

AUS DEM INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, GENETIK UND MIKROBIOLOGIE
PROF. DR. GERNOT LÄNGST

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Plasmodium falciparum: Rekonstitution von Nukleosomen und die
Analyse der Dynamik und Struktur

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne Symelka

2014

AUS DEM INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, GENETIK UND MIKROBIOLOGIE
PROF. DR. GERNOT LÄNGST

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Plasmodium falciparum: Rekonstitution von Nukleosomen und die
Analyse der Dynamik und Struktur

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne Symelka

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gernot Längst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anja Bosserhoff
Tag der mündlichen Prüfung:	17.03.2014

Zielsetzung und Zusammenfassung

Die strukturelle Organisation des eukaryotischen Genoms erfolgt über die Assoziation der Erbinformation mit Proteinen, wobei die DNA gemeinsam mit Histonproteinen die Grundeinheit des Chromatins, das Nukleosom, bildet. Dabei umwinden 147 bp der DNA ein Histonoktamer, das je zwei Exemplare der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 umfasst. Für die Ausübung hochspezifischer Funktionen einzelner Zellen innerhalb eines vielzelligen Organismus ist das Vorhandensein eines regulatorischen Systems erforderlich, welches das Ablesen der DNA steuert. Die Regulation der Genexpression, aber auch weitere Vorgänge in der Zelle, wie die DNA-Replikation, -Reparatur oder -Rekombination machen die Umstrukturierung des Chromatins zu einer notwendigen Voraussetzung. Dieser dynamische Prozess erfolgt über Chromatin-Remodeling-Enzyme, die, durch die Hydrolyse von ATP, die Position der Nukleosomen auf der DNA verändern.

Die Chromatinstruktur des einzelligen Parasiten *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica beim Menschen, gleicht grundsätzlich der DNA-Organisation anderer eukaryotischer Organismen und zeichnet sich durch das Vorhandensein der vier kanonischen Histone H2A, H2B, H3 und H4, mit Ausbildung von Nukleosomen als Grundeinheit des Chromatins, aus. Interessanterweise besteht die Erbinformation seiner 14 Chromosomen zu 80,6 % aus den Basen Adenin und Thymin, was, verglichen mit dem menschlichen AT-Gehalt der DNA von etwa 54 %, einem relativ großer Anteil gleichkommt. Und auch im Hinblick auf die DNA-Sequenz der generell stark konservierten Histonproteine lassen sich, vor allem bezüglich der Histone H2A und H2B mit einer Übereinstimmung von nur 67 % bzw. 59 %, große Unterschiede ausmachen. Der außerordentlich komplexe Lebenszyklus dieses einzelligen Parasiten unterstreicht gleichzeitig die Wichtigkeit einer dynamischen Genregulation, verbunden mit der Umstrukturierung des Chromatins.

In Anbetracht dessen erscheint es interessant, die Struktur und Dynamik der *Plasmodium falciparum* Nukleosomen näher zu untersuchen. So wurde dieser Arbeit die Expression der *Plasmodium falciparum* Histone H2A, H2B, H3 und H4, die Rekonstitution von *Plasmodium* Histonoktameren sowie die Rekonstitution von Nukleosomen auf verschiedenen DNA-Fragmenten zum Ziel gesetzt. Damit sollte es möglich sein, sie, im Vergleich zu humanen Nukleosomen, auf ihre Dynamik, Positionierung und Stabilität hin zu untersuchen.

Zunächst gelang es, die *Plasmodium falciparum* Histone H2A, H2B und H3 in *Escherichia coli* Bakterien zu exprimieren und anschließend über Ionenaustauschchromatographie aufzureinigen. Des Weiteren konnten, unter Zuhilfenahme des humanen Histons H4, Histonoktamere mittels Dialyse rekonstituiert und über Gelfiltration aufgereinigt werden. *Plasmodium falciparum* und humane Nukleosomen wurden mittels Salzgradientdialyse rekonstituiert und deren Stabilität im Temperaturgradienten getestet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass *Plasmodium falciparum* Nukleosomen eine geringere Stabilität bei hohen Temperaturen aufweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *Plasmodium falciparum* Histone im Vergleich zu humanen Histonen un-

terschiedliche Positionen auf der DNA einnehmen. Daraus lässt sich schließen, dass Plasmodium falciparum Histone andere DNA-Sequenzen bzw. DNA-Strukturen erkennen, die eine stabile Bindung der Histone ermöglichen. Schließlich lässt sich durch die Untersuchung der Dynamik der Nukleosomen festhalten, dass die rekonstituierten Plasmodium falciparum Nukleosomen durch Drosophila bzw. humane Chromatin-Remodeling-Enzyme in ihrer Position verändert werden können und dass dies, im Vergleich zu humanen Nukleosomen, bei Zugabe vergleichbarer Enzymmengen erfolgt.

