTCGTTTATACCAATGACACAGTACTCCCCCTCCAGTGCGCAAATGGCGGACATTTACTCCAAAT
 AT-AAGGATGAAGACGGTTTCCTAT-tgacgggtccgtaagtttaaacg-AACACATTTCCCATCCTTTGC-GAGCCCACTTCAGCCGCTA
 GCGCCTCTACACCGCGTGATGTGAGGCTCTTCTCCACACGGCAGCAGGTGCAGCGCGAGCTGGACTGTAATAAGTTCTTCTCCCTGAA
 ACTGCTACCGTTATGGAGTTCATGATGGCGCTGCGGCAGCGGCTGCTGCTAGAAAGAGGGTCAAGCCGTATTTGTGTTTATAGGAAATGA
 ACTACCGCCGAACAGTGCCTGCTTGGGAGAC-ATTTACGCAAGGGCAAAGA (-A)

Abbildung 3.14: ATG8.1-ATG.8.2-Addukt

aufgetrennt, das Addukt ausgeschnitten, säulenchromatographisch gereinigt und mit 25 μ l ddH₂O eluiert ($c=0.102 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}} = 2.10$). Die Ligation in p2T7 erfolgte mit einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert zu Vektor) (OpenWetWare, 2008), wobei die eingesetzten Massen gemäß Gleichung 2.5 wie folgt berechnet wurden:

$$Masse_{ATG8.1-ATG8.2}[ng] = 3x \frac{Basenpaare_{ATG8.1-ATG8.2}}{Basenpaare_{p2T7}} x Masse_{p2T7}[ng] \quad (3.1)$$

$$Masse_{ATG8.1-ATG8.2}[ng] = 3x \frac{491bp}{5927bp} x 200ng = 50ng \quad (3.2)$$

Der Ligationsansatz wurde bei schrittweise abnehmender Temperatur inkubiert (Kapitel 2.2.4.7). Ein ähnliches (allerdings cyclisches) Temperaturschema wurde in der Literatur zur Steigerung der Klonierungseffizienz beschrieben (Lund et al., 1996).

Der Ligationserfolg war mit Hilfe einer Gelelektrophorese nicht nachzuweisen (nicht gezeigt), was allerdings keine Aussage über den tatsächlichen Verlauf zulässt. Eine Transformation mit 5 μl des Ligationsansatzes führte zum Wachstum zahlreicher, Ampicillin-resistenter Klone. Ein blau/weiß *screening* war an dieser Stelle nicht möglich, da das LacZ bei den Vorbereitungsarbeiten (Kapitel 3.1.2) entfernt worden war. 9 Klone wurden gepickt und kultiviert, von denen die Klone III und IV für eine Plasmid-Minipräparationen verwendet wurden. Diverse Restriktionsverdauungen mit je 1 μg Plasmid hätten bei erfolgreicher Rekombination nachstehende Fragmentlängen ergeben; das erwartete Konstrukt trat jedoch nicht auf (Abbildung 3.15).

NotI	pvuII	SapI	HpaI	PCR
≈ p2T7	≈ ATG8.1	≈ ATG8.2	Insert freisetzen	
6412 bp	6412 bp	4110, 1354, 948 bp	5904, 508 bp	492 bp

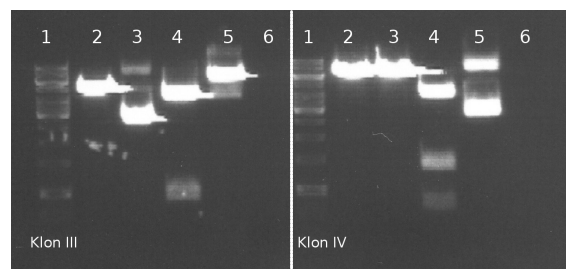


Abbildung 3.15: Restriktionsanalyse der Klone III und IV. 1% (w/v) Agarose-GE. 1:GeneRuler 1kb, 2:NotI, 3:pvuII, 4:SapI, 5:HpaI, 6:PCR ATG8.1-8.2

Im Rahmen eines schnellen *screenings* wurde eine *quick&dirty* PCR (40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C) der Klone I,II,IV,V,VI,VII und des ATG-8.1-8.2-Addukts als Positivkontrolle durchgeführt (Abbildung 3.16). Die Klone I und VI des PCR Assays waren positiv. Klon VI wurde in Flüssigkultur angezüchtet und zur Plasmid-Minipräparation genutzt

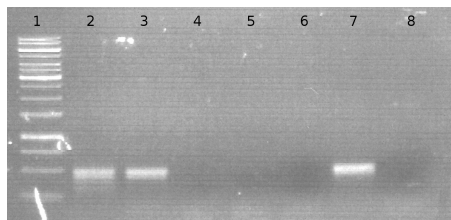


Abbildung 3.16: *quick&dirty* PCR *screening*. 1:GeneRuler 1kb, 2:Positivkontrolle, 3:Klon I, 4:Klon II, 5:Klon IV, 6:Klon V, 7:Klon VI, 8:Klon VII

($c=0.125 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}=2.20$). Es folgte eine ausführliche Restriktionsanalyse

mit *Not I*, *pvuII*, *SapI*, *HpaI*. Parallel dazu wurden drei PCRs mit den Primerkombinationen ATG8.1(A&B)-se/as-LinkerPCR, ATG8.2-se/as-LinkerPCR und ATG8.1(A&B)-se-LinkerPCR / ATG8.2-as-LinkerPCR mit 40 Zyklen und 57 °C *annealing temperature* durchgeführt (Abbildung 3.17).

Die Banden des Verdaus mit *NotI*, *SapI*, *HpaI* und der PCR von ATG8.1-8.2 entsprachen

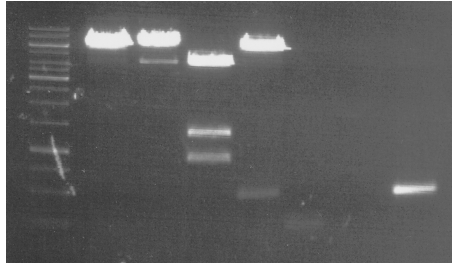


Abbildung 3.17: Restriktionsanalyse von Klon VI. 1:GeneRuler 1kb, 2:*NotI*, 3:*pvuII*, 4:*SapI*, 5:*HpaI*, 6:PCR ATG8.1, 7:PCR ATG8.2, 8:PCR ATG8.1-8.2

den Erwartungen. Die Linearisierung mit *pvuII* lieferte neben der vorhergesagten Bande bei 6412 bp noch eine weitere, schwache Bande, die als überspiralisiertes (unvollständig geschnittenes) Plasmid gedeutet wurde. Die PCR von ATG8.1 führte nur zu einer schwachen Amplifikation, ATG8.2 konnte nicht nachgewiesen werden. Dies kann jedoch auch auf eine fehlerhafte PCR zurückzuführen sein. Zusammenfassend war davon auszugehen, daß es sich bei dem präparierten Plasmid um ein korrektes p2T7-ATG8.1-ATG8.2 Konstrukt handelte. Diese Vermutung wurde durch eine Sequenzierung unter Verwendung des p2T7 PVS Primers (5'-CCGCTCTAGAACTAGTGGA-3') abgesichert. Die auftretenden Deletionen stellten keine kritische Beeinträchtigung für die Wirksamkeit des Konstruktes in RNAi-Experimenten dar, da die RNAi-Ziel mRNA durch nur 21 Basen umfassende siRNA Fragmente erkannt wird (vgl. Anhang A.2.1.1). Es wurden *E. coli* Stablate hergestellt. Eine Plasmid-Midipräparation lieferte das Konstrukt in großer Ausbeute (300 µl mit $c=0.65 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}=2.28$).

3.1.4 ATG8.1 A/B double *knockdown*

Ausgehend von BF221 genomischer DNA lieferte eine PCR mit ATG8.1(A&B)-se/as-LinkerPCR Primern (40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C) und anschließender Gel-extraktion 25 µl Produkt mit $c=0.065 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}=2.0$. Für die Ligation in den p2T7 Vektor wurden nach Gleichung 2.5

$$\text{Masse}_{\text{ATG8.1}}[\text{ng}] = 3 \times \frac{223\text{bp}}{5927\text{bp}} \times 200\text{ng} = 23\text{ng} \quad (3.3)$$

des Amplimers eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei cyclisch wechselnden Temperaturen von 30 °C, 22 °C, 16 °C und 4 °C. Jede Stufe wurde 5 min gehalten. Mit

3.1.5 ATG8.2 single *knockdown*

Für die Konstruktion von ATG8.2 single-*knockdown* RNAi Vektoren wurde eine PCR mit dem Primerpaar ATG8.2-se/as-TripleKO durchgeführt (40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C). Das PCR Produkt wurde nach einer Gelextraktion in 25 µl ddH₂O eluiert (c=0.07 µg/µl bei OD_{260nm/280nm}= 2.0). Für die Ligationsansätze mit *Eam1105I* geschnittenem Vektor wurde für ein 1:3 Verhältnis (Plasmid:Insert) gewählt:

$$Masse_{ATG8.2}[ng] = 3x \frac{287bp}{5927bp} x 200ng = 29ng \quad (3.4)$$

Die Ligation erfolgte mit schrittweise abnehmenden Temperaturen und anschließender Hitzeinaktivierung. 5 µl des Ligationsansatzes wurden für eine Transformation in chemisch kompetente *TOP10* Zellen eingesetzt. Drei transformante Klone wurden mittels *quick&dirty* PCR analysiert (Abbildung 3.20).

Alle untersuchten Klone zeigen eine Bande bei 287 bp und waren damit rekombinant.

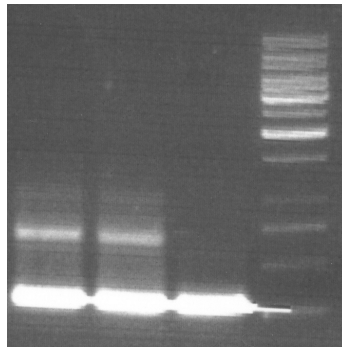


Abbildung 3.20: *quick&dirty* PCR, 1% (w/v) Agarose-GE. 1-3:p2T7.ATG8.2 Transformanten I-III, 4:GeneRuler 1kb

Mehrere Geisterbanden zeugten von unerwünschten Nebenprodukten, wie sie unter den Bedingungen einer *quick&dirty* PCR in der Regel auftreten. Klon III wurde zur Anzucht einer 100 ml Kultur genutzt. Eine Midi-Plasmidpräparation (c=1.74 µg/µl bei OD_{260nm/280nm}= 2.28) diente als Basis einer weiteren PCR mit ATG8.2-se/as-TripleKO Primern (Positivkontrolle) und ATG8.1(A&B)-se/as-TripleKO (Negativkontrolle) (Abbildung 3.21). Allerdings gelang der Negativnachweis des nicht verwendeten ATG8.1 ebenfalls, reproduzierbar und unter sauberen Arbeitsbedingungen. Auch nichtinsetiertes p2T7 erschien nicht kontaminationsfrei. Dies ist für eine sensitive Methode wie die PCR bereits bei minimalster Kontamination möglich. Dennoch besteht die Gefahr, daß die Konstrukte später zu *off-target* Effekten führen. Sicherheitshalber wurde eine Re-Transformation mit 50 ng Plasmid in chemisch kompetenten *XLI Blue* Zellen durchgeführt. Von 3 Klonen wurden Plasmidpräparationen durchgeführt, die als *template* für PCR-Analysen dienten (erneut beide Primerpaare, 40 Zyklen, *annealing temperature* 54 °C). Wie in Abbildung 3.22 dargestellt waren nun keine ATG8.1-Verunreinigungen mehr enthalten. Die diffusen Banden

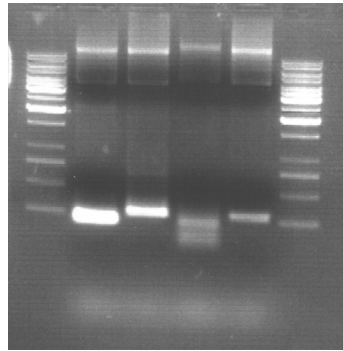


Abbildung 3.21: 1+6:GeneRuler 1kb, 2:ATG8.2-p2T7 (PCR mit ATG8.1 Primern), 3:ATG8.2-p2T7 (ATG8.2 Primer), 4:p2T7 (ATG8.1 Primer), 5:p2T7 (ATG8.2 Primer)

der Negativkontrollen wurden von den Primern selbst gebildet. Klon II wurde in 100 ml

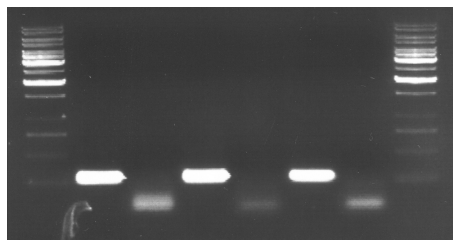


Abbildung 3.22: ATG8.2-p2T7 Re-Transformation; 1+8:GeneRuler 1kb, 2-3:Klon I (ATG8.2 Primer, ATG8.1 Primer), 4-5:Klon II, 6-7:Klon III

kultiviert und zur Herstellung von Stabilaten verwendet. Aus der isolierten Plasmidlösung ($c=0.67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}=2.28$) wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Parallel hierzu wurde eine Sequenzierung in Auftrag gegeben. Alle Daten bestätigten die erfolgreiche Klonierung von p2T7.ATG8.2. Die auftretenden Deletionen und Mutationen stellen keine kritische Beeinträchtigung für die Wirksamkeit des Konstruktes in RNAi-Experimenten dar (Anhang A.2.1.3).

NotI	SapI	pvuII	HpaI
⌘ p2T7	⌘ ATG8.2	⌘ ATG8.1	Insert freisetzen
6209bp	4410,	6209bp	5904,
(linear)	1363,	(relaxed und supercoiled)	305bp
	736bp		

3.1.6 alpha-Tubulin *knockdown*

Der α -Tubulin *knockdown* stellt aufgrund des ausgeprägten Phänotyps (zwei Flagellen, kugelförmig deformierte *FAT* Zellen) eine einfache Positivkontrolle bei der Etablierung der RNA Interferenz in *T. brucei* dar (Shi et al., 2000). Das Plasmid p2T7.alpha-Tubulin wurde in *E. coli* vermehrt, in 150 μl ddH₂O isoliert, photometrisch quantifiziert ($c=1.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}=2.28$) und zur Sequenzierung eingeschickt. Es ergab sich keine kritische Beeinträchtigung für RNAi Experimente (Anhang A.2.1.4).

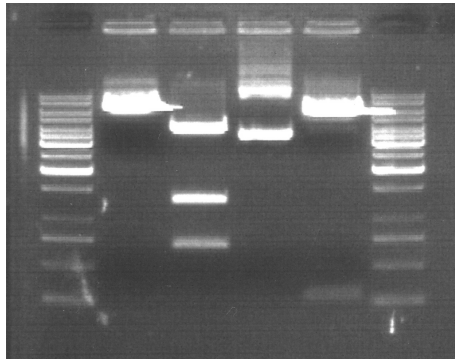


Abbildung 3.23: ATG8.2-p2T7 Restriktionsverdau; 1+6: *GeneRuler* 1kb, 2: *NotI*, 3: *SapI*, 4: *pvUII*, 5: *HpaI*

3.2 Transfektion von *T. brucei*

3.2.1 Plasmid-DNA und Zelllinie

NotI-Linearisierung

200 μl p2T7.ATG8.1-ATG8.2 ($c=0.65 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 80 μl p2T7.alpha-Tubulin ($c=1.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden über Nacht (24 h, 37 °C) mit 10 U bzw. 7 U NotI linearisiert. Dies entspricht ungefähr einem 2-fachen Überverdau. Die Vollständigkeit der Verdau wurde gelelektrophoretisch kontrolliert (Abbildung 3.24). Das Enzym wurde 20 min bei 80 °C inaktiviert und die Nukleinsäure mit 1/10 Volumenanteil 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 2 Teilen Ethanol (100%) für 30 min bei -20 °C gefällt, mit Ethanol (70%) gewaschen und in 50 μl bzw. 30 μl ddH₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung im Photometer ergab:

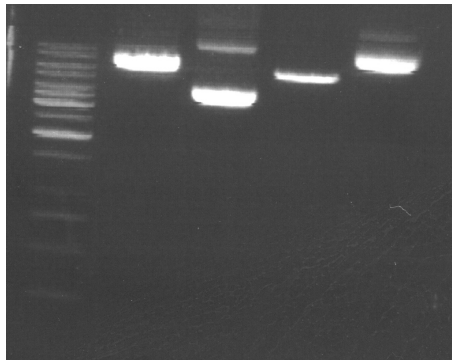


Abbildung 3.24: 1:GeneRuler 1kb, 2:p2T7-ATG8 mit *NotI*, 3:p2T7-ATG8 ohne *NotI*, 4:p2T7- α -Tubulin mit *NotI*, 5:p2T7- α -Tubulin ohne *NotI*

Probe	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	OD _{260nm/280nm}
p2T7.ATG8.1-ATG8.2	1.7	2.14
p2T7. α -Tubulin	2.5	2.16

Um die ermittelten Konzentrationen zu überprüfen, wurde jeweils ein Mikroliter einer 1:50 Verdünnung auf einem 1%(w/v)-igen Agarosegel aufgetragen. Abbildung 3.25 zeigt das Gelfoto, das mit *QuantityOne* ausgewertet wurde. Als Referenz diente die 8kb Bande des *GeneRuler* 1kb Markers. Diese entspricht 30 ng für 0.5 μg Auftragsmasse. Die so erhaltenen DNA-Konzentrationen der 1:50 Verdünnungen betragen 50 ng/ μl , bzw. 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für die unverdünnte DNA.

Verwendete Stabilate

Alle in dieser Arbeit verwendeten SMB Zellen basieren auf einem Kulturstabilat vom 17.06.2003. Dieses wurde in großem Volumen vermehrt und zur Herstellung neuer Stabilate (2.5e7 Zellen) verwendet. Die Generationszeit der Zelllinie beträgt ca. 9 Stunden in BF-Medium.

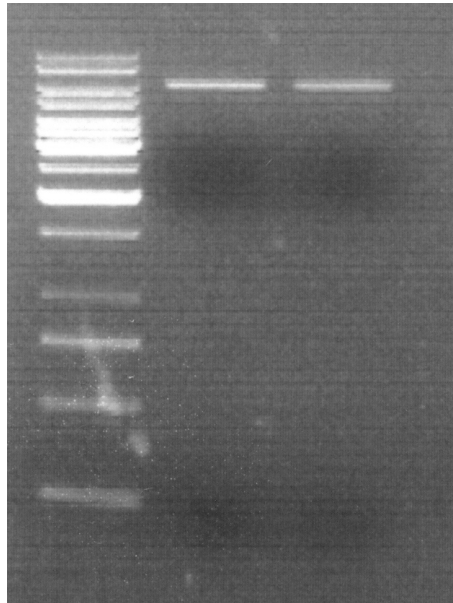


Abbildung 3.25: 1:GeneRuler 1kb, 2:p2T7.ATG8.1-ATG8.2 1:50, 3:p2T7. α -Tubulin 1.50

3.2.2 Elektroporationssystem

Allgemein wurde für die Elektroporation von Blutformzellen ein Biorad *GenePulserII* System mit einer Potentialdifferenz von 1.4 kV und einer Kapazität von 25 μ F verwendet, die bei Inkubation der Zellen im Cytomix Elektroporationspuffer zu einer Zeitkonstanten von ca 0.3 ms führt. Es wurden unterschiedliche Küvetten-Fabrikate eingesetzt. Zu Beginn auftretende Kurzschlüsse ("ARC detected") und hohe Kontaktwiderstände ($t > 6000$ ms) führten zu geringen unmittelbaren Überlebensraten bzw. schlechter Transfektionseffizienz. Die höchste Zuverlässigkeit wurde mit Biorad 2mm Elektroporationsküvetten erreicht. Die tatsächlich aufgebauten Spannungen lagen hier im Bereich zwischen 1.0-1.3 kV.

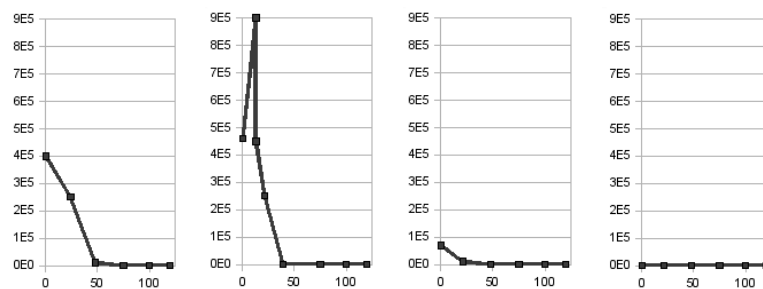
3.2.3 Initiale Parameter

Als Startbedingung für die Elektroporationsexperimente wurde eine Zellzahl von 5×10^7 gewählt. Die Zellen wurden in 25 ml Cytomix gewaschen, abzentrifugiert, in 440 μ l Cytomix resuspendiert und mit 50 μ g linearisiertem Plasmid gemischt. Es wurde ein Puls abgegeben. Danach wurde die Zelldichte in BF-Medium auf 4×10^5 bzw. 5×10^5 /ml eingestellt. Während einer 6-stündigen *recovery* Phase findet die Integration des Plasmids in das Trypanosomengenom statt. Danach wurden 2.0 μ g/ml G418 und 10 μ g/ml Hygromycin zugegeben. Die Kulturen wurden in T-25-Flaschen belassen. Dadurch erfolgte zwar keine klonale Entwicklung transgener Trypanosomen, jedoch erleichterte dieses Vorgehen die Zelldichtekontrolle. Gegebenenfalls wurde durch Verdünnung sichergestellt, daß die Zelldichte 1×10^6 /ml nicht überschritt.

Die hohe Zellzahl und der Einsatz großer DNA-Mengen sollten eine möglichst gute

Transfektionseffizienz gewährleisten. Bei Applikation eines Elektroporationspulses betrug die Überlebensrate zwischen 4% und 20%. Multiple Pulse erschienen somit nicht sinnvoll. Der Hygromycin-vermittelte Selektionsdruck wurde am oberen Rand der beschriebenden Konzentrationen gewählt (Clayton, EMBO/TDR practical course handbook). Durch die Zelldichtekontrolle sollte sichergestellt werden, daß keine Differenzierung in *short stumpy* Formen auftritt.