Zusammenfassend lassen sich demnach eine ähnliche Dynamik humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen feststellen, jedoch wesentliche Unterschiede bezüglich der Nukleosomen-Stabilität und -Positionierung. Dies ist möglicherweise auf die Besonderheiten des AT-reichen Genoms bzw. den komplexen Lebenszyklus von Plasmodium falciparum zurückzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte außerdem die Möglichkeit untersucht werden, die Salzgradientdialyse zur Rekonstitution von Nukleosomen mit einzelnen Histonen, an Stelle von Histonoktameren, durchzuführen. Dies konnte durch einen qualitativen Vergleich der Gelbanden aufgetragener 601-Nukleosomen beider Methoden sowie einer funktionellen Überprüfung, bestätigt werden. Insgesamt ermöglicht die Methode mit einzelnen Histonen die Herstellung großer Mengen an 601-Nukleosomen in kurzer Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung und Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	2
1.1 Chromatinstruktur	2
1.1.1 Histonproteine	3
1.1.2 Das Nukleosom	4
1.2 Regulation der Genexpression	6
1.2.1 Chromatinmodifikation	7
1.2.2 Chromatindynamik	8
1.3 Plasmodium falciparum	10
1.3.1 Systematik	11
1.3.2 Morphologie	11
1.3.3 Lebenszyklus	12
1.3.4 Genom	14
1.3.5 Chromatinstruktur	15
1.3.6 Regulation der Genexpression	17
2 Material	20
2.1 Geräte	20
2.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Chemikalien	22
2.4 Kits 23	
2.5 Enzyme	23
2.6 DNA-Längenstandard	23
2.7 Protein-Größenstandard	24

2.8	Standardlösungen und Puffer.....	24
2.8.1	Gelelektrophorese	24
2.8.2	Arbeit mit Bakterien	25
2.8.3	Histon Expression und Aufreinigung	25
2.8.4	Rekonstitution von Histon-Oktameren.....	26
2.8.5	Rekonstitution von Chromatin	26
2.8.6	Chromatin-Remodeling.....	27
2.9	Primer	27
2.10	Plasmide.....	28
2.11	DNA-Fragmente für die Chromatin-Rekonstruktion	29
2.12	Software	30
3	Methoden.....	31
3.1	DNA-spezifische Methoden.....	31
3.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	31
3.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien.....	31
3.1.3	Vervielfältigung von Plasmid-DNA in Bakterien und Isolierung.....	31
3.1.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	31
3.1.5	Agarose Gelelektrophorese	32
3.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	32
3.1.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.1.9	DNA-Fällung	34
3.1.10	DNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.2	Proteinspezifische Methoden	35
3.2.1	Standardmethoden	35
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.2.3	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue.....	36
3.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
3.3	Expression und Aufreinigung rekombinanter Plasmodium falciparum Histone	37
3.3.1	Histon-Testexpression	37
3.3.2	Glycerin-Dauerkulturen.....	37
3.3.3	Präparative Proteinexpression	38

3.3.4	Präparation von inclusion bodies.....	38
3.3.5	Entfaltung der Proteine in den inclusion bodies	38
3.3.6	Reinigung der Histone über Anionenaustausch-Chromatographie.....	39
3.4	Rekonstitution und Gelchromatographie von Plasmodium falciparum Histonoktameren	40
3.5	Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse	41
3.5.1	Verwendung von Histonoktameren	43
3.5.2	Vereinfachung der Methode: Verwendung einzelner Histone	43
3.6	Temperaturverhalten humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen.....	43
3.6.1	Temperaturdynamik.....	43
3.6.2	Thermale Stabilität von Nukleosomen.....	44
3.7	Analyse der Dynamik von Nukleosomen	44
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Plasmodium falciparum Histone	47
4.1.1	Testexpression der Plasmodium-Histone.....	47
4.1.2	Expression der Plasmodium Histone im großen Maßstab	49
4.1.3	Präparation von inclusion bodies und Entfaltung der Proteine in den inclusion bodies	50
4.1.4	Reinigung der Histone über Anionenaustausch-Chromatographie.....	51
4.2	Rekonstitution und Gelchromatographie von Plasmodium falciparum Histonoktameren	55
4.3	Herstellung von DNA-Substraten für die Chromatin-Rekonstitution	57
4.3.1	601_NotI DNA-Fragment.....	57
4.3.2	Hsp70 promoter DNA-Fragment.....	58
4.3.3	O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment.....	58
4.3.4	MMTV 3' LTR DNA-Fragment	59
4.4	In vitro Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse	59
4.4.1	Verwendung von Histonoktameren	59
4.5	Temperaturverhalten humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen.....	65
4.5.1	Temperaturdynamik von MMTV Nukleosomen	65
4.5.2	Hitzestabilität von 601_NotI Nukleosomen.....	66
4.6	Remodeling Maschinen abhängige Dynamik von Plasmodium falciparum Nukleosomen.....	67

4.7	Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen auf DNA-Fragmenten mit mehreren Nukleosomenpositionen	69
4.7.1	Hsp70 promoter Fragment.....	70
4.7.2	O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment.....	71
4.8	Rekonstruktion von Nukleosomen aus einzelnen Histonen	72
5	Diskussion	76
5.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Plasmodium falciparum Histone	76
5.2	Rekonstitution und Gelchromatographie von Plasmodium falciparum Histonoktameren	77
5.3	Herstellung von DNA-Substraten für die Chromatin-Rekonstitution	79
5.4	In vitro Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse	79
5.5	Temperaturverhalten humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen.....	80
5.6	Remodeling Maschinen abhängige Dynamik von Plasmodium falciparum Nukleosomen.....	82
5.7	Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen auf DNA-Fragmenten mit mehreren Nukleosomenpositionen	84
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Anhang.....	97
7.1	Nukleotid-Sequenz von pf H2A im Vektor pTriEx-1.1	97
7.2	Nukleotid-Sequenz von pf H2B im Vektor pTriEx-1.1	97
7.3	Nukleotid-Sequenz von pf H3 im Vektor pTriEx-1.1.....	98
7.4	Nukleotid-Sequenz von pf H4 im Vektor pTriEx-1.1.....	98
8	Danksagung.....	99
9	Eidesstattliche Erklärung	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Aufführung der verwendeten Primer.....	27
Tabelle 2:	Aufführung der verwendeten Plasmide	28
Tabelle 3:	Aufführung der verwendeten DNA-Fragmente	29
Tabelle 4:	Aufführung der verwendeten Software	30
Tabelle 5:	Zusammensetzung nativer 5 % und 6 % Polyacrylamid-Gele	33
Tabelle 6:	Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für die Vervielfältigung des 601_NotI DNA-Fragments mittels PCR.	34
Tabelle 7:	PCR-Programm für die Vervielfältigung des 601_NotI-Fragments	34
Tabelle 8:	Zusammensetzung 17%iger SDS-Polyacrylamidgele	36
Tabelle 9:	Standard-Reaktionsansatz für die Chromatin-Rekonstitution mittels Salzgradientdialyse.....	42
Tabelle 10:	OD600nm-Werte der Testexpression der Plasmodium Histonproteine zum Zeitpunkt der Ernte	47
Tabelle 11:	Ausbeute der aufgereinigten Plasmodium falciparum Histone H2A, H2B und H3	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Organisationsformen des Chromatins.....	2
Abbildung 2:	(H3-H4) ₂ -Tetramer und H2A-H2B-Dimer.....	4
Abbildung 3:	Nukleosomkernpartikel.....	5
Abbildung 4:	Einteilung von Chromatin-Remodeling-Komplexen.....	9
Abbildung 5:	Zwei Modelle für den Mechanismus der Nukleosomen-Verschiebung.....	10
Abbildung 6:	Einteilung der Gattung Plasmodium in eine übergeordnete Systematik.....	11
Abbildung 7:	Lebenszyklus von Plasmodium falciparum.....	13
Abbildung 8:	Interaktion eines Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten mit einer Endothelzelle.....	14
Abbildung 9:	Sequenzanalyse humaner und Plasmodium falciparum-Histone.....	16
Abbildung 10:	DNA-Längenstandard.....	23
Abbildung 11:	Protein-Größenstandard 1.....	24
Abbildung 12:	Protein-Größenstandard 2.....	24
Abbildung 13:	Reaktionsaufbau der Salzgradientdialyse zur Chromatin-Rekonstitution.....	41
Abbildung 14:	Analyse der Dynamik von Nukleosomen.....	45
Abbildung 15:	Testexpression der Plasmodium falciparum Histone pf H2A, pf H2B, pf H3 und pf H4 in E.coli BL21.....	48
Abbildung 16:	Testexpression des Plasmodium falciparum Histon pf H3 und pf H4 in E.coli BL21 pLacl.....	49
Abbildung 17:	Analyse von pf H2A und pf H2B nach der Entfaltung der inclusion bodies.....	51
Abbildung 18:	HPLC-Testläufe mit linearem Salzgradienten von pf H2B und pf H3.....	52
Abbildung 19:	HPLC-Aufreinigung mittels Stufengradienten von pf H2A und pf H3.....	54
Abbildung 20:	Laufprofil der Gelfiltration nach Rekonstitution von Plasmodium falciparum Histonoktameren.....	56
Abbildung 21:	Test-PCR zur Vervielfältigung des 601_NotI DNA-Fragments.....	58
Abbildung 22:	Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium 601_NotI-Nukleosomen.....	59
Abbildung 23:	Test-Assembly für die Rekonstitution humaner cy3-601_NotI-Nukleosomen und Plasmodium cy5-601_NotI-Nukleosomen.....	60
Abbildung 24:	Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium Hsp70 Nukleosomen.....	61
Abbildung 25:	Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium O2-40/-60 Nukleosomen.....	63