Elektroporationen					
workflow	Zellzahl (abs.)	5e7	5e7	5e7	5e7
	10 min @ 1000g & 4 °C, 25 ml Cytomix, 10 min @ 1000g & 4 °C, 440 µl Cytomix				
	Zellzahl/ml	2.5e8	1.8e8	2.3e8	1.4e8
	DNA (NotI)	TUB	TUB	ATG	ATG
		50µg	50µg	50µg	50µg
	puls Biorad	1.0kV 0.3ms	1.0kV 0.3ms	1.2kV 0.2ms	1.1kV 0.4ms
	Zellzahl/ml	1.7e8	1.3e8	3.8e7	2.5e7
	(survivals [%])	68	72	17	18
	+ BF-Medium	50ml	40ml	10ml	5ml
	Zellzahl/ml	4e5	4e5	4e5	5e5
	(survivals [%])	17	20	4	5
	6h recovery				
	Zellzahl/ml	4e5	4.6e5	7e4	∅
	(survivals [%])	18	23	0.7	0
	+ G418	2.0µg/ml	2.0µg/ml	2.0µg/ml	
	+ Hyg	10µg/ml	10µg/ml	10µg/ml	



Verlauf [1/ml]/[h]

nach 13h 1:1
verdünnt

Phänotyp

nach 18h *FAT*nach 18h *FAT*

Während der 6-stündigen *recovery* Phase brach die Zelldichte der p2T7.ATG8.1-ATG8.2-transfizierten Zellen fast vollständig ein und es kam auch zu keiner Erholung während der nächsten 5 Tage. Die mit 50 µg p2T7.alpha-Tubulin elektroporierten Trypanosomen zeigten 18 Stunden posttransfektionale einen ausgeprägten *FAT* Phänotyp mit kugelförmig abgerundeten Zellkörpern, da Strukturproteine für das Zytoskelett nicht mehr gebildet wurden (Abbildung 3.26). Die Methode war damit prinzipiell erfolgreich. Allerdings sprach das frühe Auftreten des Phänotyps ohne vorherige Induktion für eine zu große

DNA-Menge. Dies führte offenbar zu einer vielfachen Integration ins Trypanosomen-genom. Durch die hohe Kopienzahl stand nicht ausreichend Tetracyclin-Repressor zur Vergügung, um die p2T7-Operator-Sequenzen abzusättigen und der *knockdown* wurde *leaky*. Da α -Tubulin defiziente Zellen keinen funktionsfähigen Spindelapparat assemblie-ren können erfolgte keine weitere Mitose. Die Kulturen starben innerhalb von 3 Tagen ab.

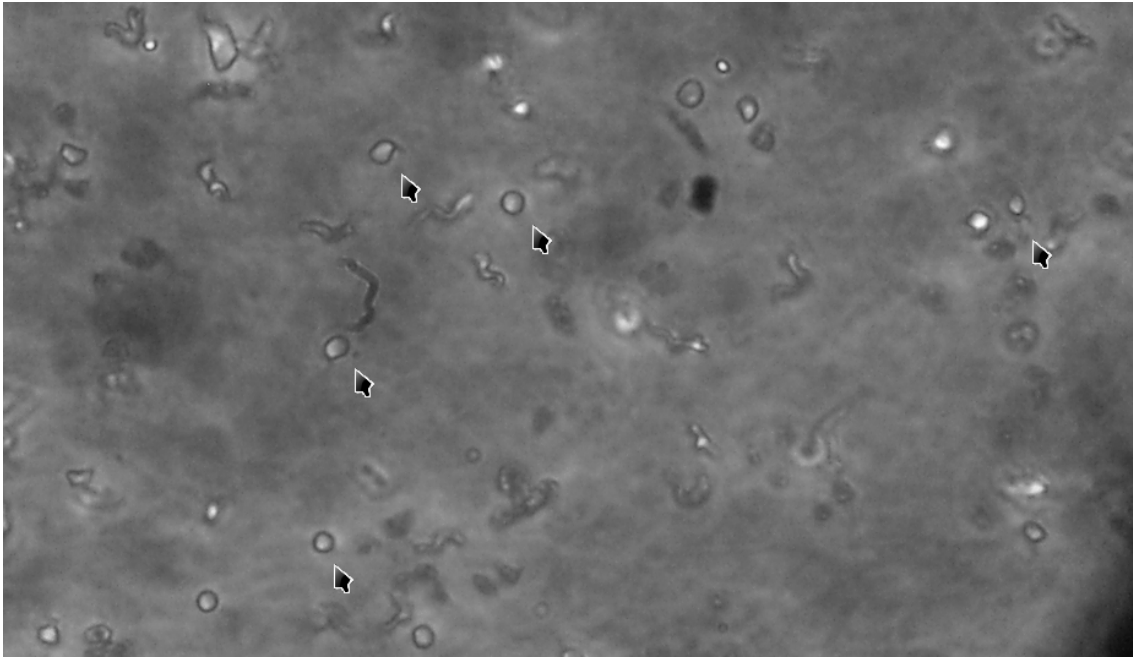
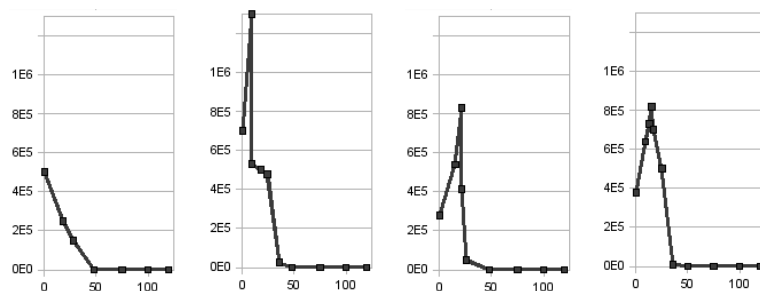


Abbildung 3.26: *FAT* Phänotyp alpha-Tubulin defizienter Zellen mit 50 μ g DNA, 18 Stunden posttransfunktional

3.2.4 Anpassung der DNA-Menge

Im Folgenden wurde eine schrittweise Reduktion der eingesetzten DNA-Menge genutzt, um transgene Zelllinien zu generieren, die die zur RNAi benötigte dsRNA nicht konstitutiv, sondern induzierbar transkribierten. Dadurch können Trypanosomen selbst dann kultiviert werden, wenn der *knockdown* zu einem letalen Phänotyp führt.

Elektroporationen					
workflow	Zellzahl (abs.)	5e7	5e7	5e7	5e7
	10 min @ 1000g & 4 °C, 25 ml Cytomix, 10 min @ 1000g & 4 °C, 440 µl Cytomix				
	Zellzahl/ml	8.5e7	7.5e7	9.6e7	1e8
	DNA (NotI)	TUB	TUB	ATG	ATG
		25µg	12.5µg	25µg	12.5µg
	puls Biorad	1.1kV 0.4ms	1.1kV 0.4ms	1.2kV 0.3ms	1.1kV 0.4ms
	Zellzahl/ml	3.2e7	3.8e7	5.8e7	
	(survivals [%])	38	51	60	
	+ BF-Medium	15ml	10ml	10ml	10ml
	Zellzahl/ml	4.4e5	5.7e5	4e5	5.4e5
	(survivals [%])	17	17	9	12
	6h recovery				
	Zellzahl/ml	5e5	7e5	2.8e5	3.8e5
	(survivals [%])	20	21	6	8
	+ G418	2.0µg/ml	2.0µg/ml	2.0µg/ml	2.0µg/ml
	+ Hyg	10µg/ml	2.5µg/ml	10µg/ml	2.5µg/ml



Verlauf [1/ml]/[h]

nach 9h 1:1
verdünntnach 21h 1:1
verdünntPhänotyp noch 50% *FAT* <5% *FAT*

Beim Einsatz von lediglich 12.5 µg p2T7.alpha-Tubulin zeigten weniger als 5% aller Trypanosomen eine *FAT* Morphologie. Die Wachstumskurven unterschieden sich unterdessen nicht signifikant von denen, die nach dem Einsatz höherer DNA-Konzentrationen erhalten wurden. So lieferten 50 µg DNA bei einem von zwei Versuchen einen Anstieg der Zelldichte (Kapitel 3.2.3), bei 25 µg erfolgte kein Wachstum und bei 12.5 µg wiederum stieg die Zellzahl erneut temporär. Für p2T7.ATG wurden indes konsistente Wachstums-

kurven erhalten: Während bei 50 μg keine der Kulturen die ersten 6 Stunden überlebte, fand bei 25 μg und 12.5 μg zeitweise ein Wachstum statt. Anhand dieser Daten wurde eine DNA-Konzentration von 10-12.5 μg für weitere Experimente festgelegt. Der *knock-down* sollte damit ohne Hintergrundeffekte induzierbar sein.

Weiterhin war festzustellen, daß die Kulturen nach Ablauf von zwei Tagen vollständig abstarben. Ursächlich hierfür konnte weder ein letaler, konstitutiver *knockdown* sein, noch eine Differenzierung in *short stumpy* Formen mit anschließender Prostaglandin D₂-vermittelter Apoptose. Dies war ausgeschlossen, da die Zelldichten stets im exponentiellen Wachstumsbereich gehalten wurden, ähnlich den durchgeführten SMB-Dauerkulturen. Fraglich erschien, welchen Anteil das zur Selektion zwingend notwendige Hygromycin am Einbruch der Zellkulturen hatte.

3.2.5 Anpassung der Hygromycin-Konzentration

Das Aminoglykosid Hygromycin hemmt die Proteinbiosynthese (Pittenger et al., 1953). Zur Selektion p2T7-transformanter Trypanosomen wurden Konzentrationen von 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Li and Gottesdiener, 1996), 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (Field, 2008; Horn, 2008), 5 $\mu\text{g/ml}$ (Alibu et al., 2005; Witola et al., 2004) und 5-15 $\mu\text{g/ml}$ (Clayton, EMBO/TDR practical course handbook) beschrieben. Es sollte untersucht werden, wie sich die Reduktion der Hygromycin-Konzentration auswirkt, und nach welchem Zeitraum die Zellzahl nicht-resistenter Trypanosomen abnimmt. SMB Kulturen wurden auf eine Zelldichte von 5e5/ml eingestellt und mit 15 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ oder 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin versetzt. Eine Negativkontrolle wurde ohne Hygromycin inkubiert. Über einen Zeitraum von 30 Stunden wurden Wachstumskurven aufgenommen (Abbildung 3.27).

Innerhalb der ersten 15 Stunden wurden vermutlich begonnene Zellteilungen abgeschlos-

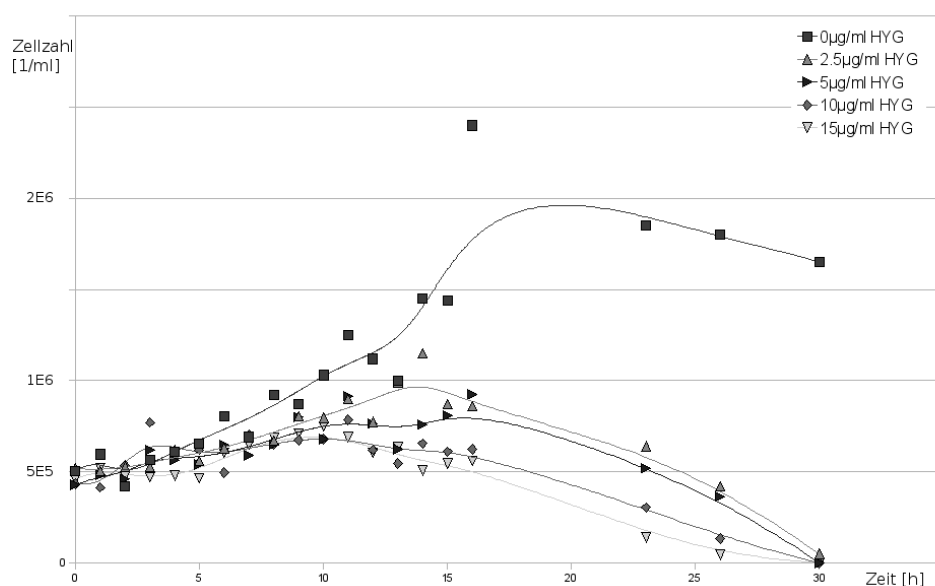


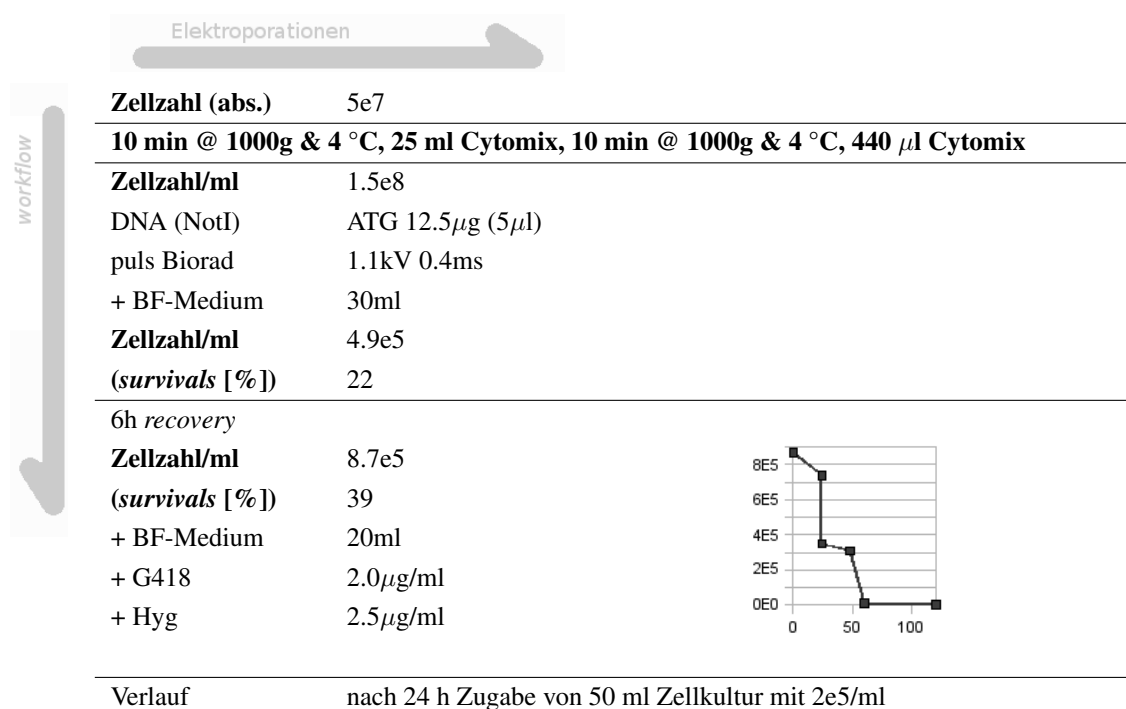
Abbildung 3.27: Wachstumskurven mit unterschiedlichen Hygromycinkonzentrationen.

sen. In diesem Zeitraum verdoppelte sich die Zellzahl ($2.5 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin) oder stieg auf das 1.5-fache des Ausgangswertes ($15 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin). Danach fand offenbar keine weitere Mitose statt, da die Zelldichte kontinuierlich abnahm. Mit Ausnahme der Negativkontrolle starben alle Kulturen nach 30 Stunden (nahezu gleichzeitig) ab. Dies stand in Einklang mit den Wachstumskurven, die während der posttransfunktionalen Selektionsphase aufgenommen wurden (Kapitel 3.2.3 und 3.2.4).

$2.5 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin waren somit ausreichend dimensioniert und wurden als Standard folgender Elektroporationen festgelegt. Da maximal eine Verdopplung erfolgte, war eine Verdünnung von unter 5×10^5 Zellen/ml angesetzten Kulturen nicht nötig. Dass jedoch innerhalb von fünf Tagen keine klonale Entwicklung einzelner, rekombinanter Zellen erfolgte, war auf fehlende Wachstumsfaktoren im Medium zurückzuführen. Während sich einzelne Trypanosomen in infizierten Versuchstieren vermehren konnten, war dies im BF-Medium offensichtlich nicht möglich.

3.2.6 Einsatz von *feeder* Trypanosomen

Die klonale Entwicklung rekombinanter Zellen sollte erleichtert werden, indem 24 Stunden nach der Elektroporation unbehandelte SMB Zellen (*feeder* Trypanosomen) zur Konditionierung des Mediums zugegeben wurden. Damit konnte die Zelldichte für mehr als 50 Stunden über $1 \times 10^5/\text{ml}$ gehalten werden. Die Gesamtkonzentration von Hygromycin blieb stets auf $2.5 \mu\text{g/ml}$ eingestellt. Erwartungen, daß die *feeder* Trypanosomen das Wachstum der rekombinanten Zellen stimulierten, bestätigten sich allerdings nicht. Es wurden keine Hygromycin-resistenten Trypanosomen erhalten.



3.2.7 HMI-9 Medium

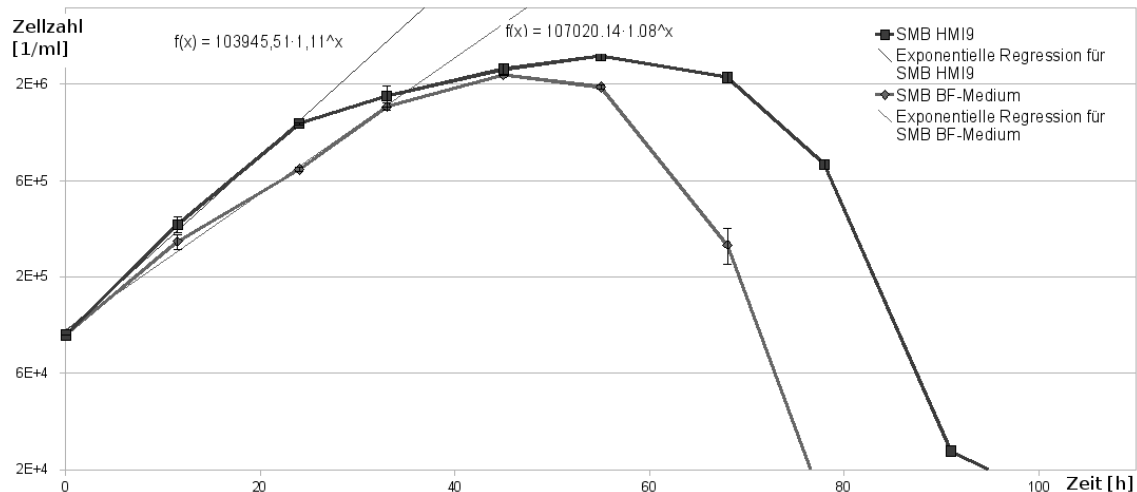
Die Blutform von *T. brucei* kann in HMI-9 Medium axenisch kultiviert (Hirumi and Hirumi, 1994) und klonal entwickelt werden (Horn, 2008). HMI-9 Medium entspricht in seiner Zusammensetzung dem HMI-11 Medium, wurde jedoch um 10% (v/v) Serum Plus ® ergänzt. Serum Plus ® ist ein proprietäres Produkt aus fetalem Kälberserum und nicht näher spezifizierten Proteinen, die Nährstofftransport und Zellwachstum verbessern (SAFC Produktinformation). Die Generationszeit von SMB Zellen liegt in BF-Medium bei 9.0 Stunden, in HMI-9 bei 6.6 Stunden (Abbildung 3.28).

Mit p2T7.ATG8.1-ATG8.2 und p2T7.alpha-Tubulin wurden 2.5×10^7 Zellen elektroporiert, und in 36ml HMI-9 aufgenommen (Konzentrationen von DNA und Hygromycin wie in Kapiteln 3.2.4 und 3.2.5 optimiert). Nach einer *recovery* Phase von 6 Stunden wurden die Kulturen mit Antibiotika versetzt, auf 24 *well* Platten verteilt und nach 5 Tagen lichtmikroskopisch untersucht (Field, 2008).

		Elektroporationen		
		2.5e7	2.5e7	
		10 min @ 1000g & 4 °C, 25 ml Cytomix, 10 min @ 1000g & 4 °C, 440 µl Cytomix		
workflow	Zellzahl/ml	8.1e7	8.4e7	
	DNA (NotI)	ATG	TUB	
		12.5µg	10µg	
	puls Biorad	1.2kV 0.3ms	1.1kV 0.4ms	
	Zellzahl/ml	2.1e7		
	(survivals [%])	26		
	+ HMI-9	36ml	36ml	
	Zellzahl/ml	1.3e5	3e5	
	(survivals [%])	13	29	
	6h <i>recovery</i>			
	Zellzahl/ml	2.0e5	3.3e5	
	(survivals [%])	20	32	
	+ G418	2.0µg/ml	2.0µg/ml	
	+ Hyg	2.5µg/ml	2.5µg/ml	
	24 <i>well</i> Platte	1ml/ <i>well</i>	1ml/ <i>well</i>	
entnommene Klone nach 5 Tagen	Klon I 2.8e5/ml Klon II 8.3e5/ml Klon III 7.8e5/ml Klon IV 1.4e5/ml Klon V 2.9e5/ml	Klon I 2e4/ml		

In 5 von 36 *wells* wurden ATG8 triple *knockdown* Klone mit mehr als 1×10^5 Zellen/ml gefunden und zur weiteren Anzucht entnommen. 4 weitere *wells* enthielten noch einzelne lebende Zellen. Damit waren 25% aller *wells* positiv. Für den *alpha*-Tubulin *knockdown*

wurde nach 5 Tagen ein positives *well* mit 2×10^4 Zellen/ml erhalten. Die Klone wurden täglich mit HMI-9 Medium auf 1×10^5 /ml verdünnt. Ab einem Gesamtvolumen von 10 ml wurden die Kulturen in BF-Medium überführt. Dazu wurde bei den zwei folgenden Verdünnungsschritten eine Mischung aus HMI-9 und BF-Medium zugegeben, wobei das Mischungsverhältnis von 66% auf 33% HMI-9 reduziert wurde. Von allen Klonen wurden Stabilate hergestellt.



Abbildungung 3.28: Wachstumsverhalten von *single marker bloodstreamform* Zellen in HMI-9 und BF-Medium.

3.2.8 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ supplementiertes BF-Medium

Trypanosoma brucei synthetisiert während der Parasitämie verschiedene Prostaglandine, die für unterschiedliche Effekte verantwortlich sind. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase produziert die *long slender* Form hauptsächlich $PGF_{2\alpha}$, in der stationären Phase sind Expression und Aktivität der $PGF_{2\alpha}$ Synthese hingegen gering (Kubata et al., 2000). Die Vermutung liegt daher nahe, daß $PGF_{2\alpha}$ als Wachstumsfaktor fungiert, wie auch schon für andere Zellen beschrieben wurde (De Asua et al., 1975). Es sollte untersucht werden, ob unter Zugabe von $PGF_{2\alpha}$ einzelne Trypanosomen auch in BF-Medium vermehrungsfähig sind. Dazu wurden SMB Zellen auf 24 *well* Platten in einer Konzentration von 1×10^5 /ml angesetzt und jeweils um den Faktor 10 verdünnt. Das Medium wurde mit $100 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, oder $10 \mu\text{M}$ $PGF_{2\alpha}$ angereichert. Reines BF-Medium diente als Negativ-, HMI-9 Medium als Positivkontrolle. Die *wells* wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich lichtmikroskopisch untersucht. Diejenigen *wells*, in denen hohe Zellpopulationen auftraten, wurden entsprechend gekennzeichnet (Abbildung 3.29).

In HMI-9 Medium waren 1×10^1 Zellen/ml ausreichend, um innerhalb von 5 Tagen eine Population mit mehr als 5×10^5 Zellen/ml zu entwickeln. In BF-Medium hingegen war dies im vorgegebenen Zeitrahmen nur bei einer Ausgangskonzentration von 1×10^3 Zellen/ml

	1e5/ml	1e4/ml	1e3/ml	1e2/ml	1e1/ml	1e0/ml
100μM PGF_{2α} in BF-M.	✓	✓	✓	✓	∅	∅
50μM PGF_{2α} in BF-M.	✓	✓	✓	✓	✓	∅
10μM PGF_{2α} in BF-M.	✓	✓	✓	✓	✓	∅
BF-Medium	✓	✓	✓	(✓)	∅	∅
HMI-9 Medium	✓	✓	✓	✓	✓	∅

Abbildung 3.29: Wachstumsverhalten bei geringer Zelldichte in verschiedenen Medien. ✓: mehr als 5e5/ml innerhalb von 5 Tagen, (✓): Zelldichte nach 5 Tagen unter 5e5/ml, bei stetigem Wachstum, ∅: keine Zellen nach 5 Tagen sichtbar.

möglich. Für die nächste Verdünnungsstufe (1e2/ml) wurden weniger als 5e5/ml erhalten, allerdings bei ebenfalls stetigem Wachstum. Die durchschnittlichen Generationszeiten (ohne Berücksichtigung von *lag* Phasen) betrug in HMI-9 Medium ca. 6 Stunden, in BF-Medium ca. 9 Stunden. Unter Zugabe von PGF_{2 α} wuchsen die Kulturen ab 1e1 Zellen/ml (10 μ M und 50 μ M), bzw. 1e2 Zellen/ml (100 μ M). Da sich für alle PGF_{2 α} Konzentrationen bei höheren Zelldichten ein vergleichbares Wachstumsverhalten ergab, ist dies als statistischer Fehler zu werten. Die Generationszeiten in Medium mit PGF_{2 α} lagen im Bereich der Generationszeit reinen BF-Mediums. Damit wird durch den Zusatz von Prostaglandin F_{2 α} ein marginaler Wachstumsvorteil hochverdünnter Zellkulturen erreicht. Für die klonale Entwicklung nach Elektroporationen stellt dies jedoch keine Alternative zu HMI-9 Medium dar.

3.3 Sequenzanalyse der 5'-untranslated regions

3.3.1 trans-Spleißen und spliced leader Sequenz

Um einen *knockdown* auf Transkriptionsebene nachweisen zu können, wurden spezifische *Northern blot* Sonden benötigt. Deren Länge soll idealerweise zwischen 200 und 800 Basen liegen und nicht mit der Sequenz der dsRNA überlappen. Auf diese Weise könnte bei *Northern blot* Experimenten die einzelne mRNA Bande eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund der geringen Länge der betreffenden Gene, und der großen Homologie von ATG8.1A und ATG8.1B (vgl Kapitel 3.1.1) sind diese Bedingungen nur erfüllt, wenn die 5'-terminalen *untranslated regions* der nachzuweisenden mRNAs in die Konstruktion der Sonden einbezogen werden: Unreife, polycistronische RNA wird in *Trypanosoma brucei* *in trans* gespleißt und auf diese Weise 5'-terminal mit einer *SL*-Sequenz verknüpft (Kapitel 1.1.6.3). Zwischen dem *SL* und dem *open reading frame* des eigentlichen Gens verbleibt jedoch stets eine variable Anzahl von Nukleotiden, die zum Nachweis via *Northern blot* verwendet werden können. Somit erweitert sich der spezifisch nachweisbare Genabschnitt deutlich über den codierenden Bereich hinaus. Die tatsächliche Größe der reifen mRNA muss experimentell ermittelt werden.

Die in den Abbildungen 3.30, 3.31 und 3.32 schematisch dargestellten PCR-Primer wurden zur Bestimmung der 5'-UTR-Längen der jeweiligen mRNA genutzt.

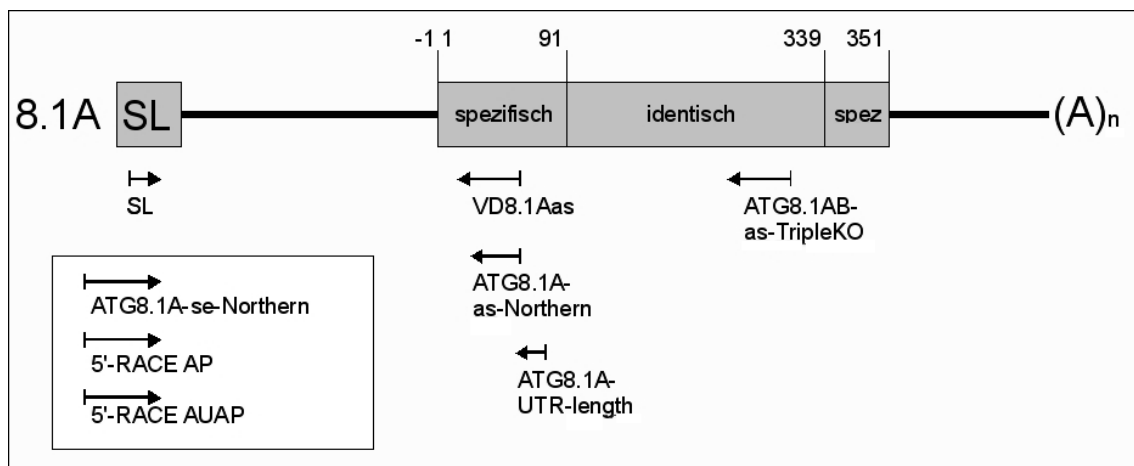


Abbildung 3.30: Position der zur 5'-UTR Bestimmung vorhandenen Primer für ATG8.1A

3.3.2 Primer nichtidentischer Schmelztemperatur

Ausgehend von 5 μ l BF221 cDNA wurde eine PCR (40 Zyklen, *annealing temperature* 55 °C) mit den laborintern bereits verfügbaren Primern (Viola Denninger) durchgeführt: SL23Se, VD8.1Aas, VD8.1Bas und VD8.2as. Unter den gewählten Bedingungen entstanden keine Amplimere (Gelphoto nicht gezeigt).

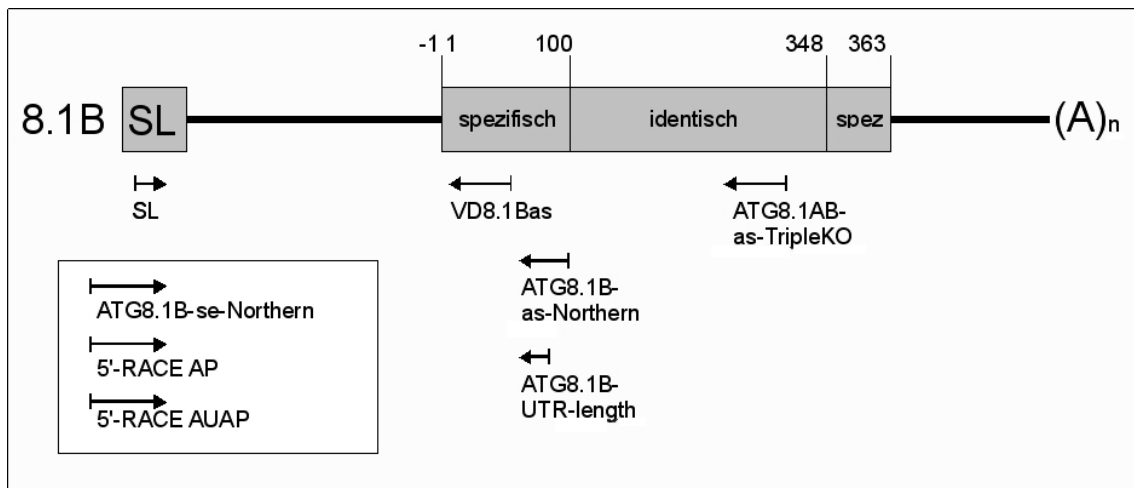


Abbildung 3.31: Position der zur 5'-UTR Bestimmung vorhandenen Primer für ATG8.1B

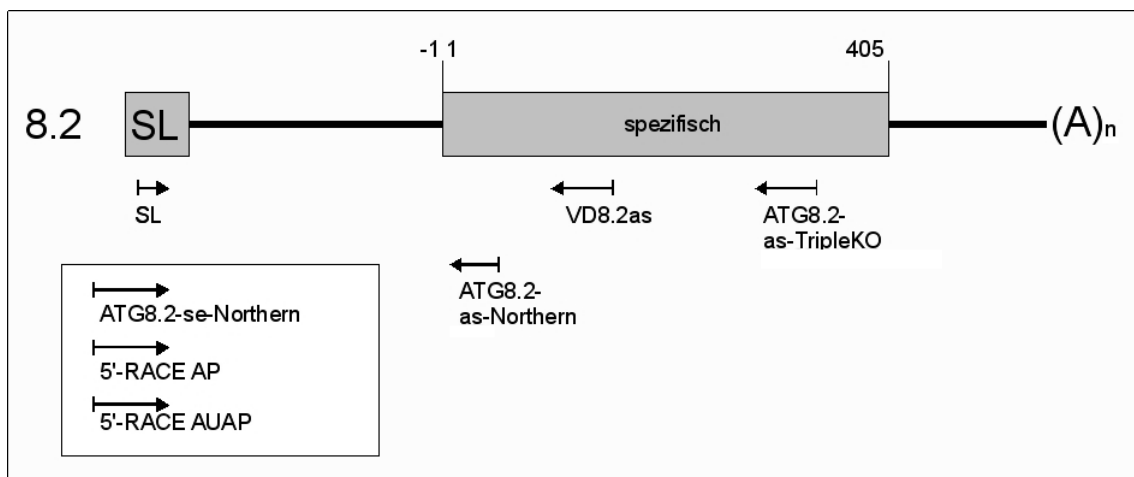


Abbildung 3.32: Position der zur 5'-UTR Bestimmung vorhandenen Primer für ATG8.2

Deshalb wurden die PCR Bedingungen aus den zugehörigen laborinternen Aufzeichnungen übernommen (50 Zyklen, *annealing temperature* 55 °C, 4 min Elongation). Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen von *sense* und *antisense* Primern war mit unspezifischer Hybridisierung und dem Auftreten von Nebenprodukten zu rechnen. Eine Schmelzpunkterhöhung des SL-Primers konnte jedoch durch einfache Verlängerung nicht erreicht werden, ohne die Selbstkomplementarität maßgeblich zu erhöhen.

Eine weitere PCR mit variabler *annealing temperature* sollte eine schrittweise und vollständige Hybridisierung ermöglichen (50 Zyklen, Anlagerung von VD8.1Aas/ VD8.1Bas/ VD8.2as bei 57 °C, Anlagerung von SL23se bei 50 °C, 4 min Elongation). Dieses Verfahren führte zur weiteren Verringerung der Spezifität und der Amplifikation weiterer unerwünschter Produkte. Allerdings konnte nur so sichergestellt werden, daß auch die für ATG codierende cDNA erfasst wird (Abbildung 3.33).

Zum jetzigen Zeitpunkt war es nicht möglich die Größe der ATG8-5'-UTR abzuschätzen, da noch unklar war, welche Bande das korrekte Amplimer repräsentiert. In jedem

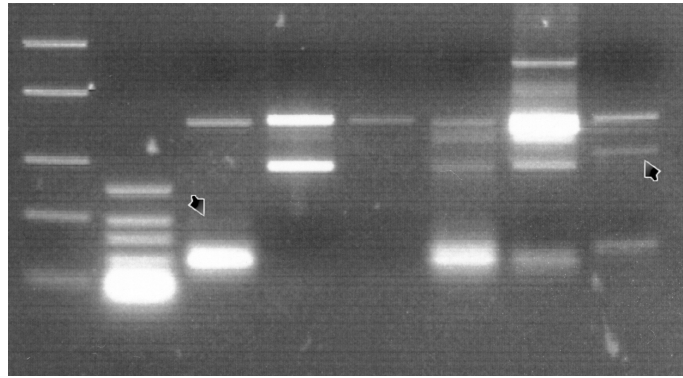


Abbildung 3.33: 2%(w/v) Agarose-GE. 1:FastRuler low range, 2:GeneRuler ultra low range, 3-5: ATG8.1A / 8.1B / 8.2 mit einfacher *annealing temperature*, 6-8: ATG8.1A / 8.1B / 8.2 mit doppelter *annealing temperature*

Fall handelte es sich um Fragmente mit mehr als 50 Nukleotiden. Für effektive *Northern blot* Sonden reicht dies nicht aus.

3.3.3 Amplifikation von 300 bp Sonden

Frühere, im Labor durchgeführte Vorversuche deuteten darauf hin, daß die *UTR*-Regionen größer als 300 bp sind. Abbildung 3.33 bestätigt dies, wenn die jeweils größten Banden (einfache *annealing temperature*) zu Grunde gelegt werden. Mit ca. 500 bp Länge des PCR-Produktes ergeben sich unter Berücksichtigung der Primer-Hybridisierungspositionen (VD8.1Aas: #31-#55, VD8.1Bas: #38-#61, VD8.2as: #171-#193) (vgl. Anhang A.1) *UTRs* mit mindestens 300 bp Länge.

Vor diesem Hintergrund wurden Primer für 300 bp lange *Northern blot* Sonden generiert. Die dazu benötigten *upstream*-Sequenzen von *T. brucei* ATG8 sind in GeneDB (GeneDB, 2008) verfügbar. Eine PCR (40 Zyklen, *annealing temperature* 57 °C) lieferte für ATG8.1A, 8.1B und 8.2 Amplimere korrekter Länge (Abbildung 3.34). Dabei handelte es sich jedoch nicht um Kopien gespleißter ATG8-mRNA (Kapitel 3.3.5). Tatsächlich sind die *untranslated regions* kleiner als 300 bp. Dass beim beschriebenen Procedere dennoch PCR-Produkte erhalten wurden, lässt sich wohl nur dadurch erklären, daß die eingesetzten cDNA *templates* mit genomischer DNA oder revers transkribierter ungespleißter RNA verunreinigt waren.

3.3.4 Verschachtelte PCR zur 5'-UTR-Längenbestimmung von ATG8.2

Durch schrittweise Vervielfältigung mit wechselnden Primern und intermediärer Aufreinigung wurde nun eruiert, welche der in Abbildung 3.33 gezeigten Banden relevant ist (Abb. 3.35). Als interne Primer werden ATG8.1(A&B)-as-TripleKO und ATG8.2-as-TripleKO aus Kapitel 3.1.3 benutzt. Mit 55 °C *annealing temperature* wurde eine definierte Bande für ATG8.2 (ca 550 bp) sichtbar (Abbildung 3.36). Diese wurde ausgeschnitten

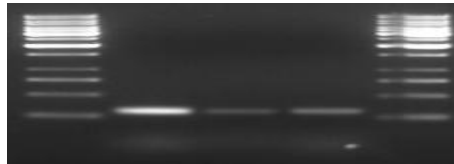


Abbildung 3.34: Amplifikation von 300 bp Sonden. 1:GeneRuler 1kb, 2:PCR mit ATG8.1Ase/as-Northern, 3: PCR mit ATG8.1Bse/as-Northern, 4: PCR mit ATG8.2se/as-Northern, 5:GeneRuler 1kb

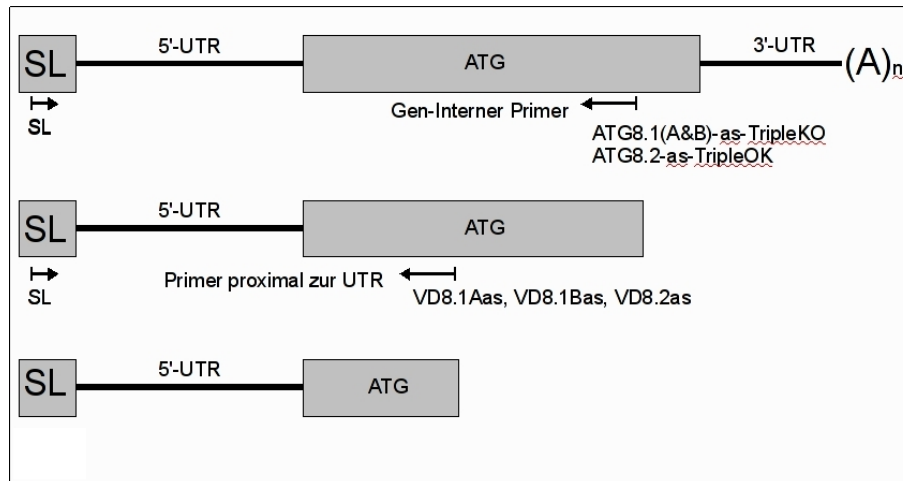


Abbildung 3.35: Schrittweise Vervielfältigung mit wechselnden Primern und intermediärer Aufreinigung

und extrahiert (Kapitel 2.2.4.3). Für ATG8.1 wurde kein PCR Produkt erhalten.

5 μ l des ATG8.2 PCR Produkts wurden ergebnislos als *template* für eine erneute PCR mit SL23se und VD8.2as eingesetzt (Gelphoto nicht gezeigt). Mit 15 μ l *template* lieferte die folgende PCR (*annealing temperatures* von 57 °C und 50 °C) eine Bande bei 400 bp (Abbildung 3.37), die auch in Abbildung 3.33 bei doppelter *annealing temperature* zu sehen war. Damit handelt es sich hierbei um das für ATG8.2 relevante Amplimer. Tatsächlich war diese Bande bei der ersten PCR mit *UTR*-proximalem Primer und einfacher *annealing temperature* (Abb. 3.33, links) nicht zu sehen. Das zeigt, daß die schrittweise Durchführung mehrerer PCRs und der Einsatz multipler Hybridisierungsstufen hilfreich bei der Aufklärung der *UTR*-Größe sein können. Unter Berücksichtigung der Hybridisierungsposition von VD8.2as (#171-#193) ergibt sich für die ATG8.2 5'-*untranslated region* eine Größe von ca. 200 Nukleotiden.

Der Versuch, ATG8.1A und B mit SL23se und Gen-internem Primer zu vervielfältigen wurde mit doppelter *annealing temperature* wiederholt (50 Zyklen, Anlagerung von ATG8.1(A&B)-as-TripleKO bei 57 °C, Anlagerung von SL23se bei 50 °C). Die dabei erhaltene, 500 bp große Bande (Abbildung 3.38) wurde mittels Gelextraktion aufgereinigt. Es wurde ein Gemisch aus ATG8.1A und B PCR Produkten erhalten. Je 5 μ l wurden als *template* mit VD8.1Aas und VD8.1Bas eingesetzt (erneut doppelte *annealing temperature*).

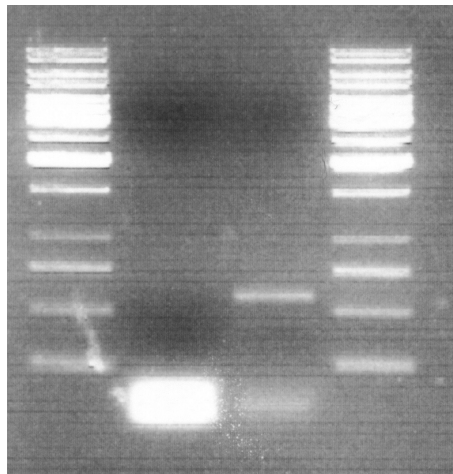


Abbildung 3.36: 1%(w/v) Agarose-GE. PCR mit einfacher *annealing temperature* aus cDNA. 1:GeneRuler 1kb, 2:SL23se/ATG8.1AB-as-TripleKO (Gen-intern), 3:SL23se/ATG8.2-as-TripleKO (Gen-intern), 4:GeneRuler 1kb

Die folgende Darstellung mit 2%(w/v)-Gelelektrophorese (Abbildung 3.39) zeigt kein klar definiertes Bandenmuster. Die prominenten Banden erscheinen größer als das eingesetzte *template*. Damit ist für ATG8.1A und 8.1B mit dieser Methode keine Aussage möglich.

3.3.5 SL23se- und AS-Primer gleicher Smt für ATG8.1A und 1B

Die bislang durchgeführten Experimente basierten auf dem Einsatz von Primerpaaren, deren Hybridisierungstemperaturen sich deutlich voneinander unterschieden. Da die kurze *spliced leader* Sequenz keine weiteren Designmöglichkeiten für spezifischere Primer eröffnet, verbleiben zwei grundsätzliche Möglichkeiten zur Optimierung: 1. der Ersatz konventioneller Polymerasekettenreaktionen durch Methoden, welche mRNA mit nur einem Primer spezifisch amplifizieren (Kapitel 3.3.6), und 2. die Angleichung der Schmelztemperatur des *antisense* Primers an diejenige des *spliced leader* Primers.

Die Primer ATG8.1A-UTR-length und ATG8.1B-UTR-length hybridisieren bei ca 53 °C an den Matrizenstrang und liegen damit im Bereich der Schmelztemperatur von SL23se. Eine *touchdown* PCR (10 Zyklen, *annealing temperature* 57-52 °C, danach 40 Zyklen, *annealing temperature* 52 °C) ergab für ATG8.1A eine prominente Bande bei ca 250 bp und für ATG8.1B eine Vielzahl schwächerer Banden (Abbildung 3.40).

Das PCR-Produkt von ATG8.1A wurde als *template* einer neuen PCR mit ATG8.1Ase/as-Northern eingesetzt (2 μ l *template*, 40 Zyklen, *annealing temperature* 57 °C). Es wurde kein Amplimer von 300 bp Länge erhalten (Abbildung 3.41). Wie bereits erwähnt, wurden die ATG8.1Xse/as-Northern Primer für mehr als 300 bp große *UTRs* gewählt, was nicht den tatsächlichen *templates* entspricht.

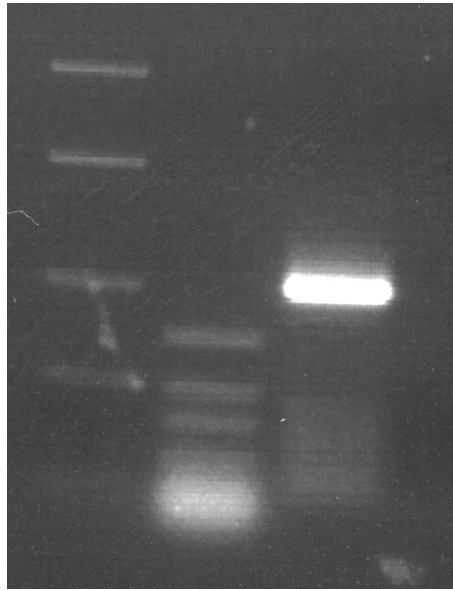


Abbildung 3.37: 2%(w/v) Agarose-GE. PCR nach Gelextraktion mit doppelter *annealing temperature*. 1:FastRuler low range, 2:GeneRuler ultra low range, 3:SL23se/VD8.2as (UTR-proximal)

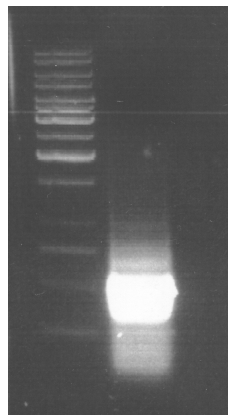


Abbildung 3.38: 1%(w/v) Agarose-GE. PCR mit doppelter *annealing temperature*. 1:GeneRuler 1kb, 2:SL23se/ATG8.1AB-as-TripleKO (Gen-intern)

3.3.6 Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends with PCR

Aufgrund der niedrigen Schmelztemperatur des *spliced leader* Primerpaares und der damit einhergehenden mangelhaften Spezifität führte insbesondere die Vervielfältigung von ATG8.1B zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Amplimeren (Kapitel 3.3.5). Folglich ist eine Abschätzung der 5'-UTR-Länge auf diesem Weg nicht möglich.

Die *untranslated region* von ATG8.2 konnte mittels verschachtelter PCR auf ca. 200 bp geschätzt werden, für ATG8.1A und B versagte diese Methode (Kapitel 3.3.4). Desweiteren waren die Ergebnisse für ATG8.1A nicht schlüssig zur Deckung zu bringen.