Abbildung 26: Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium MMTV Nukleosomen	64
Abbildung 27: Temperaturinduzierte Mobilität von humanen und Plasmodium MMTV Nukleosomen.....	65
Abbildung 28: Hitzestabilität von 601_NotI Nukleosomen.....	66
Abbildung 29: Remodeling-Reaktionen mit humanen cy3- bzw. Plasmodium cy-5 601_NotI Nukleosomen und Snf2H, CHD1, CHD3 und CHD4	68
Abbildung 30: Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium Nukleosomen auf dem Hsp70 promoter Fragment	70
Abbildung 31: Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium Nukleosomen auf dem O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment.....	71
Abbildung 32: Plasmodium Histonoktamere und einzelne Plasmodium Histone aufgetragen auf ein 17 % SDS-Gel	73
Abbildung 33: Test-Assembly für die Rekonstitution von 601_NotI Nukleosomen, durchgeführt mit Histonoktameren sowie einzelnen Histonen	74
Abbildung 34: Rekonstitution von Hsp70 Nukleosomen mit einzelnen Histonen.....	75
Abbildung 35: Aminosäure-Sequenzvergleich pf H4 und hs H4	78
Abbildung 36: Positionierung von Nukleosomen durch Chromatin-Remodeling-Enzyme	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl. bovine serum albumin)
C	Cytosin
CHD	Chromatin-Remodeling-Komplex (engl. chromodomain, helicase, DNA-binding)
C-terminal	carboxy-terminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Ribonucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
engl.	Englisch
EtBr	Ethidiumbromid
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H1, H2A, H2B, H3, H4	Histon-Proteine
hs	homo sapiens
hs H1, hs H2A, hs H2B, hs H3, hs H4	humane Histon-Proteine
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Lueria-Bertani
m	Milli
M	Molar
mA	Milli-Ampere
min.	Minuten
ml	Milliliter
MQ	Milli Q
MW	Molekulargewicht
MWCO	Trennschärfe bei Membranverfahren (engl. molecular weight cut off)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pf	plasmodium falciparum
pf H2A, pf H2B, pf H3, pf H4	Plasmodium falciparum-Histonproteine
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SNF	Chromatin-Remodeling-Komplex (engl. sucrose non-fermenting)
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
ü.N.	über Nacht
V	Volt

Chemische Elemente und Verbindungen sowie physikalische Größen und Einheiten wurden entsprechend den internationalen Richtlinien verwendet.