Im Folgenden wurden die 5'-terminalen Enden der ATG-mRNA mit einer anderen Methode analysiert, und zwar unabhängig von der trypanosomalen *spliced leader* Sequenz: Die *Rapid Amplification of 5'-cDNA Ends with Polymerase Chain Reaction* (5'-RACE-PCR)

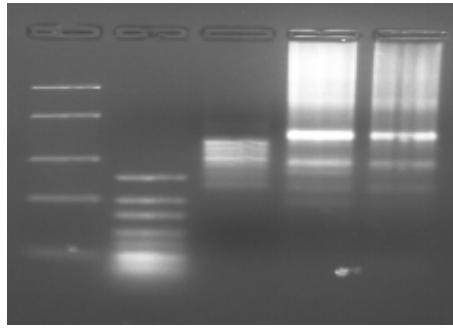


Abbildung 3.39: 2%(w/v) Agarose-GE. PCR nach Gelextraktion mit doppelter *annealing temperature*. 1:FastRuler low range, 2:GeneRuler ultra low range, 3:Gelextrakt (*template*), 4:SL23se/VD8.1Aas (*UTR-proximal*), 5:SL23se/VD8.1Bas (*UTR-proximal*)

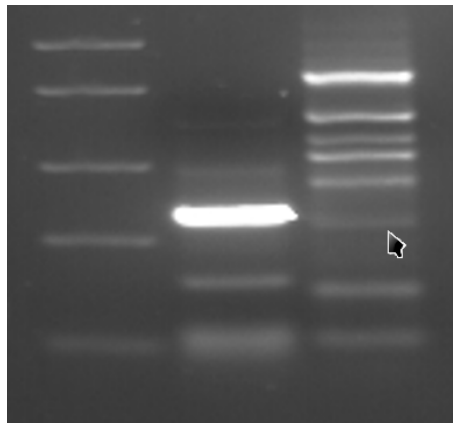


Abbildung 3.40: 2%(w/v) Agarose-GE. 1:FastRuler low range, 2:SL23se/ATG8.1A-UTR-length-as, 3:SL23se/ATG8.1B-UTR-length-as

stellt eine Methode dar zur Vervielfältigung von RNA-Sequenzen ausgehend von einer definierten internen Primerbindungsstelle bis zum 5'-Terminus (Frohman et al., 1988). Für konventionelle Polymerasekettenreaktionen werden zwei sequenzspezifische Primer benötigt, die die zu vervielfältigende Region einrahmen (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Für Regionen, deren Grenzen nicht bekannt sind, oder wie im vorliegenden Fall nicht zur Synthese spezifischer Primer ausreichen, sind diese Voraussetzungen einer PCR nicht gegeben. Steht nur einer der beiden Primer zur Verfügung, können mit der RACE-PCR die beschriebenen Beschränkungen umgangen werden. Die Amplifizierung mit einseitig spezifischen Primern wurde erstmals als "one-sided PCR" (Ohara et al., 1989) und "anchored PCR" (Loh et al., 1989) beschrieben. Damit erleichtert die 5'-RACE-PCR die Isolierung und Charakterisierung von 5'-mRNA-Enden (Frohman, 1993).

Abbildung 3.42 skizziert den Ablauf einer 5'-RACE-PCR: Im ersten Schritt wird mRNA ausgehend von einem definierten *antisense* Primer revers transkribiert. Eine vorzeitige Degradation der RNA wird durch den Zusatz von RNase A/B/C-Inhibitor verhindert. Die eingesetzte Reverse Transkriptase (Qiagen, 2008) ist ein multifunktionelles Enzym, bestehend aus RNA-abhängiger DNA Polymerase, RNA:DNA-hybridabhängiger RNase H, sowie DNA-abhängiger DNA Polymerase. *In vitro* werden die ersten beiden Aktivitäten

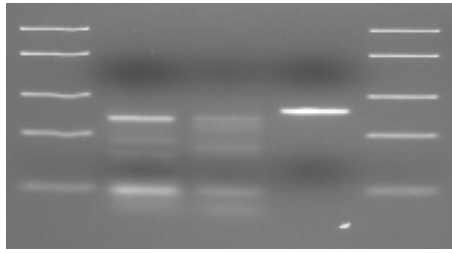


Abbildung 3.41: 2%(w/v) Agarose-GE. 1:FastRuler low range, 2:SL23se/ATG8.1A-UTR-length-as, 3:PCR Produkt (aus Bahn 2) mit ATG8.1Ase/as-Northern, 4:cDNA mit ATG8.1Ase/as-Northern, 5:FastRuler low range

genutzt, um einzelsträngige cDNA herzustellen. Im zweiten Schritt wird der neu synthetisierte cDNA-Einzelstrang 3'-terminal polydesoxyadenyliert. In einer nachfolgenden PCR markiert ein oligo(dT)-Primer den Beginn des nun hinzugefügten *sense* Stranges (*Adapter Primer AP*). Als *antisense* Primer kann derselbe Primer wie bei der reversen Transkription genutzt werden. Alternativ kann durch eine verschachtelte Primerwahl die Spezifität erhöht werden. Aufgrund der geringen (und eventuell ungleichen) Anlagerungstemperaturen können hier allerdings noch Nebenprodukte entstehen.

Durch den *Adapter Primer (AP)* wurde eine neue Primerbindungsstelle (Anker) in die PCR-Produkte eingebracht, deren Schmelztemperatur und Spezifität den Anforderungen an eine spezifische PCR genügt. Die Ankersequenz wird vom *Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)* in einer zweiten PCR wieder aufgenommen. Ein (nochmals) verschachtelter *antisense* Primer definiert den 3'-Terminus des Produkts.

Die reverse Transkription für ATG8.1A und B wurde mit dem *antisense* Primer ATG8.1-(A&B)-as-TripleKO und 2.4 μg Gesamt-RNA durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde aufgereinigt, polydesoxyadenyliert und über eine *touchdown* PCR amplifiziert (Abb. 3.43, links).

Das PCR Produkt wird als *template* zweier verschachtelter PCRs eingesetzt, bei denen ATG8.1A und B getrennt wurden (*antisense* Primer VD8.1Aas bzw. VD8.1Bas, Abb. 3.43, rechts). Für ATG8.1A wurde eine intensive Bande bei 200-250 bp und für 8.2B eine Bande bei 200 bp erhalten. Da das eingesetzte *template* bei den gewählten Primerkombinationen 264 bp (ATG8.1A) bzw. 257 bp (ATG8.1B) größer sein muss, kommt hierfür nur die sehr schwach ausgeprägte Bande bei ca 500 bp (siehe Pfeil, Abb. 3.43, links) in Frage. Die Ergebnisse sind damit in sich stimmig. Zudem wurden beide Banden auch mit den SL23se/ATG8.1A (bzw. B)-UTR-length Primerpaaren erhalten (ATG8.2B nur schwach, vgl. Kapitel 3.3.5).

Für ATG8.2 wurden reverse Transkription, Aufreinigung, *tailing*, *touchdown* und *nested* PCR analog durchgeführt, jedoch unter Verwendung von ATG8.2-as-TripleKO, respektive VD8.2as (Abb. 3.44). Bei gelelektrophoretischer Kontrolle der ersten PCR wurde keine Bande nachgewiesen, die 163 bp größer ist als eine der Produktbanden der *nested* PCR. Für das Endprodukt scheint die Bande knapp über 400 bp (Pfeil) dem gesuchten Produkt

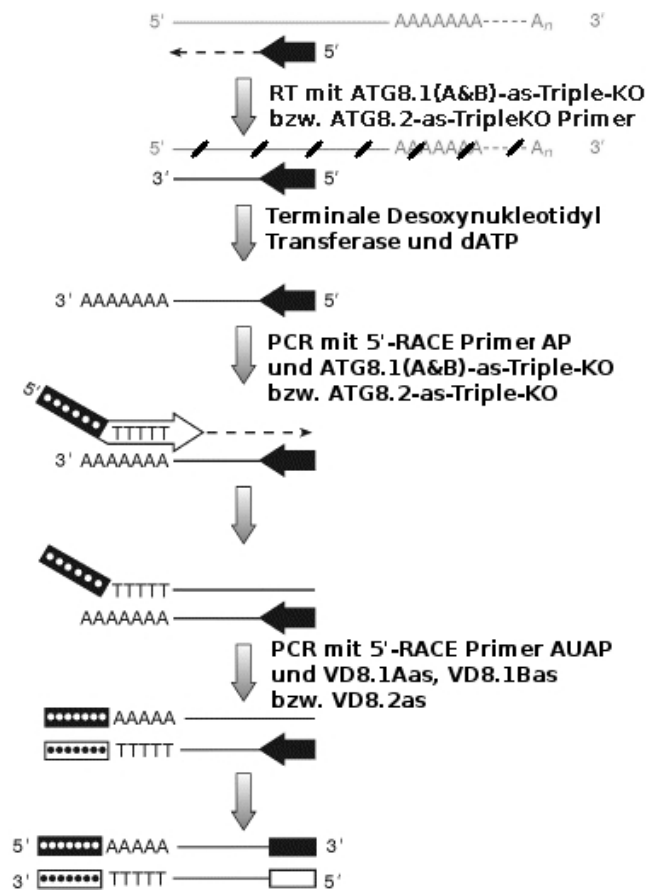


Abbildung 3.42: *Rapid Amplifikation of 5'-cDNA Ends with Polymerase Chain Reaction (RACE-PCR)*

zu entsprechen, da dieselbe Bande für die verschachtelte PCR mit SL23se/ATG8.2-as-TripleKO -> SL23se/VD8.2 erhalten wurde (Kapitel 3.3.4).

Die PCR-Produkte aller ATG8-UTRs wurden in kombinierte Taschen eines 2%(w/v)-igen Agarosegels aufgetragen, 45 min mit 120V aufgetrennt, aus einem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert. Abbildung 3.45 zeigt das Gelfoto, das mit *QuantityOne* ausgewertet wurde, um eine Konzentrationsbestimmung vorzunehmen. Als Referenz diente der *low range* Marker, der bei einem Auftragsvolumen von 10 μ l pro Bande 40 ng DNA enthält. Damit errechnen sich die Konzentrationen zu (1073 ng ATG8.1A)/50 μ l, (899 ng ATG8.1B)/50 μ l, (444 ng ATG8.1A)/30 μ l. Alle Proben lagen damit im von GATC geforderten Bereich von 10-50 ng/ μ l und wurden zur Sequenzierung eingeschickt.

3.3.7 Sequenzierung und Integration der Ergebnisse

Die *upstream* Sequenzen von *T. brucei* ATG8 wurden aus GeneDB (GeneDB, 2008) heruntergeladen und mit den erhaltenen GATC-Sequenzierungsdaten mit *bl2seq* (NCBI, 2008) verglichen. Bei den RACE-PCR-Produkten handelte es sich erwartungsgemäß um die zu untersuchenden ATG8.1A, B und 8.2 Abschnitte. Auftretende Punktmutationen lassen sich durch die wiederholte Vervielfältigung durch die *Taq*-Polymerase erklären. Alle

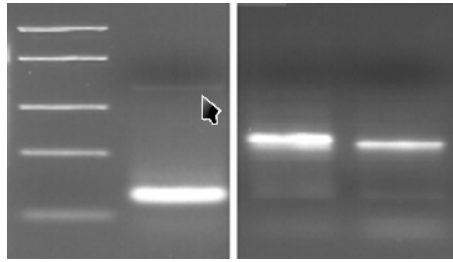


Abbildung 3.43: RACE-PCR von ATG8.1. 1:*FastRuler low range*, 2:PCR mit AP/ATG8.1(A&B)-as-Triple-KO, 3:*nested* PCR mit AUAP/VD8.1Aas, 4:*nested* PCR mit AUAP/VD8.1Bas

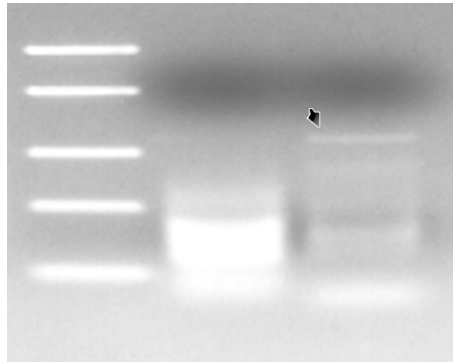


Abbildung 3.44: RACE-PCR von ATG8.2. 1:*FastRuler low range*, 2:PCR mit AP/ATG8.2-as-TripleKO, 3:*nested* PCR mit AUAP/VD8.1Aas

Sequenzen beinhalten 5'-terminal den *spliced leader*, wie für *trans*-gespleißte mRNA üblich. Es ergeben sich folgende Längen der 5'-UTRs (jeweils inkl. 35 b *SL*):

mRNA	5'-UTR	ohne SL	für Northern blot Sonden nutzbar
ATG8.1A	169 Basen	134 Basen	134b (UTR) + 91b (spezifisch) = 225b
ATG8.1B	150 Basen	115 Basen	115b (UTR) + 100b (spezifisch) = 215b
ATG8.2	228 Basen	193 Basen	193b (UTR) + 85b (vor RNAi Primer) = 278b

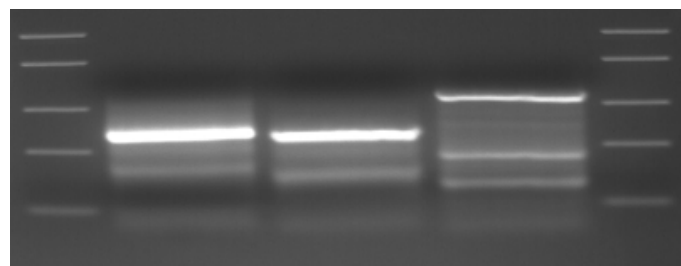


Abbildung 3.45: Gelextraktion zur Sequenzierung. 1+5: *FastRuler low range*, 2:AUAP/VD8.1Aas, 3:AUAP/VD8.1Bas, 4:AUAP/VD8.2

3.4 Charakterisierung der rekombinanten Klone

3.4.1 alpha-Tubulin

3.4.1.1 Optimierung der Induktionsparameter

Zur Induktion der RNA Interferenz wird in der Literatur die Zugabe von 100 ng/ml (Clayton et al., 2005) bis 10 $\mu\text{g/ml}$ (Djikeng et al., 2004) Tetracyclin oder 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin (Field, 2008) beschrieben. Die Induktion des α -Tubulin *knockdown* führt zu einem G2-Zellzyklusarrest. Es kommt zur Anreicherung von Zellen mit doppelt ausgebildeten Zellkernen, Kinetoplasten, Basalkörpern und Flagellen. Nach dem Synthesestopp des α -Tubulin kann keine mitotische Zellteilung erfolgen. Wird die Induktion allerdings durch Metabolisierung des Tetracyclins unterbrochen, so wird die α -Tubulinsynthese wieder aufgenommen. Dann wird die Teilung von Zellkern und Kinetoplast abgeschlossen und es folgt eine einmalige Zytokinese. Zu diesem Zeitpunkt manifestieren sich jedoch Defekte im Zytoskelett und es entstehen nicht mehr teilungsfähige, squarische *FAT* Zellen (Shi et al., 2000).

Um die optimalen Induktionsparameter zu bestimmen, wurde eine 24 *well* Platte mit je 2×10^5 Zellen (SMB, p2T7.alpha-Tubulin) pro ml und *well* beschickt. Die Kulturen wurden 24 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 500 ng/ml Tetracyclin induziert. Eine Negativkontrolle enthielt kein Tetracyclin. Der Versuch fand als Doppelbestimmung statt. Zur Auswertung wurden die Zellen resuspendiert und in 4 Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurde unterschieden zwischen morphologisch unauffälligen Zellen, und solchen, die einen beginnenden (mehrere Flagellen oder Deformationen) oder vollständigen (kugelförmige Zellen) Phänotyp zeigten. Durchschnittlich 33% aller Zellen zeigten uninduziert morphologische Veränderungen im

$c_{\text{Tetracyclin}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	1. Kultur		2. Kultur		Durchschnitt
	<i>NonFAT:FAT</i>	Anteil <i>FAT</i>	<i>NonFAT:FAT</i>	Anteil <i>FAT</i>	
0	31:15	33%	33:17	34%	33%
0.5	6:11	65%	3:12	80%	72%
1.0	7:14	67%	9:32	78%	72%
1.5	6:9	60%	8:9	53%	56%
2.0	5:14	74%	14:17	55%	64%
5.0	7:15	68%	11:33	75%	72%
10.0	13:14	52%	24:30	56%	54%

Abbildung 3.46: Ausprägung des *FAT* Phänotyps nach 24 stündiger Tetracyclin-Induktion. Angegeben wird das Verhältnis *NonFAT:FAT*, bzw. der prozentuale Anteil der *FAT* Zellen.

Sinne eines *FAT* Phänotyps. Der α -Tubulin *knockdown* war also *leaky*. Der maximale Anteil von *FAT* Zellen betrug 72% und wurde bereits ab 500 ng/ml Tetracyclin erreicht.

3.4.1.2 Lichtmikroskopische Aufnahmen des *FAT* Phänotyps

5e5/ml p2T7.alpha-Tubulin-SMB Zellen wurden mit 500 ng/ml Tetracyclin induziert. Nach 16 h und 40 h wurden Zellen fixiert, mit *Giemsa* Lösung gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Abbildungen 3.48 und 3.49 zeigen den charakteristischen Verlauf eines α -Tubulin *knockdowns*. Als Negativkontrolle dienten *long slender* SMB Zellen (Abbildung 3.47).

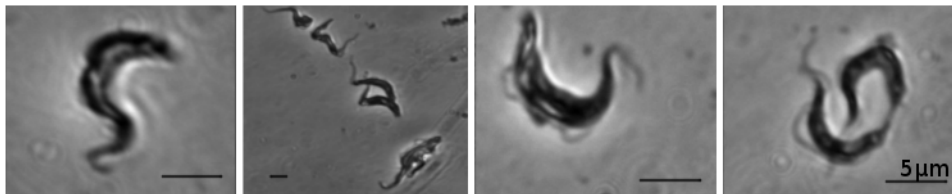


Abbildung 3.47: *Giemsa* Färbung von SMB (*single marker bloodstream form*) Zellen, *long slender*. Alle Balken entsprechen 5 μ m.

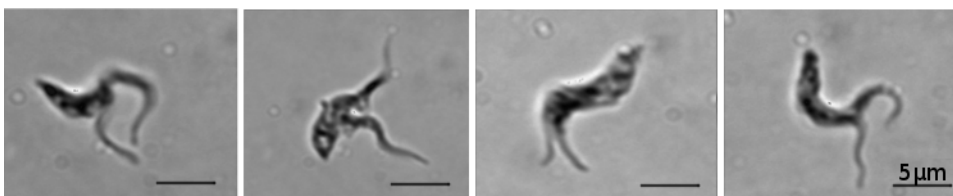


Abbildung 3.48: *Giemsa* Färbung von α -Tubulin defizienten SMB Zellen, 16h induziert mit 0.5 μ g/ml Tetracyclin. Alle Balken entsprechen 5 μ m.

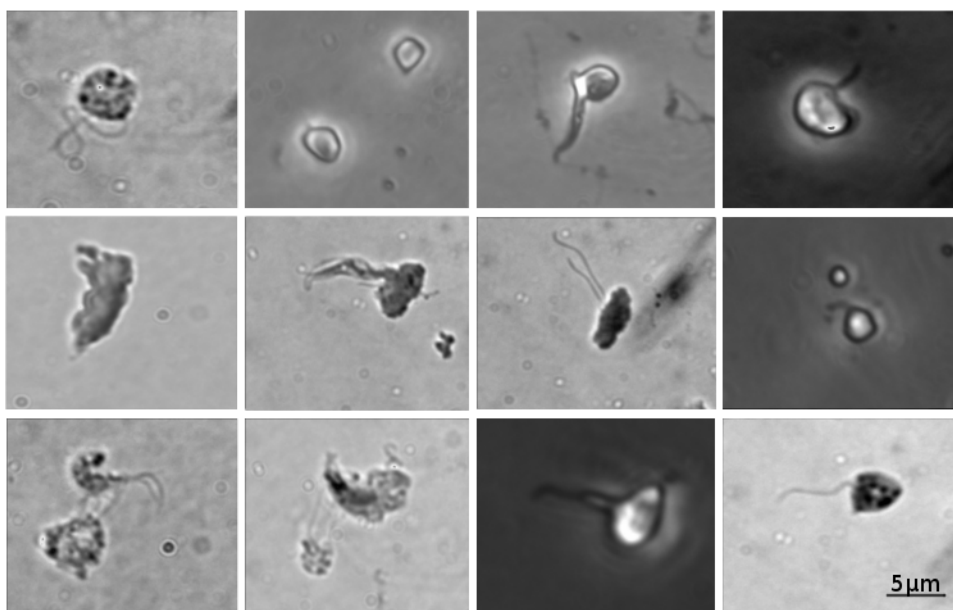


Abbildung 3.49: *Giemsa* Färbung von α -Tubulin defizienten SMB Zellen, 40h induziert mit 0.5 μ g/ml Tetracyclin. Alle Abbildungen mit gleichem Vergrößerungsmaßstab.

3.4.2 ATG8 triple *knockdown*

3.4.2.1 Northern dot blot screening

Bei der Elektroporation mit p2T7.ATG8.1-ATG8.2 wurden 5 Hygromycin-resistente Klone zur weiteren Kultivierung erhalten (Kapitel 3.2.7). Mit Hilfe eines *Northern dot blot screenings* sollte untersucht werden, welcher Klon eine hohe Induktionsfähigkeit mit einer geringen Hintergrundexpression dsRNA vereint. Dazu wurden für jeden Klon jeweils eine nicht-induzierte Kultur (2.0 $\mu\text{g/ml}$ G418, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin) und eine 5 h induzierte Kultur (zusätzlich 500 ng/ml Tetracyclin) zur Isolierung von gesamt-RNA genutzt. Es wurden jeweils 30 μl folgender Konzentrationen erhalten:

	I	I_{Ind}	II	II_{Ind}	III	III_{Ind}	IV	IV_{Ind}	V	V_{Ind}
c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	1.55	1.02	0.97	1.14	1.15	1.31	0.11	0.32	1.03	0.98
OD _{260nm/280nm}	2.23	2.19	2.22	2.24	2.18	2.19	2.20	2.14	2.19	2.15

Pro Probe wurden 3 μg RNA wie beschrieben (Kapitel 2.2.6.2) vorbereitet und auf einer Nitrocellulosemembran fixiert. Als *template* für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurden 40 ng des ATG8.1-ATG8.2-Addukts aus Kapitel 3.1.3 benutzt, das auch zur Klonierung in p2T7 verwendet wurde. Die Sonde diente damit hauptsächlich dem Nachweis von dsRNA, die zum Dicer/RISC vermittelten *knockdown* führt. Der durch Hybridisierung an ATG8 mRNA zu erwartende Hintergrund war dabei vernachlässigbar. Wie in Abbildung 3.50 dargestellt, sind die Klone I und II nur schwach *leaky*, dabei jedoch gut induzierbar. Der Unterschied in der Volumenintensität zwischen nicht-induzierten und induzierten Klonen wurde mit *QuantityOne* gemessen:

	I	I_{Ind}	II	II_{Ind}	III	III_{Ind}	IV	IV_{Ind}	V	V_{Ind}
Int. [AU]	1355	1928	1231	1946	1588	1974	2140	2254	1651	2001
Differenz	142%		158%		124%		105%		121%	

Die höchste Differenz wurde für Klon II erhalten. Alle weiteren Experimente wurden mit diesem Klon durchgeführt.

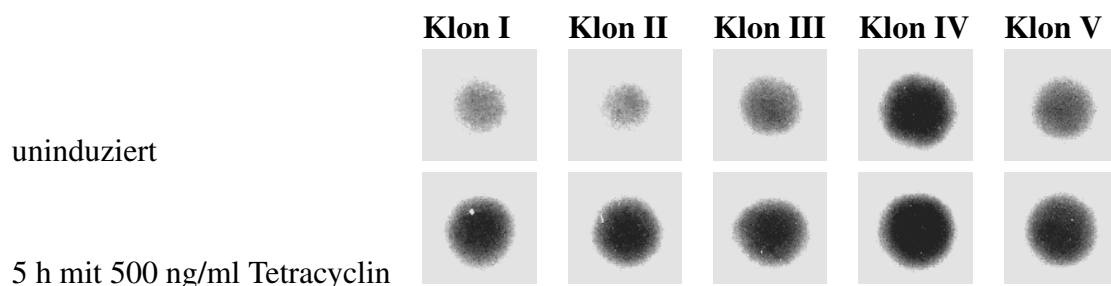


Abbildung 3.50: *Northern dot blot* von ATG8-Triple-KD-Trypanosomen zum Nachweis der Induzierbarkeit dsRNA mit ATG8.1-ATG8.2-Sonde

3.4.2.2 Northern Blotting

Das *Northern dot blot* Verfahren eignete sich aufgrund der fehlenden gelelektrophoretischen Auftrennung unterschiedlich großer RNA Fragmente besonders für schnelle Ras-teruntersuchungen vieler Proben. Allerdings konnten hier vermehrt unspezifische Wechselwirkungen auftreten. Der zuvor ausgewählte Klon II wurde nun erneut mittels konventionellem *Northern Blotting* untersucht. Dazu wurden nicht-induzierte ATG8⁻ Zellen und 24 h in 1500 ng/ml Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Zellen jeweils direkt verwendet oder 2.5 h in TDB gehungert. Als Kontrolle dienten SMB Zellen und gehungerte SMB Zellen. Bei der RNA-Isolierung wurden jeweils 30 μ l folgender Konzentration und Reinheit erhalten:

	SMB	SMB/Tet	ATG	ATG/Tet	ATG/TDB	ATG/TDB/Tet
c [μ g/ μ l]	1.34	1.27	1.29	0.94	1.17	0.96
OD _{260nm/280nm}	2.19	2.20	2.21	2.14	2.11	2.11

Pro Probe wurden 10 μ g gesamt-RNA in einer RNA-Gelelektrophorese 2h bei 120 V aufgetrennt. Die rRNA-Banden wurden unter UV-Licht fotografiert (Abbildung 3.51). Danach wurde die RNA in einem Kapillar *blot* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, über Nacht getrocknet und beidseitig je 150 s unter ultraviolettem Licht fixiert. Zusätzlich zur Auswertung der rRNA-Banden wurde eine Ladekontrolle über den Nachweis von β -Tubulin mRNA durchgeführt. Danach wurde wie bereits im *dot blot* Verfahren eine Hybridisierung mit dem ATG8.1-ATG8.2-Addukt vorgenommen. Die dabei auftretenden Banden wurden aufgrund ihrer Größe und Intensität als dsRNA interpretiert. Weitere Banden, die durch Hybridisierung mit ATG8-mRNA hätten entstehen können, waren nicht sichtbar.

Die *Northern blots* wurden eingescannt und die Bandenintensitäten mit der Software *QuantityOne* ausgewertet (Abbildung 3.52). Die ribosomalen RNA Banden der einzelnen Proben unterschieden sich in ihrer Intensität um 41 Prozentpunkte. Deutlich größere Un-

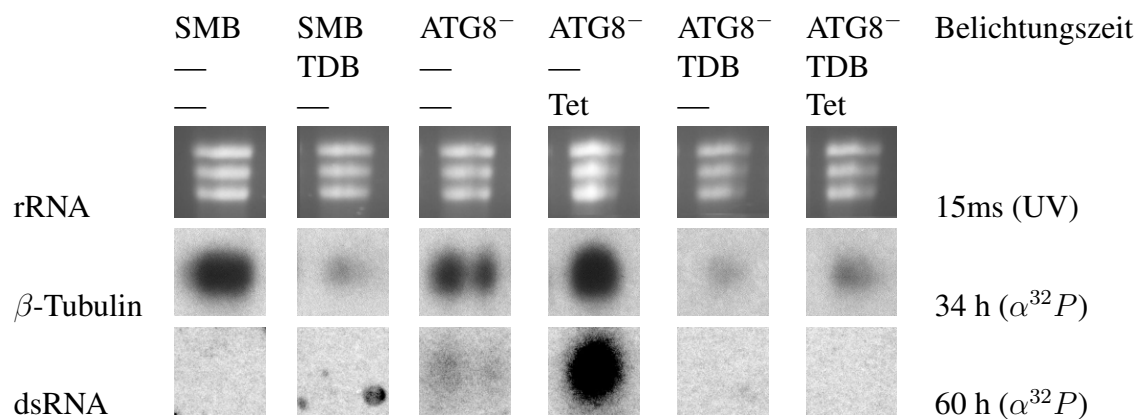


Abbildung 3.51: *Northern blot* mit 10 μ g RNA/Spur; TDB: 2.5 h in TDB pH 7.0; Tet: 24 h in 1.5 μ g/ml Tetracyclin

terschiede ergaben sich für die β -Tubulin Banden, die ursprünglich als zusätzliche Ladekontrolle dienen sollten. Es zeigte sich, daß TDB gehungerte Zellen offensichtlich nicht mehr in der Lage waren, β -Tubulin zu exprimieren. dsRNA konnte erwartungsgemäß nur in ATG8⁻ Zellen nachgewiesen werden. Nicht-induzierte ATG8⁻ Zellen transkribierten immerhin noch 31 % der dsRNA-Menge, die mit 1500 ng/ml Tetracyclin erreicht wurde und waren damit schwach *leaky*. Bemerkenswerterweise wurde in TDB gehungerten Zellen keine dsRNA mehr exprimiert. Vermutlich war der Stoffwechsel gehungerter Trypanosomen bereits zu stark verlangsamt. Für zukünftige Experimente sollte daher die Autophagie bevorzugt mit Rapamycin induziert werden.

Basierend auf den Ergebnissen der ATG8 5'-UTR-Längenbestimmungen (vgl. Kapitel

	SMB	SMB	ATG8 ⁻	ATG8 ⁻	ATG8 ⁻	ATG8 ⁻
	—	TDB	—	—	TDB	TDB
	—	—	—	Tet	—	Tet
rRNA	85 %	76 %	86 %	100 %	59 %	56 %
β -Tubulin	98 %	22 %	84 %	100 %	24 %	40 %
dsRNA	0 %	5 %	31 %	100 %	0 %	0 %

Abbildung 3.52: Quantitative Auswertung der *Northern blots*. Als Bezugspunkt wurde ATG8⁻/Tet gewählt.

3.3.7) wurden PCR Primer zur Darstellung spezifischer ATG8 mRNA Sonden konstruiert, die nicht mit der dsRNA überlappten. Eine PCR mit den Primerpaaren ATG8.1Ase/as-209bp-Northern, ATG8.1Bse/as-206bp-Northern und ATG8.2se/as-215bp-Northern lieferte die *templates* zur Herstellung radioaktiv markierter *Northern blot* Sonden (Abbildung 3.53). Der Nachweis der entsprechenden mRNAs gelang jedoch nicht. Vermutlich waren die Expressionslevel so gering, daß der Einsatz von jeweils 10 μ g gesamt-RNA pro Probe nicht ausreichend dimensioniert war. Bei zukünftigen Experimenten könnte es daher sinnvoll sein, im Anschluß an die RNA-Isolierung eine Aufreinigung von mRNA durchzuführen und diese in höheren Konzentrationen einzusetzen.

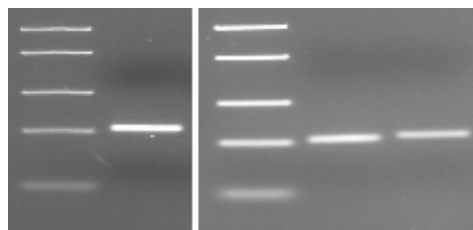


Abbildung 3.53: 2% (w/v) Agarose-GE, 1:FastRuler low range, 2:ATG8.1A-mRNA-Sonde, 3:FastRuler low range, 4: ATG8.1B-mRNA-Sonde, 5: ATG8.2-mRNA-Sonde

3.4.2.3 Western Blotting

Erste Versuche, ATG8 auf Proteinebene nachzuweisen, wurden mit ATG8 defizienten Zellen (nicht-induziert und 24 h mit 500 ng/ml Tetracyclin induziert) und SMB Kontrollzel-

len durchgeführt. Die Kulturen wurden jeweils ohne Rapamycin oder mit 5 μM Rapamycin inkubiert. Die erhaltenen *Western blots* wiesen Banden zwischen 55 und 70 kDa auf. Es gab Hinweise darauf, daß es sich hierbei um ATG8-Oligomere handeln könnte. Allerdings konnten diese Ergebnisse ohne weitere Experimente nicht abschließend beurteilt werden.

3.4.2.4 Wachstumskurven

Falls in *T. brucei* ATG8 zwingend zur Bildung von Autophagosomen erforderlich ist, sollten sich unter Bedingungen, die typischerweise Autophagie induzieren, deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen ATG8 defizienten Trypanosomen und Kontrollzellen zeigen. Eine Möglichkeit, Autophagie zu induzieren, stellt das Aushungern in Aminosäure-freiem *trypanosome dilution buffer* dar. Zellen, die den Nährstoffmangel durch selektiven Selbstverdau kurzzeitig kompensieren können, sollten hier länger überleben. Unbehandelte SMB Zellen, nicht-induzierte ATG8 defiziente Zellen, sowie 24 h mit 500 ng/ml Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Zellen wurden abzentrifugiert und in TDB aufgenommen, so daß die Zelldichte jeweils 1e6/ml betrug. Im Abstand von 20 min wurde die Zellzahl bestimmt. Dabei war zu beobachten, daß die Motilität der Trypanosomen aller Kulturen sehr rasch abnahm. Tote Zellen desintegrierten offensichtlich nicht sofort, wodurch eine zuverlässige Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wesentlich erschwert wurde. Nach 2.5 h waren alle drei Kulturen komplett eingebrochen. Aufgrund der Ungenauigkeiten bei der Zellzahlbestimmung und dem raschen Absterben der Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen gemessen werden. Das Makrolidantibiotikum Rapamycin eignet sich ebenfalls zur Induktion der Autophagie, indem es über die Inhibition von TOR eine unzureichende Nährstoffversorgung vor-täuscht (vgl. Kapitel 1.2). SMB, nicht-induzierte ATG8⁻, sowie 24 h mit 500 ng/ml Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Kulturen wurden in BF-Medium auf eine Zelldichte von 1e5/ml eingestellt. Es wurde jeweils eine Kontrollkultur ohne Rapamycin und eine Kultur mit 5 μM Rapamycin inkubiert. Zweimal täglich wurde die Zellzahl als Doppelbestimmung ermittelt (Abbildung 3.54).

Die Kulturen ohne Rapamycin zeigten ein normales exponentielles Wachstum bei vergleichbaren Generationszeiten. Die maximale Zelldichte betrug 2e6/ml. Nach ca. 55 h ging zuerst die Tetracyclin-induzierte ATG8⁻ Kultur in die Absterbephase über, danach folgten SMB und nicht-induzierte ATG8⁻ Kulturen nahezu gleichzeitig. Alle Kulturen mit Rapamycin wuchsen wesentlich langsamer und erreichten lediglich Zelldichten von 6e5/ml. Innerhalb der ersten 12 h halbierte sich die Zelldichte der SMB Kontrollzellen, während sich die ATG8 defizienten Zellen hingegen vermehrten. Danach zeigten alle Kulturen exponentielles Wachstum. Mit Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Zellen schienen kürzere Generationszeiten aufzuweisen als nicht-induzierte, was aber aufgrund der Daten nicht als gesichert betrachtet werden konnte. Gestützt wird diese Vermutung von der Tatsache,

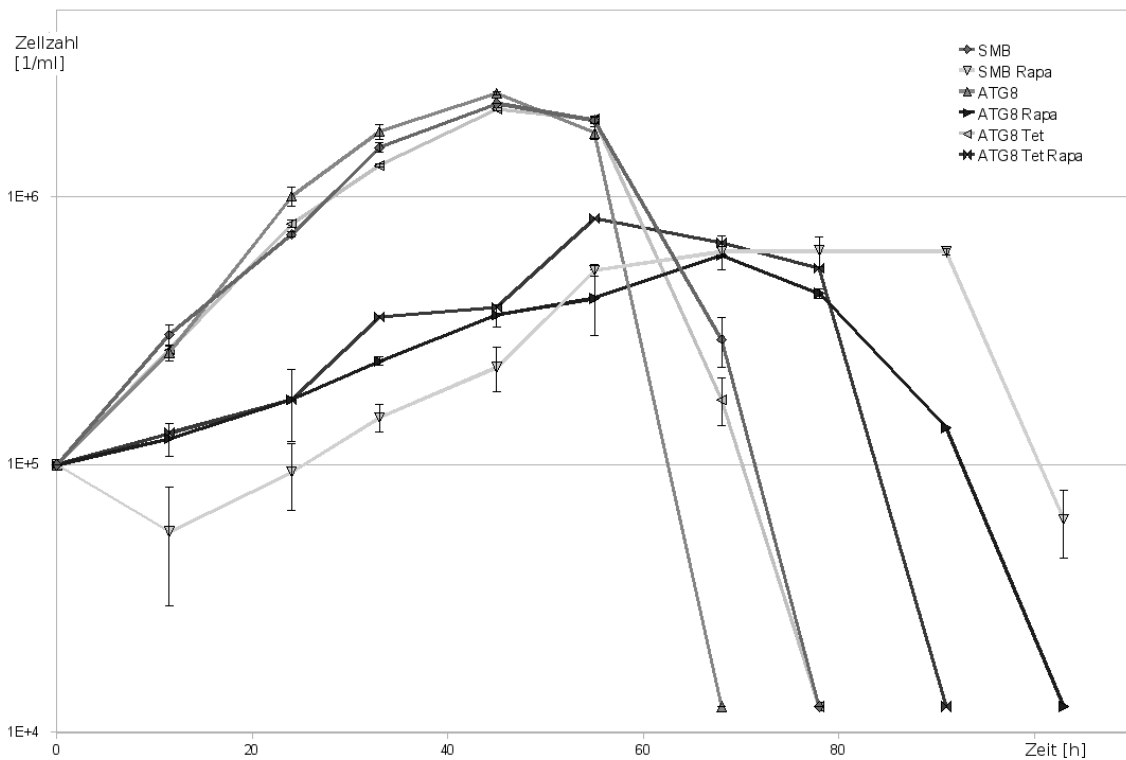


Abbildung 3.54: Wachstumskurven von SMB und ATG8 defizienten Zellen. Tet: 24 h vor Versuchsbeginn Induktion mit 500 ng/ml Tetracyclin. Rapa: Ab Versuchsbeginn 5 μ M Rapamycin im Medium.

daß die vermeintlich schnell proliferierenden induzierten ATG8⁻ Zellen am frühesten in die Absterbephase übergehen, gefolgt von den sich langsamer teilenden nicht-induzierten ATG8⁻ Zellen. Zuletzt erreichen die SMB Trypanosomen die Absterbephase, deren exponentielles Wachstum bei einem geringeren Basiswert begann.

3.4.2.5 Elektronenmikroskopie

Das Auftreten autophagischer Strukturen sollte elektronenmikroskopisch eindeutig erkennbar sein. Um zu untersuchen, ob ATG8 defiziente Trypanosomen die Fähigkeit zur Bildung von Autophagosomen verloren haben, wurden jeweils 1e8 SMB Kontrollzellen, nicht-induzierte ATG8⁻ Zellen, sowie 24 h mit 500 ng/ml Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Zellen für 2 h in TDB inkubiert. Danach wurden die Trypanosomen wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben in Eponharz eingebettet. Bei der nachfolgenden Betrachtung im Transmissionselektronenmikroskop wurde jedoch nicht in allen Proben auswertbares Zellmaterial gefunden. Offensichtlich überlebten zu wenige Zellen die 2-stündige Inkubation in TDB. Für zukünftige Versuche sollte daher der Einsatz von Rapamycin bevorzugt werden.

4. Diskussion

T. brucei scheint mit ATG3, ATG4, ATG7, sowie drei potentiellen ATG8-Orthologen (ATG8.1A, ATG8.1B, ATG8.2) über alle wesentlichen Komponenten des ATG8-Systems zu verfügen. Das alternative ATG12-System konnte dagegen bioinformatisch nicht in Trypanosomen nachgewiesen werden. Dennoch könnte sich im Laufe der Evolution ein weiterer, bislang unbekannter Umgehungsweg entwickelt haben, der die vollständige Ausbildung von Autophagosomen (*vesicle expansion and completion*) ermöglicht. In diesem Fall sollten Trypanosomen, deren Genexpression aller ATG8-Orthologe mittels RNA Interferenz blockiert wurde, weiterhin Autophagie betreiben können. Wäre ATG8 defizienten Zellen eine solche Kompensation jedoch nicht möglich, bliebe zu klären, ob mit ATG8.1 und ATG8.2 das ATG8-System selbst redundant ausgelegt ist. Vor dem Hintergrund, daß *T. cruzi* ATG8.2 in *Saccharomyces cerevisiae* ATG8 nicht substituieren kann, ist auch ein Funktionsverlust von *T. brucei* ATG8.2 nicht auszuschliessen.

Klonierung

Für die Konstruktion von RNAi Vektoren wurden Sequenzvergleiche von ATG8.1A, ATG8.1B und ATG8.2 vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß ATG8.1A und B über einen Bereich von 248 Nukleotiden identisch waren. Dies eröffnete die Möglichkeit, beide Gene durch eine geeignete Wahl der siRNA gleichzeitig abzuschalten. ATG8.2 wies zu den Genen ATG8.1A und ATG8.2B keine Homologie auf Nukleotidebene auf. Damit eignete es sich für die Konstruktion eines spezifischen *single knockdowns*.

Die Synthese der Genabschnitte, die zur Transkription von dsRNA eingesetzt werden sollten, wurde mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare ATG8.1(A&B)-se/as-LinkerPCR (für einen ATG8.1A/B *double knockdown*) bzw. ATG8.2-se/as-TripleKO (für einen ATG8.2 *single knockdown*) durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in den p2T7-Vektor, dessen *clo-*

ning site zuvor durch *Eam1105I*-Restriktionsverdau geöffnet wurde. Die korrekte Rekombination Ampicillin-resistenter Klone wurde über Restriktionsanalysen und Polymerasekettenreaktionen überprüft. In p2T7.ATG8.2 Transformanten konnten aufgrund der hohen Sensitivität der PCR auch Kontaminationen mit ATG8.1 nachgewiesen werden. Um bei zukünftigen RNAi Experimenten das Risiko unerwünschter *off-target* Effekte zu minimieren, wurde eine Plasmidisolierung mit nachfolgender Re-Transformation durchgeführt. Die Konstruktion von ATG8.1 A/B-ATG8.2 triple *knockdown* RNAi Vektoren erfolgte durch Kopplung der ATG8.1 A/B und ATG8.2 PCR Amplimere und nachfolgender Klonierung in p2T7. Ursprünglich sollten die PCR Produkte mit Hilfe von Subklonierungen in großer Ausbeute generiert werden. Eine Wiedergewinnung hätte danach über die Restriktionsschnittstellen des *TOPO TA* Subklonierungsvektors erfolgen können. Zusätzlich wurden die PCR Primer so konstruiert, daß am 3'-Terminus von ATG8.1 A/B und am 5'-Terminus von ATG8.2 eine *BseYI* Erkennungsstelle angehängt worden war. Hierüber hätten sich zueinander komplementäre Enden darstellen lassen, die eine *sticky ends* Ligation beider Fragmente ermöglicht hätten. Die Topoisomerase-gestützte Subklonierung lieferte für ATG8.2 rekombinante Kolonien, deren korrekte Insertion in Restriktionsanalysen bestätigt werden konnte. Für ATG8.1 A/B traten jedoch bei einer blau/weiß-Selektion wiederholt keine rein weißen (und damit rekombinanten) Kolonien auf. Die vorhandenen hellblauen Transformanten erwiesen sich in Restriktionsanalysen als selbstligiert. Mögliche Faktoren, die zu einer ineffizienten Insertion des ATG8.1 A/B geführt haben, könnten einerseits in der Ausbeute des PCR Produkts bestehen. Hier hätte der Einsatz größerer Volumina eine Effizienzsteigerung bewirken müssen. Andererseits wurde vom Hersteller eine Variation der Ligationsdauer zwischen 30 s und 30 min empfohlen. Ferner könnte durch den Einsatz unterschiedlicher Salzkonzentrationen sichergestellt werden, daß die Topoisomerase nach erfolgter Ligation nicht erneut an die DNA bindet und wiederholt Einzelstrangbrüche setzt. Obwohl die genannten Parameter mehrfach variiert wurden, gelang die Subklonierung von ATG8.1 A/B nicht. Daraufhin wurde versucht, die PCR Produkte ATG8.1 A/B und ATG8.2 unmittelbar über die *BseYI* Schnittstellen zu koppeln. Das in geringer Ausbeute entstehende Addukt sollte über eine PCR Amplifikation vermehrt werden. Der Nachteil dieses Verfahrens bestand zum einen darin, daß nur eine geringe Menge Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, das zudem mehrfach verlustbehaftet aufgereinigt werden musste. Zum anderen war die enzymatische Prozessierung von DNA Fragmenten, die *in vitro* synthetisiert wurden, ineffizienter als von subklonierter DNA. Bei minimalem Ligationserfolg führte eine nachfolgende PCR des Addukts zwangsläufig zu einer hohen Amplifikation von einzelsträngiger DNA, da die Primer auch an nicht ligierte DNA Fragmente banden. Tatsächlich wurde ein PCR Produkt korrekter Größe erhalten, das bei eingehender Untersuchung jedoch als fehlerhaft eingestuft werden musste. Schließlich wurden neue Primer konstruiert, die anstelle der Restriktionsstellen über Ankersequenzen verfügten. Über diese wurden die Fragmente ATG8.1 A/B und ATG8.2 mit

einer PCR Ligation erfolgreich gekoppelt und in p2T7 kloniert. Die korrekte Rekombination wurde mittels Restriktionsanalysen bestätigt.

Die Einsatzfähigkeit aller Konstrukte wurde durch Sequenzierungen abgesichert. Für RNAi Experimente stellten weder Punktmutationen, noch Deletionen zwingende Ausschlusskriterien dar, da der *knockdown* durch nur 21 Nukleotide umfassende siRNA vermittelt wurde. Damit blieb eine Erkennung der Ziel-mRNA stets gewährleistet.