1 Einleitung

1.1 Chromatinstruktur

In einem einzigen, etwa 5-10 μm großen, menschlichen Zellkern sind 46 Chromosomen enthalten, deren DNA insgesamt eine Länge von knapp zwei Metern bildet. Die DNA, als Trägerin der Erbinformation, geht dabei mit Proteinen komplexe Strukturen ein, die man als Chromatin bezeichnet. Dieser Begriff leitet sich von dem griechischen Wort „chroma“ (Farbe) ab und wurde 1880 von Walther Flemming geprägt, dem es gelungen war, mit stark basophilen Farbstoffen ein Zellfasergestüt anzufärben, das er als Chromatin bezeichnete (Paweletz, 2001).

Ausgehend von Nukleosomen als Grundeinheiten des Chromatins, muss, im Hinblick auf den Übergang zu einem mitotischen Chromosom, eine Verdichtung der Chromatinstruktur um mehrere Hundertfache stattfinden (Khorasanizadeh 2004). Über den Aufbau dieser übergeordneten Chromatinstrukturen ist allerdings nur wenig bekannt. Eine Übersicht über die verschiedenen Ordnungsstrukturen des Chromatins, von der DNA-Helix bis zur Ausbildung eines Metaphase-Chromosoms, zeigt nachfolgende Abbildung 1.

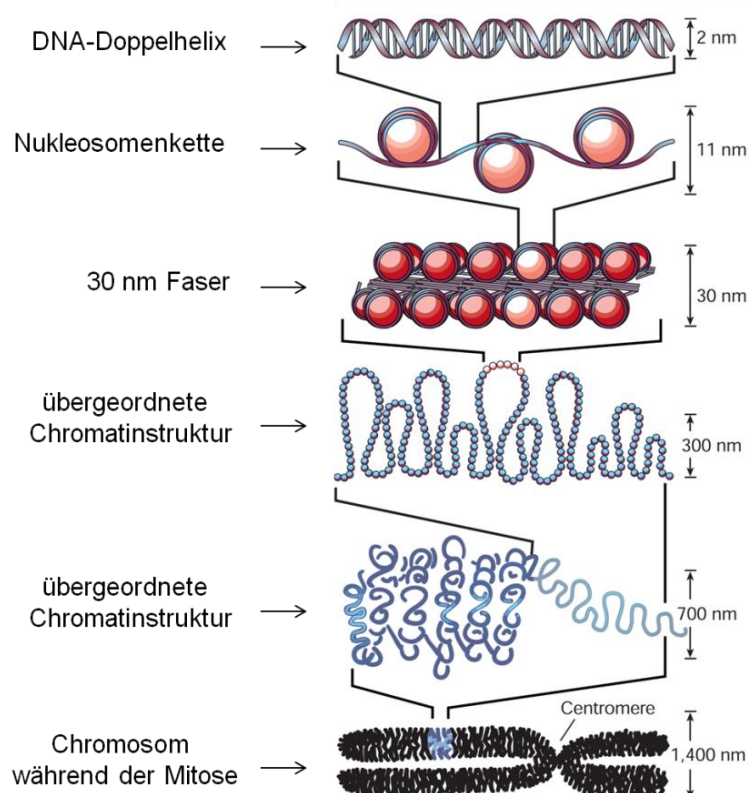


Abbildung 1: Organisationsformen des Chromatins (modifiziert nach Felsenfeld und Groudine, 2003).

1.1.1 Histonproteine

In eukaryotischen Zellen ist eine beträchtliche Menge an Proteinen mit der chromosomalen DNA assoziiert und die Organisation der DNA erscheint, im Gegensatz zu Bakterien und Viren, im Hinblick auf die Wichtigkeit der Regulation in einem vielzelligen Organismus mit spezifischen biologischen Zellfunktionen und der Ausbildung von Chromosomen während der Mitose, gleichwohl komplizierter (Klug et al., 2007).