Transfektion von *T. brucei*

Während konventionelle Experimente meist aus Kulturstabilaten als Vor- und Hauptkultur angesetzt werden, wurden für die vorliegende Arbeit größtenteils Dauerkulturen eingesetzt. Der Grund hierfür lag in der geringeren Verfügbarkeit von Kulturstabilaten, und der erweiterten *lag*-Phase nach dem Auftauen, die die Verwendung genetisch veränderter Zelllinien mit sich brachte. Die Herstellung von Stabilaten aus Versuchstieren würde hier größeren rechtlichen und praktischen Aufwand verursachen. Der notwendige Selektionsdruck müsste durch regelmässige Antibiose des Tieres aufrechterhalten werden, oder anschließend in Kultur stattfinden, was *de facto* einer Dauerkultur gleich käme. Außerdem ist eine Hygromycin-Selektion in Wildtyp-Mäusen aufgrund der hohen Toxizität nicht möglich (Uzureau et al., 2007). Insofern wurden die SMB-Zellen täglich verdünnt und damit im Bereich exponentiellen Wachstums gehalten. Stabilate wurden aus Zellkultur hergestellt. Es war bekannt, daß dieses Vorgehen eine Adaption der Zelllinie an das Medium nach sich ziehen konnte, was eventuell zur Entwicklung von rein monomorphen Stämmen geführt hätte.

Die Transfektion von *single marker bloodstreamform* Trypanosomen erfolgte mit p2T7-ATG8.1 A/B-ATG8.2 zur Erzeugung eines induzierbaren ATG8 triple *knockdown* und mit p2T7.alpha-Tubulin als Kontrolle. Die Plasmide wurden mit *Not I* linearisiert und über Elektroporationen in die Zellen eingeschleußt, wo sie über ribosomale *spacer* Regionen ins Trypanosomengenom integrierten. Die erfolgreiche Transfektion war von mehreren Parametern abhängig. 1) Der gesetzte Puls musste die Translokation der DNA ins Zytoplasma ermöglichen, sollte dabei aber eine möglichst hohe Überlebensrate der Zellen gewährleisten. 2) Die eingesetzte DNA-Menge und die zur Selektion verwendete Hygromycin-Konzentration mussten aufeinander abgestimmt werden. So führte eine hohe DNA Konzentration offensichtlich dazu, daß das Konstrukt in höherer Kopienzahl in das Genom integriert wurde. In der Folge genügte die synthetisierte Menge des Tetracyclin-Repressors nicht mehr, um die Tet Operator Regionen abzusättigen. Der *knockdown* wurde stark *leaky* und führte zu einem letalen Phänotyp. Andererseits bedingte eine geringe DNA-Menge eine weniger häufige Integration ins Wirtsgenom und führte damit automatisch zu einer potentiell geringeren Hygromycin-Resistenz. 3) Weiterhin musste sicher gestellt werden, daß die Zelldichte zu keinem Zeitpunkt $1e6/ml$ überstieg, um eine

Anreicherung des niedermolekularen Differenzierungsfaktors im Medium zu verhindern. Ansonsten wäre es zu einer Differenzierung in *short stumpy* Formen mit anschließender Prostaglandin D₂-vermittelter Apoptose gekommen. Sank die Zellzahl in der Selektionsphase jedoch unter 1e5/ml, wie es für die klonale Entwicklung einzelner rekombinanter Trypanosomen erwünscht war, so wurde der Einsatz spezieller supplementierter Medien erforderlich, um ein Wiederaanwachsen zu ermöglichen.

Zu Beginn wurden 50 µg DNA pro Elektroporation eingesetzt und nach einer 6-stündigen *recovery* Phase mit 10 µg/ml Hygromycin selektiert. Unter diesen Bedingungen führte ein Elektroporationspuls zu einer Überlebensrate zwischen 4% und 30%. Die mit p2T7.alpha-Tubulin elektroporierten Trypanosomen zeigten 18 h posttransfunktional einen ausgeprägten *FAT* Phänotyp. Ihre ATG8 defizienten Pendanten brachen innerhalb der ersten 6 h komplett ein. Die Elektroporationsparameter (1.1kV, 25µF, ∞ Ω, ca. 0.3ms) waren offensichtlich geeignet, um eine Aufnahme der DNA in die Zellen und ihre Integration zu bewirken. Danach wurde die DNA Menge schrittweise reduziert, bis weniger als 5% der α-Tubulin defizienten Zellen eine nicht-induzierte *FAT* Morphologie zeigten. 10 µg DNA erwiesen sich dabei als optimal. Bei den ATG8 defizienten Kulturen fand nun zeitweise ein Wachstum statt. Nach Ablauf von zwei Tagen starben jedoch alle Kulturen vollständig ab, was nun nicht mehr in einem letalen, konstitutiven *knockdown* begründet sein konnte. Auch eine Differenzierung aufgrund zu hoher Zelldichte schied als Möglichkeit aus, da die Zellzahl gegebenenfalls durch Verdünnung im exponentiellen Wachstumsbereich gehalten wurde. Vermutet wurde zuerst ein zu starker Selektionsdruck. Deshalb wurden SMB-Wachstumskurven mit unterschiedlichen Hygromycin-Konzentrationen aufgenommen. Es zeigte sich, daß innerhalb der ersten 15 h begonnene Zellteilungen vermutlich abgeschlossen wurden. Es fand höchstens eine Verdopplung der Zellzahl statt. Nach insgesamt 30 h starben die Zellen als Folge der gehemnten Proteinbiosynthese vollständig ab. Dies galt gleichermaßen für alle eingesetzten Konzentrationen. Folgende Schlussfolgerungen wurden gezogen: 1) Der Einsatz von lediglich 2.5 µg/ml Hygromycin war zur Selektion ausreichend. 2) Da maximal eine Verdopplung erfolgte, war eine Verdünnung von unter 5e5 Zellen/ml nicht notwendig. 3) Der Einbruch der elektroporierten Kolonien war auf die Hygromycin-Selektion zurückzuführen. Bei weiteren Elektroporationen mit lediglich 2.5 µg/ml kam es jedoch innerhalb von fünf Tagen zu keiner Erholung der Zellpopulation. Dies wurde so interpretiert, daß eine Entwicklung von hochverdünnten (oder einzelnen) Trypanosomen im BF-Medium nicht möglich war. Durch die Zugabe von unbehandelten SMB Zellen (*feeder* Trypanosomen) sollte das Medium konditioniert und die transgene Population stabilisiert werden. Bis zum Absterben der nicht-resistenten SMB Zellen hätte die Zelldichte rekombinanter Trypanosomen auf ein Niveau steigen sollen, auf dem deren eigenständiges Überleben gesichert wäre. Dieser Ansatz blieb jedoch erfolglos. Erst der Umstieg von BF-Medium auf HMI-9 Medium ermöglichte die klonale Entwicklung einzelner Trypanosomen. Gleichzeitig verkürzte sich die Generationszeit in

diesem Medium von 9.0 auf 6.6 h. Diese Wirkung wurde auf die proprietäre Komponente Serum Plus ® zurückgeführt, dessen Zusammensetzung jedoch nicht offengelegt ist. *Long slender* Trypanosomen synthetisieren Prostaglandin F_{2α}, dessen Wirkung als Wachstumsfaktor beispielsweise auf Lymphocyten bekannt ist. Der Versuch, BF-Medium mit PGF_{2α} zu supplementieren, zeigte nur marginale Effekte bezüglich der Eignung zur klonalen Vermehrung von Trypanosomen. Damit blieb HMI-9 für zukünftige Elektroporationen das Medium der Wahl.

Für die Elektroporation von Blutformen wurden unter den optimierten Versuchsbedingungen folgende Zellzahlen erhalten: Pro Elektroporation wurden 2.5e7 Zellen in 440 µl Cytomix eingesetzt, von denen unmittelbar nach dem Puls noch 10-70% überlebten. Nach Aufnahme in 36ml HMI-9 waren noch 10-30% der Zellen am Leben. Während der 6-stündigen *recovery* Phase nahm die Zelldichte wieder leicht zu. Nach der Zugabe von Hygromycin wurden innerhalb der ersten 10 h begonnene Zellteilungen abgeschlossen, in den nächsten 20 h starben nicht-rekombinante Zellen ab. Nach 3 Tagen waren wieder einzelne lebende Trypanosomen mikroskopisch zu beobachten und nach 5 Tagen waren in 1-5 *wells* transgene Populationen mit 1e5-8e5/ml vorhanden. Diese Werte können bei zukünftigen Elektroporationen als Vergleichsstandard dienen.

Sequenzanalyse der 5'-*untranslated regions*

Um die *down* Regulation von mRNA im Rahmen eines *knockdown* zu beweisen, wurden spezifische *Northern blot* Sonden benötigt, die zwischen 200 und 800 Basen groß sein sollten. Desweiteren sollten diese nicht mit der zur RNA Interferenz eingebrachten dsRNA überlappen. Um diesen Anforderungen zu genügen, war es für die verhältnismäßig kleinen ATG8-Gene notwendig, die 5'-*untranslated regions* in die Konstruktion der Sonden mit einzubeziehen. Deren Längen mussten jedoch experimentell bestimmt werden, da Transkriptome in Genomdatenbanken nicht nachgeschlagen werden konnten.

Zu Beginn wurde aufgrund vorhergegangener, laborinterner Experimente vermutet, daß die UTR-Regionen größer als 300bp waren. Die größten PCR Produkte, die mit den Primerpaaren SL23se/VD8.1A, VD8.1B und VD8.2 erhalten wurden, schienen dies zu bestätigen. Tatsächlich konnten mit Primern, die für die Amplifikation von 300bp großen Sonden konstruiert wurden (ATG8.Xse/as-Northern), PCR Produkte korrekter Größe erhalten werden, sofern cDNA als *template* eingesetzt wurde. Diente jedoch beispielsweise das PCR Produkt der Primerkombination SL23se/ATG8.1A-UTR-length als *template*, so wurde kein entsprechendes ATG8.1A Amplimer erhalten. Diese und weitere Beobachtungen zeigten, daß die *untranslated regions* tatsächlich deutlich kleiner sein mussten. Daß dennoch zuerst PCR Produkte amplifiziert wurden, könnte durch Kontamination der cDNA *templates* mit genomischer DNA oder ungespleißter, revers transkribierter RNA erklärt werden.

Der vermeintliche Vorteil, daß *in trans* gespleißte mRNA 5'-terminal stets mit einer *spliced leader* Sequenz beginnt, erwies sich für die UTR-Längenbestimmung als nicht unproblematisch. Zwar stand mit dem *spliced leader* Primer ein Werkzeug zur Verfügung, das eine unmittelbare Amplifikation beliebiger UTRs ermöglichen sollte. Doch mit einer Schmelztemperatur von lediglich 54 °C war dieser Primer zu unspezifisch und führte zur Amplifikation von zahlreichen Nebenprodukten. Eine Schmelzpunkterhöhung konnte durch einfache Verlängerung der Primers nicht erreicht werden, da dadurch seine Selbstkomplementarität zu stark gestiegen wäre. Verschiedene Ansätze wurden unternommen, um das jeweils korrekte Amplimer zu identifizieren. Unterschieden sich *sense* und *antisense* Primer in ihrer Schmelztemperatur deutlich, so erwies sich der Einsatz multipler Hybridisierungsstufen als hilfreich. Ebenso wurden mit der Durchführung verschachtelter PCRs entscheidende Hinweise erhalten. Die Reduktion der Schmelztemperatur des *antisense* Primers auf das Niveau des *spliced leader* Primers ermöglichte in einem Fall die korrekte Amplifikation ohne Nebenprodukte. Obwohl die Experimente durchaus zielführend waren, glich die Auswertung kriminalistischer Detailarbeit. Eine schnellere, effizientere und letztlich aufgrund der Sequenzierungsergebnisse aussagekräftigere Analyse konnte mit Hilfe der 5'-RACE-PCR erreicht werden.

In Abbildung 4.1 werden die Ergebnisse der einzelnen Experimente noch einmal zusammengefasst. ATG8.1A lies sich mit den laborintern bereits vorhandenen Primern SL23se/VD8.1Aas (mit einfacher *annealing temperature*) nur als sehr schwache Satellitenbande nachweisen. Eine *touchdown* PCR mit Primern gleicher Schmelztemperatur (SL23se/ATG8.1A-UTR-length-as) lieferte hingegen eine intensive Bande korrekter Länge.

ATG8.1B konnte unter verschiedenen Bedingungen mit SL23se / VD8.1Bas überhaupt nicht amplifiziert werden. Die klar definierten und intensiven Banden suggerierten eine UTR-Länge, die im nachhinein revidiert werden musste. Primer identischer Schmelztemperatur (SL23se/ATG8.1A-UTR-length-as) generieren eine Vielzahl von PCR-Produkten, darunter auch (aber nicht dominant) das Amplimer korrekter Länge. Verschachtelte PCRs nach Kapitel 3.3.4 blieben für ATG8.1A und B erfolglos. ATG8.2 wurde vom Primerpaar SL23se/VD8.2as erst unter modifizierten Hybridisierungsbedingungen (d.h. bei doppelter *annealing temperature*) als zusätzliche Bande sichtbar. Diese Bande konnte mittels einer verschachtelten PCR bestätigt werden.

Letztlich führte jedoch erst die RACE-PCR mit nachfolgender Sequenzierung zur eindeutigen Aufklärung der 5'-UTR-Länge aller drei ATG-mRNAs. Die tatsächlichen Längen der 5'-UTRs beliefen sich (inklusive *spliced leader* Sequenz) auf 169 Basen für ATG8.1A, 150 Basen für ATG8.1B und 228 Basen für ATG8.2.

Charakterisierung der rekombinanten Klone

Anhand der α -Tubulin defizienten Trypanosomen wurde bewiesen, daß die Herstellung transgener Blutformen und die Methode der RNA Interferenz unter den gewählten Bedin-

Primer	Kap.	Abb.	ATG8.1A	ATG8.1B	ATG8.2
SL23se/VD8.Xas	3.3.2	3.33	224 (✓)	211	421 (✓)
ATG8.Xse/as-Northern	3.3.3	3.34	304 ⚡	302 ⚡	302 ⚡
SL23se/ATG8.X-as-T.KO	3.3.4	3.36 / 3.38	484 ✓	465 ✓	581 ✓
SL23se/VD8.Xas	3.3.4	3.37 / 3.39	224	211	421 ✓
SL23se/ATG8.X-UTR-I.	3.3.5	3.40	253 ✓	231 (✓)	–
AP/ATG8.X-as-T.KO	3.3.6	3.43 / 3.44	>484 (✓)	>465 (✓)	> 581
AUAP/VD8.Xas	3.3.6	3.43 / 3.44	>224 ✓	>211 ✓	>421 ✓

Abbildung 4.1: Erwartete Banden aller durchgeführter PCRs. Legende: ✓ definierte Bande vorhanden; (✓) Bande vorhanden, aber nicht dominant; ⚡ Bande vorhanden, sollte aber ausgehend von mRNA gar nicht nachweisbar sein.

gungen funktionierten. Verschiedene Tetracyclin-Konzentrationen wurden zur Induktion eingesetzt. Es wurde festgestellt, daß bereits 500 ng/ml Tetracyclin ausreichten, um einen maximalen Phänotyp zu generieren. Dabei musste beachtet werden, daß ein *FAT* Phänotyp im Sinne sphärischer Zellkörper erst nach Wiederaufnahme der α -Tubulin Synthese ausgebildet wird. Wurden also besonders hohe, und damit vermeintlich wirkungsvolle Tetracyclin-Konzentrationen eingesetzt, so kam es primär zur Anreicherung von Zellen mit doppelt angelegten Zellkernen, Kinetoplasten, Basalkörpern und Flagellen. Der α -Tubulin *knockdown* führte zu einem G2-Zellzyklusarrest. Konnte das Tetracyclin aufgrund seiner Konzentration nicht schnell genug metabolisiert werden, kam es zu keiner erneuten α -Tubulin-Synthese. Damit wurde die Zellteilung nicht abgeschlossen und der morphologisch besonders auffällige sphärische *FAT* Phänotyp bildete sich nicht aus. Dennoch lag ein funktionierender *knockdown* vor.

Ausgehend von den fünf erhaltenen p2T7.ATG8.1 A/B-ATG8.2 Transfektanten wurde in einem *Northern dot blot* Verfahren derjenige Klon identifiziert, der unter Tetracyclin-Induktion die größte Transkriptionssteigerung von dsRNA erfuhr. Dieser Klon wurde zusammen mit SMB Kontrollzellen in einem *Northern blot* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Bei der Hybridisierung mit β -Tubulin Sonden fiel auf, daß die normalerweise sehr prominente Bande nur noch schwach sichtbar war, wenn die Zellen 2.5 h in TDB gehungert wurden. Unter Tetracyclin-Induktion lieferten ATG8⁻ Trypanosomen eine intensive dsRNA Bande. Nicht-induziert wurden noch 31 % Restintensität gemessen, was eine schwache Hintergrundexpression des RNAi Konstrukts offenbarte. Bei TDB gehungerten ATG8⁻ Zellen (induzierten und nicht-induzierten) konnte keine dsRNA mehr nachgewiesen werden. Dies wurde dahingehend interpretiert, daß das Aushungern in Aminosäure-freiem *trypanosome dilution buffer* zur Induktion von Autophagie nur bedingt geeignet war, da die Trypanosomen sehr rasch ihren Stoffwechsel verlangsamten. Wachstumsanalysen zeigten ebenso, daß nach kurzer Zeit in TDB die Motilität der Trypanosomen rasch abnahm und nach 2.5 h alle Zellen desintegriert waren. Die Autophagie-Induktion mit Rapamycin sollte deshalb zukünftig präferiert werden. ATG8 mRNA kann-

te weder mit Hilfe der ATB8.1 A/B-ATG8.2-Addukt-Sonde (die primär gegen die dsRNA gerichtet war), noch mit Hilfe spezifischer, auf Grundlage der 5'-UTR-Analysen konstruierter Sonden nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, daß die Expressionslevel so gering waren, daß der Einsatz von jeweils 10 µg gesamt-RNA pro Probe nicht ausreichte. Hier würde eventuell eine Steigerung der RNA Menge, kombiniert mit einer mRNA-Isolierung Abhilfe schaffen. Aufgrund des eindeutigen Nachweises der dsRNA und des erfolgreichen *proof of concept* mit einem α -Tubulin *knockdown* konnte jedoch davon ausgegangen werden, daß ATG8 in *T. brucei* erfolgreich herunterreguliert wurde.

Bei ersten *Western blots* mit Antikörpern gegen ATG8 wurden Banden zwischen 55 und 70 kDa erhalten. Es gab Hinweise darauf, daß es sich hierbei nicht um unspezifische Wechselwirkungen, sondern um den Nachweis von ATG8-Oligomeren handeln könnte. Außerdem wurden Hinweise darauf erhalten, daß die Expression von ATG8 durch Rapamycin induziert wurde. Dies würde bedeuten, daß ATG8 selbst an der Regulation der Autophagie beteiligt ist, und nicht etwa konstitutiv exprimiert wird. Diese vorläufigen Ergebnisse sind jedoch noch nicht gesichert und müssten in zukünftigen Projekten genauer überprüft werden.

Wachstumsanalysen ergaben, daß mit Rapamycin behandelte Trypanosomen durch deutlich längere Generationszeiten gekennzeichnet waren als unbehandelte Kontrollzellen. Innerhalb der ersten 12 h halbierte sich die Zelldichte von SMB Zellen unter Rapamycineinwirkung, da diese vermutlich vorrangig Autophagie betrieben oder in altruistischer Weise apoptotisch starben. Danach schien das Rapamycin weitgehend abgebaut zu sein, worauf sich die Zellpopulation erholte. ATG8⁻ Zellen zeigten auch unter Zugabe von Rapamycin keine Abnahme der Zelldichte, wenngleich die Wachstumsrate geringer war als bei den Rapamycin-freien Kontrollen. Offensichtlich waren diese Zellen weniger in der Lage, Autophagie zu betreiben, so daß statt dessen mehr Energie in die Proliferation investiert wurde. Dass das ursprüngliche Wachstumsniveau nicht erreicht wurde, könnte dadurch erklärt werden, daß neben dem ATG8 System entgegen bioinformatischer Voraussagen ein Alternativsystem zur Verfügung stand. Andererseits stellte TOR ein zentrales Element diverser Signalkaskaden dar, so daß die Inhibition von TOR neben der Induktion der Autophagie zu einer Vielzahl von Stoffwechselveränderungen führte. Mit Tetracyclin induzierte ATG8⁻ Zellen schienen unter Autophagiebedingungen nochmals schneller zu wachsen als nicht-induzierte, was dem Modell des induzierbaren *knockdown* entspräche. Entsprechend gingen die am schnellsten wachsenden (Tetracyclin induzierten) Zellen zuerst in die Absterbephase über, gefolgt von den nicht-induzierten Trypanosomen, die jedoch leicht *leaky* waren. Die SMB Kontrollzellen überlebten am längsten, da sie ihr exponentielles Wachstum aufgrund des anfänglichen Einbruchs bei einem geringeren Basiswert begannen.

Eine vollständige Charakterisierung ATG8 defizienter Zellen würde eine elektronenmikroskopische Untersuchung autophagischer Strukturen einschließen. Obwohl eine voll-

ständige Phänotypisierung nicht Teil dieser Arbeit war, wurden erste Versuche in diese Richtung bereits vorbereitet. Durchgeführte Einbettungen lieferten jedoch bislang nicht genügend zelluläres Probenmaterial aufgrund des schnellen Absterbens der TDB gehungerten Trypanosomen. Hier sollte deshalb zukünftig Rapamycin zur Induktion der Autophagie genutzt werden.

Die in der Einleitung benannten Ziele konnten im Rahmen dieser Arbeit vollständig erreicht werden. Darüber hinaus wurden weiterführende Experimente begonnen, die die Basis für zukünftige Untersuchungen der hier generierten Zelllinien bilden.

5. Abstract

Autophagy is a means which allows eukaryotic cells to selectively self-digest cellular components or whole compartments in order to adapt to new environmental conditions, to re-organize during differentiation or to overcome times of lack of nutrients. It seems that an evolutionary simple autophagic system has been conserved in trypanosomes, the causative agent of African sleeping sickness. Out of two known systems, which are responsible for the expansion and completion of autophagosomes, apparently only one, namely the ATG8-based system, seems to be present in *T. brucei*.

Three potential ATG8 orthologues have been identified in *T. brucei*, two of them being nearly identical. In this work an inducible knockdown of all three ATG8 genes has been established by RNA interference. Therefore *single marker bloodstream form* trypanosomes have been used, which express T7 RNA polymerase and tetracyclin repressor. The RNAi vector contained two T7 promoter and Tet operator sites in opposite directions, allowing dsRNA to be expressed under tetracyclin induction.

At first, ATG8.1 A/B double knockdown and ATG8.2 single knockdown constructs were cloned into *E. coli*. Afterwards, the ATG8.1 A/B and ATG8.2 PCR products were coupled by PCR ligation technique and cloned, leading to a triple knockdown construct. The correct composition of all RNAi constructs was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing. SMB cells were transfected with the p2T7.ATG8.1 A/B-ATG8.2 triple knockdown construct and p2T7.alpha-tubulin as positive control. Foremost, the electroporation of bloodstream forms had to be established as a new method in the laboratory. Therefore several parameters, including the best suited amount of DNA, convenient concentration of selective antibiotics, measurement of cell density control and variation of medium supplements, had to be optimized. In order to elucidate ATG8 mRNA levels by Northern blotting, specific probes had to be constructed. This implicated the need to determine the length of the ATG8 5'-untranslated regions by several methods, including 5'-RACE PCR. The knockdown strains were analysed by Northern blotting and it was

tested which induction parameters lead to the best results. The effect of autophagy and its potential knockdown was visualized in growth curves. An explicit analysis of the respective phenotypes was not part of this work.

A. Appendix

A.1 Sequenzanalysen

A.1.1 ATG8.1A (Tb927.7.5900)

```
/* 351 Nukleotide, 116 Aminosäuren */
/* für ATG8.1A spezifischer Sequenzbereich */
1 ATG AAG TAT AAC TTC AAG GAT TCA CAT TCT CTG GTA AAG CGA TTG AAT GAA TCC GCA AAG 60
  Met Lys Tyr Asn Phe Lys Asp Ser His Ser Leu Val Lys Arg Leu Asn Glu Ser Ala Lys
61 GTG CGC AAG AGT CAC CCC AAC CAT TTT CCC G 91
  Val Arg Lys Ser His Pro Asn His Phe Pro Val
/* für ATG8.1A und B identischer Seq.bereich */
92 TC ATA TGT GAA AAG GTG TAT AAC TCC GAT 120
  Val Ile Cys Glu Lys Val Tyr Asn Ser Asp
  |--ATG
121 ATT GGT GAG TTA GAC AGG TGT AAA TTT CTC GTC CCA TCT GAT CTA ACG GTC GGA CAG TTT 180
  Ile Gly Glu Leu Asp Arg Cys Lys Phe Leu Val Pro Ser Asp Leu Thr Val Gly Gln Phe
  8.1(A&B)-se-TripleKO--|
181 GTC AGC GTG CTA CGC AAA CGT GTG CAG CTG GAA GCC GAA TCT GCA CTC TTC GTT TAT ACC 240
  Val Ser Val Leu Arg Lys Arg Val Gln Leu Glu Ala Glu Ser Ala Leu Phe Val Tyr Thr
241 AAT GAC ACA GTA CTC CCC TCC AGT GCG CAA ATG GCG GAC ATT TAC TCC AAA TAT AAG GAT 300
  Asn Asp Thr Val Leu Pro Ser Ser Ala Gln Met Ala Asp Ile Tyr Ser Lys Tyr Lys Asp
  |ATG8.1
301 GAA GAC GGT TTC CTA TAC ATG AAA TAT TCA GGT GAG GCG 339
  Glu Asp Gly Phe Leu Tyr Met Lys Tyr Ser Gly Glu Ala
  (A&B)-as-TripleKO-|
/* für ATG8.1A spezifischer Sequenzbereich */
340 GCA TTT GGA TAA 351
  Ala Phe Gly Term
```

A.1.2 ATG8.1B (Tb927.7.5910)

```
/* 363 Nukleotide, 120 Aminosäuren */
/* für ATG8.1B spezifischer Sequenzbereich */
1 ATG AGT AAA AAA GAT AGC AAG TAC AAA ATG AGC CAC ACC TTT GAG AGC CGA CAG TCG GAT 60
  Met Ser Lys Lys Asp Ser Lys Tyr Lys Met Ser His Thr Phe Glu Ser Arg Gln Ser Asp
```

61	GCC GCA AAG GTG CGT GAA AGG CAT CCG GAT CGT TTG CCC A	100
	Ala Ala Lys Val Arg Glu Arg His Pro Asp Arg Leu Pro Ile	
	/* für ATG8.1A und B identischer Seq.bereich */	
101		TC ATA TGT GAA AAG GTG TAT 120
		Ile Ile Cys Glu Lys Val Tyr
121	AAC TCC GAT ATT GGT GAG TTA GAC AGG TGT AAA TTT CTC GTC CCA TCT GAT CTA ACG GTC 180	
	Asn Ser Asp Ile Gly Glu Leu Asp Arg Cys Lys Phe Leu Val Pro Ser Asp Leu Thr Val	
	--ATG8.1(A&B)-se-TripleKO--	
181	GGA CAG TTT GTC AGC GTG CTA CGC AAA CGT GTG CAG CTG GAA GCC GAA TCT GCA CTC TTC 240	
	Gly Gln Phe Val Ser Val Leu Arg Lys Arg Val Gln Leu Glu Ala Glu Ser Ala Leu Phe	
241	GTT TAT ACC AAT GAC ACA GTA CTC CCC TCC AGT GCG CAA ATG GCG GAC ATT TAC TCC AAA 300	
	Val Tyr Thr Asn Asp Thr Val Leu Pro Ser Ser Ala Gln Met Ala Asp Ile Tyr Ser Lys	
301	TAT AAG GAT GAA GAC GGT TTC CTA TAC ATG AAA TAT TCA GGT GAG GCG 348	
	Tyr Lys Asp Glu Asp Gly Phe Leu Tyr Met Lys Tyr Ser Gly Glu Ala	
	--ATG8.1(A&B)-as-TripleKO--	
	/* für ATG8.1B spezifischer Sequenzbereich */	
349		ACA TTT GGA TGC 360
		Thr Phe Gly Cys
361	TAA	363
	Term	

A.1.3 ATG8.2 (Tb927.7.3320)

/* 405 Nukleotide, 134 Aminosäuren */

/* für ATG8.2 spezifischer Seq.bereich */

1	ATG CCT TCA CAC TAC CGG TAC CAG TAC ACA CGT AGT TTT GCT GAA CGC GCG AAG GAA ACA 60	
	Met Pro Ser His Tyr Arg Tyr Gln Tyr Thr Arg Ser Phe Ala Glu Arg Ala Lys Glu Thr	
61	GAA TCC GCG CGC TTG CGC TAC CCC AAA CAC ATT CCC ATC CTT TGC GAG CCC ACT TCA GCC 120	
	Glu Ser Ala Arg Leu Arg Tyr Pro Lys His Ile Pro Ile Leu Cys Glu Pro Thr Ser Ala	
	--ATG8.2-se-TripleKO--	
121	GCT AGC GCC TCT ACA CCG CGT GAT GTG AGG CTC TTC TCC ACA CGG CAG CAG GTG CAG CGC 180	
	Ala Ser Ala Ser Thr Pro Arg Asp Val Arg Leu Phe Ser Thr Arg Gln Gln Val Gln Arg	
181	GAG CTG GAC TGT AAT AAG TTT CTT CTC CCT GAA ACT GCT ACC GTT ATG GAG TTC ATG ATG 240	
	Glu Leu Asp Cys Asn Lys Phe Leu Leu Pro Glu Thr Ala Thr Val Met Glu Phe Met Met	
241	GCG CTG CGG CAG CGG CTG CTG CTA GAA GAG GGT CAA GCC GTA TTT GTG TTT ATA GGA AAT 300	
	Ala Leu Arg Leu Leu Leu Glu Glu Gly Gln Ala Val Phe Val Phe Ile Gly Asn	
301	GAA CTA CCG CCG AAC AGT GCC TGC TTG GGA GAC ATT TAC GCA AGG GCA AAA GAC CCT GAT 360	
	Glu Leu Pro Pro Asn Ser Ala Cys Leu Gly Asp Ile Tyr Ala Arg Ala Lys Asp Pro Asp	
	--ATG8.2-as-TripleKO--	
361	GGC TTT CTG TAC GTG TCG TAT GGT GTG GAA AAT ACA TTT GGT TGA 405	
	Gly Phe Leu Tyr Val Ser Tyr Gly Val Glu Asn Thr Phe Gly Term	

A.1.4 p2T7 RNAi Vektor

GAATTCGATCGGAGGCGAATCGCTCAGTAGTGTGTAGTCAGGCGATTGTTCTCTTTCCATTTCCGGCTCGCTCTCTGTGCCAGAAAGGCTTTGGAGTCTGGTTACTCGTGGGACTAGG 0001-0120
 GCARCGCTCGCTTCCCTAATAATTTGTTGCTAACGTTTCCACCGTGGTGTGGATATCTTCCAAAGTTGTGATTTCTCTACCCCTCTCTTTTCCGGCGCGGTCTAAGCTTCTCCCAACTAG 0121-0240
 CCGATTTCCATGATACGGGGTCCACATAGTCCCTGTGTGTAATTTGGATGCCATCGGGCAGGCTACATCGGGCGCGGATAAAATGATAGATGATCTCCGTGTGGAGAGA 0241-0360
 CCGTGGCCACAGTTTGTACCATGGAATTTCTTCGATAGAGTATATCGATGCGGAAATGATGCTACGGTCCAGTGTGATGCTGTGGTCTCCCATGTGTTTGTGACGGTGTACCAA 0361-0480
 TTATCTTTGCACTAATGGGCTATGGAATCTTTCCCTTTAATCAGGGGGACATGTTATCCACGCCAGTAGTCTGGAATTAGAATACATACCAACTATATAGCTCGAATTTCCGATTA 0481-0600
 TGAATCGGCCAACCGCGGGGAGGCGGTTTGGCTATTGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCAGTCTGCTCGCTCGGTCTGGCTCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG 0601-0720
 CGGTTAATACGTTTATCCACAGATCAGGGGATAACCGCAGGAAGAACAATGTGAGCAAAAGGCCAGAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTC 0721-0840
 CGCCCCCTGCGAGCATCACAAAATCGACCTCAGTCCGAGGTTGGCGAAACCGCACAGGACTATAAAGATACAGGGGCTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCCTGTTCGG 0841-0960
 ACCCTCGCCCTTACCGATACCTCCCGCTTCCCGTCCGGAGCGTGGCGCTTTCTCATAGTCCAGCTGTAGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTCCAGTCCAGTGGCGT 0961-1080
 GTGACGAAACCCCGGTTACGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGTAACATCGTCTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACAGCTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGATTAG 1081-1200
 AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAGA 1201-1320
 GTTGTAGCTCTTGTATCCGGCAACAACACCCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGCAAGCAGAGATTACCGCGAGAAAAGGATCTCAAGAAGTCTTGTATCTTTCTACG 1321-1440
 GGGTGTACGCTCAGTGGAAACGAAACTCAGCTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCTCTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAG 1441-1560
 ATATAGATTAACCTTGTGCTGACAGTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACTTCTCAGCGATCTGCTATTTGCTTCACTCAGTGTGCTGCTGACTCCCGTGGTGTAGATAACTAG 1561-1680
 ATCCGGAGGCGTTTACCATGTCCCGGCTGCTGCAATGATCCCGGAGCCACCGCTCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCACCGCGAAGGCGCGAGCAAGTGTG 1681-1800
 CCTCAACTTTATCCCGCTCCATCCAGTCTAATAATGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTGTGCCAGTAAATAGTTTGGCAACGTTGTGCCATTGCTACAGGCATCTGGTGTCA 1801-1920
 CGCTCGCTGGTTGGTATGGCTCAATCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTACATGATCCCCATGTTGTCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTGTGTCAGA 1921-2040
 AGTAAGTTGGCCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCAATAATCTCTACTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGA 2041-2160
 GAATAGTGTATGGCGGACCGAGTTGCTCTTCCCGCGGCAATACGGGATAATCCCGCCACATACAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC 2161-2280
 TCBAAGATCTTACCGCTTGTAGATCCAGTTCGATGTAACCACTCGTGCACCACTGATCTTACGATCTTTTACTTTCCACACGCTTTCTGGTGAAGAAAACAGGAGGCAAAAT 2281-2400
 CGCCGAAAAGGGAATAAGGCGGACCGAAAGTGTGAATACATACCTCTCCCTTTTCAAAATATTAAGAAGCTTATCAGGGTATTTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT 2401-2520
 TTTAGAAAATAAACAATAAGGGGTTCCCGGACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGAGCTCTAAGAACCATTATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACTAGGAGCC 2521-2640
 TTTGCTTCCCGGCTTCCGTTGATGACGGTGAACAACTTGACACATGACGCTCCCGGAGAGCGGTCAACGTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCGCTCAGGGCGGCTCA 2641-2760
 CGCGGTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACATGCGGCACTCAGAGCAGATTGACTGAGAGTCCACCACTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGATAGGAAGCAGCCAGTAG 2761-2880
 TAGTGTAGGCGGTTGGCAGCCCGCCCGCAGGAATGGTGAAGAGATGGCGCCAAAGTCCCGCCACCGGGCTGCCACCATACCCAGCCGGAACAGCGCTCATGAGCCG 2881-3000
 AAGTGGCGCCGCTCTCCCATGCTGGTGTGCGGATATGGCCCAACACCGCACTGTGGCGGCTGATGCGCGCTCCGGGTAGAGATCTGGCTAGAGATA 3001-3120
 CTGCATAGATAACAACCGCATCAACAACAACCTGGTGGCACTATTCAATCATGTCCACACCAACAGCAGAAAATTTGAGTTAAACAAGTGCCTCAACCCCTATATTTATCTTCA 3121-3240
 AGTATCTTCTCTCTTGTGGCTGTACGTAATGTTGCAAAATAGGCATAGGGCTGAGTCAAGCCACACCGCGAGGAAAATATAAGCACTAGCCGCTCACTCACAGCCAG 3231-3360
 TACAGACAATTTTGGCCACAACCCGGTGTAGGATCTCCGAGGCTCTATTCCTTTGGCTCCGAGCAGTGTGGGGCGTGGTTTCCACTATGGCGAGTACTTCTCAACACGCACT 3361-3480
 CGGCTCAGCGCCGCGCTTCTGGCGGCGATTGTTGACGCCGCAAGTCCCGGCTCCGGATCGGAGTGTGCTGCGATCGACCTCGCCGCAAGTGCATCATGAAATTTCCGCTCA 3481-3600
 CCAAGTCTGTAGAGTTGGTCAAGCAATCGGAGCATATAGCCCGGAGCGCGGATCTGCAAGCTCCGGATGCTCCCGCTCGAAGTAGCGGCTGCTGCTCCATACAGCA 3601-3720
 ACCACGGCTCCAGAGAAATGTTGGCGACTCGTATTTGGGAATCCCGAACATCGCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTTGTCGCTCAGGACATTTGTGGAGCGCA 3721-3840

A.2.2.2 ATG8.1B mRNA

```

/* 5'-untranslated region */
-150          AAC GCT ATT ATT AGA ACA GTT TCT GTA CTA -121
              ... .. Spliced Leader ..
              |-----|
-120 TAT TGg acc agc gct aga aaa caa att tta tta gta aac agt aag taa ccc gct aca gcc -61
              ... .. C.. .. sequenziert
              ----|
-60  tga att gat att cac cac tgg tac ata taa aaa gaa agc aca gaa gaa tta gtg tac ata -1
              ... .. sequenziert

/* für ATG8.1B spezifischer Sequenzbereich */
  1  ATG AGT AAA AAA GAT AGC AAG TAC AAA ATG AGC CAC ACC TTT GAG AGC CGA CAG TCG GAT   60
      Met Ser Lys Lys Asp Ser Lys Tyr Lys Met Ser His Thr Phe Glu Ser Arg Gln Ser Asp
              |-----| VD8.1Bas -----
61  GCC GCA AAG GTG CGT GAA AGG CAT CCG GAT CGT TTG CCC A                               100
      Ala Ala Lys Val Arg Glu Arg His Pro Asp Arg Leu Pro Ile
      -|

/* für ATG8.1A und B identischer Seq.bereich */
101          TC ATA TGT GAA AAG GTG TAT 120
              Ile Ile Cys Glu Lys Val Tyr

```

A.2.2.3 ATG8.2 mRNA

```

/* 5'-untranslated reATG8.1 A | mRNA (RACE-PCR)gion */
-228          AAC GCT ATT ATT AGA ACA GTT TCT GTA CTA TAT TGT cga aga gca tta -181
              ... .. Spliced Leader ..
              |-----|
-180 gag cct tgt agg cgt tgg cgg gag ttg tta gat atc aag gga ccg cgt gtg cgt ttt gtg -121
              ... .. sequenziert
-120 tgt gtc att ata ggc aaa ggg gag aag gaa gaa agg tga gct tcg tat tgc aag tga ata -61
              ... .. sequenziert
-60  gta gta tca gtg act gta tta cgg ggc tgc aga ggt acc agt ttc aca gtc att aca ttt -1
              ..G .. sequenziert

/* für ATG8.2 spezifischer Seq.bereich */
  1  ATG CCT TCA CAC TAC CGG TAC CAG TAC ACA CGT AGT TTT GCT GAA CGC GCG AAG GAA ACA   60
      Met Pro Ser His Tyr Arg Tyr Gln Tyr Thr Arg Ser Phe Ala Glu Arg Ala Lys Glu Thr
              ..A ..
61  GAA TCC GCG CGC TTG CGC TAC CCC AAA CAC ATT CCC ATC CTT TGC GAG CCC ACT TCA GCC   120
      Glu Ser Ala Arg Leu Arg Tyr Pro Lys His Ile Pro Ile Leu Cys Glu Pro Thr Ser Ala
              |---ATG8.2-se-TripleKO---|
121  GCT AGC GCC TCT ACA CCG CGT GAT GTG AGG CTC TTC TCC ACA CGG CAG CAG GTG CAG CGC   180
      ... ..N .. sequenziert
      Ala Ser Ala Ser Thr Pro Arg Asp Val Arg Leu Phe Ser Thr Arg Gln Gln Val Gln Arg
              |---VD8.2as--
181  GAG CTG GAC TGT AAT AAG TTT CTT CTC CCT GAA ACT GCT ACC GTT ATG GAG TTC ATG ATG   240
      Glu Leu Asp Cys Asn Lys Phe Leu Leu Pro Glu Thr Ala Thr Val Met Glu Phe Met Met
      ---VD8.2as-----|

```

A.2.3 Manuell ausgewertete Rohdaten

p2T7.ATG8.1-ATG8.2

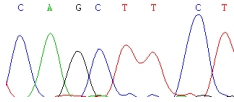
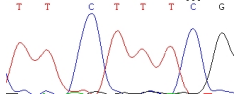
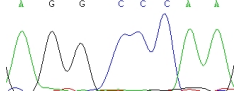
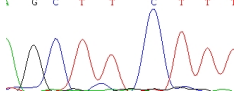
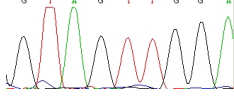
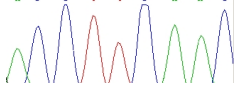
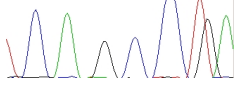
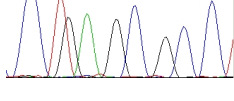
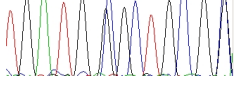
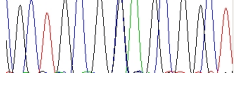
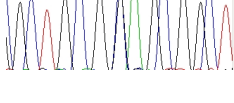
#4962	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4983	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4992	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5005	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5090-5091	2x Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5297	Punktmutation	nichtcodierend	
#5416-5418	3x Deletion	für RNAi ok	
#5609	Deletion	für RNAi ok	

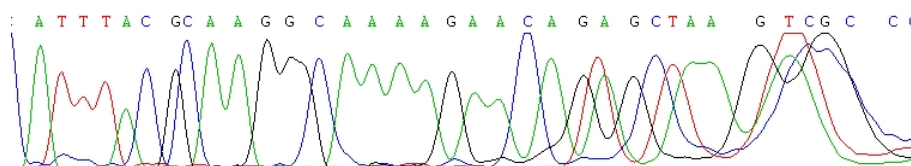
p2T7.ATG8.1

#4757	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>C G G C T C T T C</p>
#4962	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>A T T G C T C A G</p>
#4983	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>C C A A C T C A G</p>
#5094	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>T A T T G C T C A</p>
#5115	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>G C C A A C T C A</p>
#5297	Mutation	nichtcodierend	<p>T A G T T G G A A</p>
#5629	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>C T C A C C A A</p>

p2T7.ATG8.2

#4770	2x Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>C A G T T A C C C</p>
#4865	Lesefehler	in Rohdaten ok	<p>G C T T G C A T G</p>
#4940	Deletion	Rohdaten evtl. ok	<p>T T G G C C C A A G</p>

#4990	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4992	Deletion	für RNAi ok	
#5072	Deletion	für RNAi ok	
#5124	Deletion	für RNAi ok	
#5297	Mutation	für RNAi ok	
#5416	9x Deletion	für RNAi ok	
#5460	2x Deletion	für RNAi ok	
#5465	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5580	10x Deletion	in Rohdaten ok	
#5590	4x Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5595	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5680	29x nicht automatisch erfasst	in Rohdaten ok	



p2T7.alpha-Tubulin

#4887	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4913	Deletion	Rohdaten evtl. ok	
#4918	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4944	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4951	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4962	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#4983	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5033	3x Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5046	Lesefehler	in Rohdaten ok	

#5111	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5120	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5194	Lesefehler	in Rohdaten ok	
#5297	Mutation	nichtcodierend	
#5375	2x Del, 5x Fehler	in Rohdaten ok	
#5414	Deletion	nichtcodierend	
#5802	Lesefehler	in Rohdaten ok	

Literaturverzeichnis

- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., and Kohmoto, K. (1997). Aal-toxin-deficient mutants of *alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology*, 87(9):967–72.
- Alibu, V. P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., and Horn, D. (2005). A doubly inducible system for rna interference and rapid rnai plasmid construction in *trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 139(1):75–82.
- Allen, C. L., Goulding, D., and Field, M. C. (2003). Clathrin-mediated endocytosis is essential in *trypanosoma brucei*. *EMBO J*, 22(19):4991–5002.
- Alsford, S., Glover, L., and Horn, D. (2005). Multiplex analysis of rna interference defects in *trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 139(1):129–32.
- Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J. J., and Turk, B. (2008). Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 283(6):3454–64.
- AOG (2008). Ärzte ohne grenzen. <http://www.msf.org/>.
- Aravin, A. and Tuschl, T. (2005). Identification and characterization of small rnas involved in rna silencing. *FEBS Lett*, 579(26):5830–40.
- Barry, J. D. and Emery, D. L. (1984). Parasite development and host responses during the establishment of *trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology*, 88 (Pt 1):67–84.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L., and Gull, K. (2000). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated rna interference system. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18):3321–8.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxii* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the dna. *Cell*, 46(6):819–26.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.-J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A.,

- Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M. A., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M. R., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E., and El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the african trypanosome *trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733):416–22.
- Best, A., Handoko, L., Schlüter, E., and Göringer, H. U. (2005). In vitro synthesized small interfering rnas elicit rna interference in african trypanosomes: an in vitro and in vivo analysis. *J Biol Chem*, 280(21):20573–9.
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Morrison, L. S., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *leishmania major*. *J Biol Chem*, 281(16):11384–96.
- Borst, P. (1986). How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). *Biochim Biophys Acta*, 866(4):179–203.
- Borst, P. and Ulbert, S. (2001). Control of vsg gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol*, 114(1):17–27.
- Burkard, G., Fragoso, C. M., and Roditi, I. (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 153(2):220–3.
- Cann, A. J. (2008). Principles of molecular virology, 4th edition (9 aug 2005), virus immunopathology. <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035Immunopath.html>.
- Chimelli, L. and Scaravilli, F. (1997). Trypanosomiasis. *Brain Pathol*, 7(1):599–611.
- Chu, T. C., Twu, K. Y., Ellington, A. D., and Levy, M. (2006). Aptamer mediated sirna delivery. *Nucleic Acids Res*, 34(10):e73.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2172–5.
- Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R., and Blenis, J. (1992). Rapamycin-fkbp specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd s6 protein kinases. *Cell*, 69(7):1227–36.
- Clarkson, A. B., Bienen, E. J., Pollakis, G., and Grady, R. W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite *trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J Biol Chem*, 264(30):17770–6.
- Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? from fly to man and back again. *EMBO J*, 21(8):1881–8.