Bei den mit der DNA assoziierten Proteinen unterscheidet man eine Gruppe basischer, positiv geladener, Histonproteine, von weniger positiv geladenen Nicht-Histon-Proteinen, zu denen unter anderem Enzyme wie die DNA- oder RNA-Polymerasen sowie Transkriptionsfaktoren und eine Vielzahl weiterer, schwach bindender Proteine zählen. In der Gruppe der Histonproteine lassen sich fünf Typen unterscheiden: die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4. Ihnen ist gemeinsam, dass sie zum einen eine zentrale, annähernd globuläre Domäne, zum anderen flexible aminoternale und carboxyterminale Histonbereiche aufweisen (Smith, 1991). Histone binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide, da sie eine große Menge an positiv geladenen Aminosäuren enthalten, darunter vor allem Lysin und Arginin.

Histone sind hochkonservierte Proteine (Wells und McBride, 1989), was für eine evolutionäre Bedeutung dieser Proteine in der Organisation des genetischen Materials spricht. So unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des Histon H4 einer tierischen Zelle in nur zwei Aminosäuren vom Histon H4 der Erbse. Insgesamt sind die Histone H3 und H4 am stärksten konserviert, während das Histon H1 die geringste Ähnlichkeit im Hinblick auf Unterschiede im Vorkommen in tierischen und pflanzlichen Zellkernen aufweist (Felsenfeld, 1978) und vielmehr wegen seiner DNA-Assoziation, als seiner eigentlichen Proteinstruktur, zu den Histonproteinen gezählt wird (Ramakrishnan, 1995).

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Histonproteine in Lösung, unter moderaten Salzkonzentrationen und in Abwesenheit von DNA, zu (H3-H4)₂-Tetrameren und H2A-H2B-Dimeren zusammenlagern (siehe Abbildung 2). Ein (H3-H4)₂-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimere bilden bei Vorhandensein von DNA oder in gepufferten Lösungen mit einer Salzkonzentration vor mehr als 1 M NaCl ein Histonoktamer aus (Khorasanizadeh, 2004).

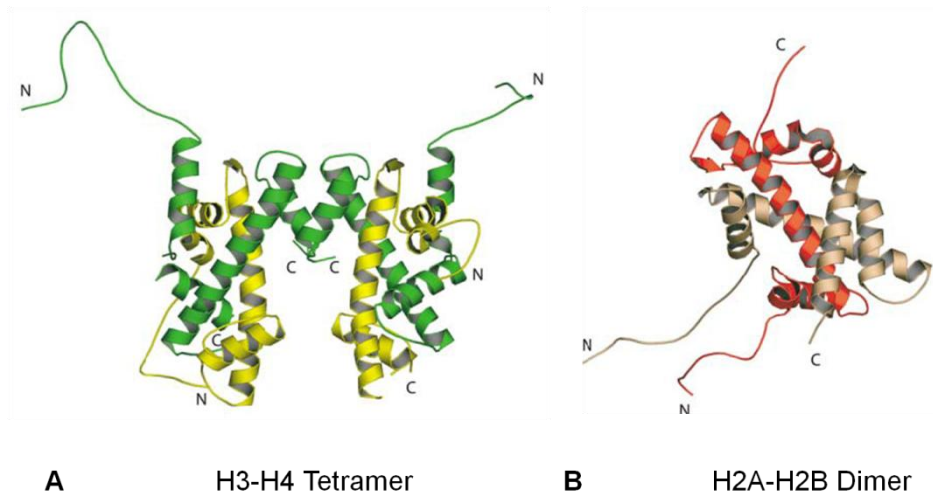


Abbildung 2: (H3-H4)₂-Tetramer und H2A-H2B-Dimer (Khorasanizadeh, 2004). Darstellung der Histone: H2A: rot, H2B: rosa, H3: grün, H4: gelb; N: N-Terminus, C: C-Terminus.

Abbildung 2 zeigt, dass die aminoterminalen und carboxyterminalen Histonbereiche keine Sekundärstruktur aufweisen. Zudem wird deutlich, dass die C-terminalen Bereiche der Histone H3 den Kontakt zwischen den beiden Histonen und damit auch zwischen den H3-H4-Dimeren herstellen und so wesentliche Bedeutung für die Ausbildung des (H3-H4)₂-Tetramers haben.