- Clayton, C. E., Estévez, A. M., Hartmann, C., Alibu, V. P., Field, M., and Horn, D. (2005). Down-regulating gene expression by rna interference in trypanosoma brucei. *Methods Mol Biol*, 309:39–60.
- Codogno, P. and Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1509–18.
- Collins, R. E. and Cheng, X. (2005). Structural domains in rna. *FEBS Lett*, 579(26):5841–9.
- Cross, G. (2008). Laboratory of molecular parasitology. <http://tryps.rockefeller.edu/>.
- Cross, G. A. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of trypanosoma brucei. *Parasitology*, 71(3):393–417.
- DaRocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M. R., and Donelson, J. E. (2004). Tests of cytoplasmic rna interference (rna) and construction of a tetracycline-inducible t7 promoter system in trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol*, 133(2):175–86.
- De Asua, L. J., Clingan, D., and Rudland, P. S. (1975). Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin f2alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(7):2724–8.
- Denninger, V., Koopmann, R., Muhammad, K., Barth, T., Schoenfeld, C., and Duszenko, M. (2008). Kinetoplastida as model organisms for simple autophagic pathways. *Methods in Enzymology (in press)*.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., and Crespo, J. L. (2008). The role of tor in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, 4(7):851–65.
- Djikeng, A., Shen, S., Tschudi, C., and Ullu, E. (2004). Analysis of gene function in trypanosoma brucei using rna interference. *Methods Mol Biol*, 265:73–83.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S., and Ullu, E. (2003). An sirna ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in trypanosoma brucei. *RNA*, 9(7):802–8.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001). Rna interference in trypanosoma brucei: cloning of small interfering rnas provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide rnas. *RNA*, 7(11):1522–30.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., Tamar, S., Olivier, M., and Papadopoulou, B. (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J*, 16(10):2590–8.
- Dunn, W. A., Cregg, J. M., Kiel, J. A. K. W., van der Klei, I. J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A. A., Stasyk, O. V., and Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy*, 1(2):75–83.
- Durand-Dubief, M. and Bastin, P. (2003). Tbago1, an argonaute protein required for rna interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in trypanosoma brucei. *BMC Biol*, 1:2.

- Duszenko, M. (1998). Aspekte der infektionsbiologie: Afrikanische trypanosomen und schlafkrankheit, *biologie in unserer zeit* 28, 72-81.
- Duszenko, M., Ferguson, M. A., Lamont, G. S., Rifkin, M. R., and Cross, G. A. (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of trypanosoma brucei bloodstream forms in vitro. *J Exp Med*, 162(4):1256–63.
- Duszenko, M., Mühlstädt, K., and Broder, A. (1992). Cysteine is an essential growth factor for trypanosoma brucei bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol*, 50(2):269–73.
- EAGLE, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130(3373):432–7.
- El-Sayed, N. M. A., Ghedin, E., Song, J., MacLeod, A., Bringaud, F., Larkin, C., Wanless, D., Peterson, J., Hou, L., Taylor, S., Tweedie, A., Biteau, N., Khalak, H. G., Lin, X., Mason, T., Hannick, L., Caler, E., Blandin, G., Bartholomeu, D., Simpson, A. J., Kaul, S., Zhao, H., Pai, G., Van Aken, S., Utterback, T., Haas, B., Koo, H. L., Umayam, L., Suh, B., Gerrard, C., Leech, V., Qi, R., Zhou, S., Schwartz, D., Feldblyum, T., Salzberg, S., Tait, A., Turner, C. M. R., Ullu, E., White, O., Melville, S., Adams, M. D., Fraser, C. M., and Donelson, J. E. (2003). The sequence and analysis of trypanosoma brucei chromosome ii. *Nucleic Acids Res*, 31(16):4856–63.
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., and Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227(4693):1485–7.
- Fairlamb, A. H. and Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*, 46:695–729.
- FAO (2008). Ernährungs- und landwirtschaftsorganisation. <http://www.fao.org/>.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling dna restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132(1):6–13.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984). “a technique for radiolabeling dna restriction endonuclease fragments to high specific activity”. addendum. *Anal Biochem*, 137(1):266–7.
- Fermentas (2008). <http://www.fermentas.de>.
- Field, M. (2008). Trypanosoma brucei functional genomics project. <http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>.
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L., Kubata, B. K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., and Duszenko, M. (2005). Prostaglandin d2 induces programmed cell death in trypanosoma brucei bloodstream form. *Cell Death Differ*, 12(4):335–46.
- Figarella, K., Uzcategui, N. L., Beck, A., Schoenfeld, C., Kubata, B. K., Lang, F., and Duszenko, M. (2006). Prostaglandin-induced programmed cell death in trypanosoma brucei involves oxidative stress. *Cell Death Differ*, 13(10):1802–14.
- Filipowicz, W. (2005). Rnai: the nuts and bolts of the risc machine. *Cell*, 122(1):17–20.

- Flynn, I. W. and Bowman, I. B. (1973). The metabolism of carbohydrate by pleomorphic african trypanosomes. *Comp Biochem Physiol B*, 45(1):25–42.
- Freymann, D. M., Metcalf, P., Turner, M., and Wiley, D. C. (1984). 6 a-resolution x-ray structure of a variable surface glycoprotein from trypanosoma brucei. *Nature*, 311(5982):167–9.
- Frohman, M. A. (1993). Rapid amplification of complementary dna ends for generation of full-length complementary dnas: thermal race. *Methods Enzymol*, 218:340–56.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cdnas from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23):8998–9002.
- GATC Biotech (2008). <http://www.gatc-biotech.com/de/index.php>.
- GeneDB (2008). Trypanosoma brucei gene database. <http://www.genedb.org/genedb/try/>.
- Glättli, E. (1988). Licht- und elektronenmikroskopische untersuchungen zur entwicklung von trypanosoma brucei brucei (protozoa, kinetoplastida) in der tsetsefliege, glossina morsitans centralis (insecta, diptera). dissertation, universität basel, schweiz.
- Haile, S., Estevez, A. M., and Clayton, C. (2003). A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mrnas. *RNA*, 9(12):1491–501.
- Hall, N., Berriman, M., Lennard, N. J., Harris, B. R., Hertz-Fowler, C., Bart-Delabesse, E. N., Gerrard, C. S., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bowman, S., Bray-Allen, S. P., Bringaud, F., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R., Doggett, J., Fraser, A., Grüter, E., Hall, S., Harper, A. D., Kay, M. P., Leech, V., Mayes, R., Price, C., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Reitter, C., Rutherford, K., Sasse, J., Sharp, S., Shownkeen, R., MacLeod, A., Taylor, S., Tweedie, A., Turner, C. M. R., Tait, A., Gull, K., Barrell, B., and Melville, S. E. (2003). The dna sequence of chromosome i of an african trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism. *Nucleic Acids Res*, 31(16):4864–73.
- Hara, T., Yasuda, K., and Fukuma, T. (2002). Effective gene transfer into trypanosoma brucei bloodstream forms by particle bombardment. *Mol Biochem Parasitol*, 119(1):117–9.
- Herman, M., Gillies, S., Michels, P. A., and Rigden, D. J. (2006). Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*, 2(2):107–18.
- Herman, M., Pérez-Morga, D., Schtickzelle, N., and Michels, P. A. M. (2008). Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of trypanosoma brucei. *Autophagy*, 4(3):294–308.
- Hirumi, H. and Hirumi, K. (1994). Axenic culture of african trypanosome bloodstream forms. *Parasitol Today*, 10(2):80–4.
- Horn, D. (2008). Horn lab. <http://homepages.lshstm.ac.uk/~ipmbdhor/Horn%20Lab%20-%20Protocols.htm>.

- Hutvagner, G. (2005). Small rna asymmetry in rnai: function in risc assembly and gene regulation. *FEBS Lett*, 579(26):5850–7.
- Huynh, T. T., Huynh, V. T., Harmon, M. A., and Phillips, M. A. (2003). Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by rnai in the parasitic protozoa trypanosoma brucei demonstrates that it is an essential enzyme. *J Biol Chem*, 278(41):39794–800.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811):488–92.
- International Laboratory for Research on Animal Diseases, N. (1991). Annual report of the international laboratory for research on animal diseases. <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/Ilrad90/Trypano.htm>.
- Invitrogen. Oligoperfect™ designer. <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>.
- Invitrogen (2008). The technology behind topo cloning. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/PCR-cloning/PCRC-Misc/The-Technology-Behind-TOPO-Cloning.html>.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by rnai. *Nat Biotechnol*, 21(6):635–7.
- Kapushoc, S. T., Alfonzo, J. D., Rubio, M. A., and Simpson, L. (2000). End processing precedes mitochondrial importation and editing of trnas in leishmania tarentolae. *J Biol Chem*, 275(48):37907–14.
- Keiser, J., Stich, A., and Burri, C. (2001). New drugs for the treatment of human african trypanosomiasis: research and development. *Trends Parasitol*, 17(1):42–9.
- Kessler, P. S. and Parsons, M. (2005). Probing the role of compartmentation of glycolysis in procyclic form trypanosoma brucei: Rna interference studies of pex14, hexokinase, and phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 280(10):9030–6.
- Kibbe, W. (2008). Oligonucleotide properties calculator. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of apg8/aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*, 151(2):263–76.
- Kirkegaard, K., Taylor, M. P., and Jackson, W. T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2(4):301–14.
- Koenig, K., Menge, U., Kiess, M., Wray, V., and Flohé, L. (1997). Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from crithidia fasciculata. *J Biol Chem*, 272(18):11908–15.

- Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in trypanosoma brucei. *J Exp Med*, 192(9):1327–38.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kda apg12-apg5.apg16 multimeric complex, mediated by apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 277(21):18619–25.
- Lamont, G. S., Tucker, R. S., and Cross, G. A. (1986). Analysis of antigen switching rates in trypanosoma brucei. *Parasitology*, 92 (Pt 2):355–67.
- Landfear, S. M. (2003). Trypanosomatid transcription factors: waiting for godot. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1):7–9.
- Lecordier, L., Walgraffe, D., Devaux, S., Poelvoorde, P., Pays, E., and Vanhamme, L. (2005). Trypanosoma brucei rna interference in the mammalian host. *Mol Biochem Parasitol*, 140(1):127–31.
- Lenz, G. (2005). The rna interference revolution. *Braz J Med Biol Res*, 38(12):1749–57.
- Levine, B. and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115(10):2679–88.
- Li, F. and Gottesdiener, K. M. (1996). An efficient method for stable transfection of bloodstream-form trypanosoma brucei. *Nucleic Acids Res*, 24(3):534–5.
- Liang, X.-H., Liu, Q., and Michaeli, S. (2003). Small nucleolar rna interference induced by antisense or double-stranded rna in trypanosomatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7521–6.
- Liu, Z., Styblo, M., and Rosen, B. P. (2006). Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environ Health Perspect*, 114(4):527–31.
- Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., and Davis, M. M. (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of t cell receptor delta chain. *Science*, 243(4888):217–20.
- Lund, A. H., Duch, M., and Pedersen, F. S. (1996). Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res*, 24(4):800–1.
- Macherey-Nagel (2008). <http://www.mn-net.com>.
- Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B., and McKerrow, J. H. (2004). A cathepsin b-like protease is required for host protein degradation in trypanosoma brucei. *J Biol Chem*, 279(46):48426–33.
- Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded rna processing by dicer. *Science*, 311(5758):195–8.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9):741–52.

- McIntyre, G. J. and Fanning, G. C. (2006). Design and cloning strategies for constructing shrna expression vectors. *BMC Biotechnol*, 6:1.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded rna. *Nature*, 431(7006):343–9.
- Mijaljica, D., Prescott, M., Klionsky, D. J., and Devenish, R. J. (2007). Autophagy and vacuole homeostasis: a case for self-degradation? *Autophagy*, 3(5):417–21.
- Milhausen, M., Nelson, R. G., Sather, S., Selkirk, M., and Agabian, N. (1984). Identification of a small rna containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell*, 38(3):721–9.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Carrington, M., and Field, M. C. (2002a). The kinetoplastida endocytic apparatus. part i: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol*, 18(11):491–6.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Field, M. C., and Carrington, M. (2002b). The endocytic apparatus of the kinetoplastida. part ii: machinery and components of the system. *Trends Parasitol*, 18(12):540–6.
- Morris, J. C., Wang, Z., Drew, M. E., and Englund, P. T. (2002). Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *EMBO J*, 21(17):4429–38.
- Motyka, S. A. and Englund, P. T. (2004). RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol*, 7(4):362–8.
- Navé, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R., and Shepherd, P. R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*, 344 Pt 2:427–31.
- NCBI (2008). National center for biotechnology information, blast 2 sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.
- Nelson, T. J. (2008). Ima1 image analysis and measurement lab. <http://brneurosci.org/tnimage.html>.
- New England Biolabs (2008). www.neb.com.
- Ohara, O., Dorit, R. L., and Gilbert, W. (1989). One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(15):5673–7.
- Ohsumi, Y., Kamada, Y., Noda, T., and Suzuki, K. (2004). NIBB annual report, division of molecular cell biology. http://www.nibb.ac.jp/annual_report/2004/090.html.
- Ohsumi, Y. and Mizushima, N. (2004). Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol*, 15(2):231–6.
- Olson, A., Sheth, N., Lee, J. S., Hannon, G., and Sachidanandam, R. (2006). RNAi codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D153–7.

- OpenWetWare (2008). http://openwetware.org/wiki/Main_Page.
- Opperdoes, F. R. and Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in trypanosoma brucei: the glycosome. *FEBS Lett*, 80(2):360–4.
- Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., and Kessler, P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 115(1):19–28.
- Parsons, M., Nelson, R. G., Watkins, K. P., and Agabian, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*, 38(1):309–16.
- Patzel, V., Rutz, S., Dietrich, I., Köberle, C., Scheffold, A., and Kaufmann, S. H. E. (2005). Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol*, 23(11):1440–4.
- Pittenger, Wolfe, Hoehn, Daily, and McGuire (1953). Preliminary studies in the production and biologic activity on a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.*, 3:1268–1278.
- Preall, J. B. and Sontheimer, E. J. (2005). RNAi: RISC gets loaded. *Cell*, 123(4):543–5.
- Qiagen (2008). <http://www.qiagen.com>.
- Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7037–44.
- Redmond, S., Vadivelu, J., and Field, M. C. (2003). RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol*, 128(1):115–8.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22(3):326–30.
- Richmond, G. S. and Smith, T. K. (2007). A novel phospholipase from trypanosoma brucei. *Mol Microbiol*, 63(4):1078–95.
- Rigden, D. J., Herman, M., Gillies, S., and Michels, P. A. M. (2005). Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 5):972–4.
- RNAit (2008). RNAit. <http://trypanofan.path.cam.ac.uk/software/RNAit.html>.
- Roditi, I. and Clayton, C. (1999). An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol*, 103(1):99–100.
- Roditi, I. and Schwarz, H. (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of trypanosoma brucei. *J Cell Biol*, 108(2):737–46.
- Ross, D. T., Raibaud, A., Florent, I. C., Sather, S., Gross, M. K., Storm, D. R., and Eisen, H. (1991). The trypanosome vsg expression site encodes adenylate cyclase and a leucine-rich putative regulatory gene. *EMBO J*, 10(8):2047–53.

- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132:365–86.
- Rusconi, F., Durand-Dubief, M., and Bastin, P. (2005). Functional complementation of rna interference mutants in trypanosomes. *BMC Biotechnol*, 5:6.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 239(4839):487–91.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–4.
- Sanger (2008). The wellcome trust sanger institute. http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei/.
- Shi, H., Chamond, N., Tschudi, C., and Ullu, E. (2004a). Selection and characterization of rna interference-deficient trypanosomes impaired in target mrna degradation. *Eukaryot Cell*, 3(6):1445–53.
- Shi, H., Djikeng, A., Chamond, N., Tschudi, C., and Ullu, E. (2005). Repression of gene expression by the coliphage ms2 coat protein in trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol*, 144(1):119–22.
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., and Ullu, E. (2000). Genetic interference in trypanosoma brucei by heritable and inducible double-stranded rna. *RNA*, 6(7):1069–76.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, C., and Ullu, E. (2004b). Argonaute protein in the early divergent eukaryote trypanosoma brucei: control of small interfering rna accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol*, 24(1):420–7.
- Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2006). An unusual dicer-like1 protein fuels the rna interference pathway in trypanosoma brucei. *RNA*, 12(12):2063–72.
- Simpson, L., Aphasizhev, R., Gao, G., and Kang, X. (2004). Mitochondrial proteins and complexes in leishmania and trypanosoma involved in u-insertion/deletion rna editing. *RNA*, 10(2):159–70.
- Sloof, P. and Benne, R. (1997). Rna editing in kinetoplastid parasites: what to do with u. *Trends Microbiol*, 5(5):189–95.
- Sommer, J. M., Cheng, Q. L., Keller, G. A., and Wang, C. C. (1992). In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of trypanosoma brucei and mutational analysis of the c-terminal targeting signal. *Mol Biol Cell*, 3(7):749–59.
- Steverding, D. and Tyler, K. M. (2005). Novel antitrypanosomal agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 14(8):939–55.
- Teixeira, S. M. R. and daRocha, W. D. (2003). Control of gene expression and genetic manipulation in the trypanosomatidae. *Genet Mol Res*, 2(1):148–58.
- TIGR (2008). The institute for genomic research. <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/>.

- Tschudi, C., Djikeng, A., Shi, H., and Ullu, E. (2003). In vivo analysis of the rna interference mechanism in trypanosoma brucei. *Methods*, 30(4):304–12.
- Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded rna induces mrna degradation in trypanosoma brucei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14687–92.
- Tyler, K. (2003). Maintenance of parasitaemia - is it to die for? *Kinetoplastid Biol Dis*, 2(1):2.
- Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H., and Tschudi, C. (2002). Rna interference: advances and questions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1417):65–70.
- Ullu, E., Tschudi, C., and Chakraborty, T. (2004). Rna interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 6(6):509–19.
- Uzcategui, N. L., Szallies, A., Pavlovic-Djuranovic, S., Palmada, M., Figarella, K., Boehmer, C., Lang, F., Beitz, E., and Duszenko, M. (2004). Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from trypanosoma brucei. *J Biol Chem*, 279(41):42669–76.
- Uzureau, P., Felu, C., De Muylder, G., Pays, E., and Vanhamme, L. (2007). G418, phleomycin and hygromycin selection of recombinant trypanosoma brucei parasites refractory to long-term in vitro culture. *Mol Biochem Parasitol*, 154(1):90–4.
- Vercesi, A. E., Grijalba, M. T., and Docampo, R. (1997). Inhibition of ca²⁺ release from trypanosoma brucei acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the na⁺/h⁺ exchanger. *Biochem J*, 328 (Pt 2):479–82.
- Vickerman, K. (1965). Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature*, 208(5012):762–6.
- Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E., and Englund, P. T. (2000). Inhibition of trypanosoma brucei gene expression by rna interference using an integratable vector with opposing t7 promoters. *J Biol Chem*, 275(51):40174–9.
- WHO (2008). World health organization. <http://www.who.org>.
- Wikipedia (2008). Transspleißen. <http://de.wikipedia.org/wiki/Transsplei%DFen>.
- Wirtz, E. and Clayton, C. (1995). Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science*, 268(5214):1179–83.
- Wirtz, E., Hoek, M., and Cross, G. A. (1998). Regulated processive transcription of chromatin by t7 rna polymerase in trypanosoma brucei. *Nucleic Acids Res*, 26(20):4626–34.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol*, 99(1):89–101.
- Witola, W. H., Inoue, N., Ohashi, K., and Onuma, M. (2004). Rna-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in trypanosoma evansi confers resistance to diminazene aceturate. *Exp Parasitol*, 107(1-2):47–57.

Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1542–52.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Stefan Boris Mogk
geboren am 16. Oktober 1980
in Esslingen a. N.

Zum Wäldle 10
72768 Reutlingen
stefan@virtualmogk.de

Besuchte Schulen

1987-1991

Grundschule Oferdingen

1991-2000

Gymnasium des Bildungszentrums Reutlingen-Nord

Praktikum

18.5.1998

Berufsorientierung am Tübinger Max-Planck-Institut
für Biologie

bis 20.5.1998

Schulabschluss

27.06.2000

Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse Mathematik / Physik
Gesamtnote 1.2

Auszeichnungen

Buchpreis des Fonds der chemischen Industrie als bester
Abiturient im Fach Chemie des Jahrgangs 2000 am BZN

Urkunde des Vereins der Freunde des Gymnasiums BZN
für hervorragende Leistungen im Seminarkurs "Gentechnik
und Ethik"

Buchpreis der Stadt Reutlingen für hervorragende schuli-
sche Leistungen

Zivildienst

1.8.2000

Eberhard Karls Universitätsklinikum Tübingen

bis 30.6.2001

Abteilung für Radiologische Diagnostik

Nebentätigkeit

seit Juli 2001

Interventionelle Kernspintomographie, UKT Tübingen

Hochschulstudium

seit Okt. 2001

Studiengang Biochemie an der Eberhard Karls Universität
Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie

Diplomvorprüfung

09.03.2005

Gesamtnote 2,5

Praktika

- 20.02.2006
bis 07.04.2006 Interfakultäres Institut für Biochemie, “Cathepsin B-like
Proteases in *Trypanosoma brucei*” (Prof. Dr. Michael Duszenko)
- Juni 2006 Friedrich-Löffler-Institut Tübingen, “Molekulare Genese
der Zythopathogenität des bovinen viralen Diarrhoe Virus”
(PD Dr. Gregor Meyers)
- Aug. 2006 Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut,
pepART - Peptidbasierende Proteinanalyse mittels Array-
Technologie (Dr. Thomas Joos)
- Okt. 2006 Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut, Geron-
tologische Mutationen im beta-Catenin Stoffwechsel (Dr.
Oliver Poetz)
- Dez. 2006 Institut für Organische Chemie, Synthese substituierter
Kohlenhydrate (Prof. Dr. Thomas Ziegler)

Vorträge

- 05.05.2006 Studentenseminar, “Cathepsin B - a Highly Potent Drug
Target in *T. brucei*”
- 21.06.2006 Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Infection with In-
tranasal siRNA Nanoparticles Targeting the Viral NS1 Gene
(Prof. Dr. Eberhard Pfaff)
- 07.07.2006 Studentenseminar, “The mRNA of the Arabidopsis Gene
FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowe-
ring” (Prof. Dr. Georg Felix)

Diplomprüfungen

- 29.06.2007 Schwerpunktfach Organische Chemie (Prof. Dr. Thomas
Ziegler), Note 1.3
- 10.10.2007 Schwerpunktfach Virologie (Prof. Dr. Thomas Iftner),
Note 1.0
- 08.04.2008 Biochemie (Prof. Dr. Michael Duszenko, Prof. Dr. Doron
Rapaport), Note 1.7