1.1.2 Das Nukleosom

In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts bildete sich eine Vorstellung der Grundstruktur des Chromatins heraus. Das Modell einer kleinsten Verpackungseinheit, dem Nukleosom, stützte sich zu dieser Zeit vor allem auf zwei Feststellungen: der im Elektronenmikroskop sichtbaren Kette von kleinen Partikeln und den in biochemischen und Röntgenstrukturuntersuchungen beobachteten Wiederholungseinheiten innerhalb der Chromatinstruktur (Kornberg, 1977).

So zeigte der Abbau von Chromatin durch eine Endonuklease ein regelmäßiges Muster an DNA-Fragmenten, die einer ungefähren Länge von 200 Basenpaaren oder einem Vielfachen davon entsprachen (Hewish und Burgoyne, 1973). Die Schlussfolgerung daraus war, dass es Substrukturen innerhalb des Chromatins geben musste, in denen in regelmäßigen Abständen Stellen innerhalb des DNA-Stranges für die Endonuklease zugänglich waren, während andere durch Protein-Superstrukturen geschützt waren. Diese Vorstellung wurde sowohl durch die Elektronenmikroskopie gestützt, in der sich bei der Betrachtung von Chromatinfasern kugelförmige Partikel (v-bodies) nachweisen ließen (Olins und Olins, 1974; Oudet et al., 1975; Woodcock et al., 1976), als auch durch Röntgenstrukturanalysen, die ebenfalls Wiederholungseinheiten innerhalb des Chromatins zeigten (Richards und Pardon, 1970).

Roger Kornberg entwickelte schließlich die Vorstellung des Nukleosoms, einer Chromatin-Untereinheit, die aus je zwei der Haupthistone H2A, H2B, H3 und H4 besteht und etwa 200 Basenpaare an DNA umfasst (Kornberg, 1974). Er stellte Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen an und entdeckte die

Ausbildung von $(H3-H4)_2$ -Tetrameren sowie H2A-H2B-Oliomeren und H1-Monomeren (Kornberg und Thomas, 1974).

Aus heutiger Sicht stellt sich das Nukleosom als die grundlegende Verpackungseinheit der eukaryotischen Chromosomenstruktur dar. Der Kern des Nukleosoms besteht dabei aus einem Histonoktamer, das je zwei Exemplare der Histone H2A, H2B, H3 und H4 umfasst. Dieses Histonoktamer wird in 1,7 linksgerichteten superhelikalen Windungen von einer 147-Basenpaar langen DNA umwunden (Richmond und Davey, 2003), während das Histon H1 die Ein- und Austrittsstelle der DNA zusammenhält und dem Partikel aufliegt (Zhou et al., 1998; Thoma et al., 1979). Dabei spielt das Histonprotein H1 eine Rolle in der weiteren Faltung der Nukleosomenkette zu höheren Chromatinstrukturen (siehe Punkt 1.1.3) sowie in der Transkription (Felsenfeld, 1978; Bustin et al., 2005). Zwei Nukleosomen werden jeweils durch ein Linker-DNA-Segment verbunden, das etwa 10-80 bp lang ist.

Mit ansteigender Dauer des Verdauens von Chromatin durch eine Nuklease gehen die Linker-DNA sowie das Histon H1 verloren. Bestehen bleibt ein sogenanntes Nukleosomkernpartikel („nucleosome core particle“), das aus 147 Basenpaaren und dem Histonoktamer besteht. Röntgenstrukturanalysen des Nukleosomkernpartikels beschreiben die genaue Struktur dieses Komplexes (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Nukleosomkernpartikel (Luger et al., 1997). Darstellung von zwei Ebenen des zylinderförmigen Nukleosomkernpartikels; links: auf Achse der DNA-Superhelix, rechts: senkrecht dazu; Windungen der DNA (braun und türkis) um die acht Hauptketten der Histonproteine (gelb: H2A, rot: H2B, blau: H3 und grün: H4).

In Abbildung 3 wird deutlich, dass der „globuläre“ Anteil der Histone aus einer Folge von α -Helices mit verbindenden Schleifen besteht. Bei Betrachtung der einzelnen Histone fällt zudem auf, dass jeweils eine lange α -Helix vorhanden ist, die von kürzeren α -Helices umgeben ist. Diese Struktur ist als Histone-fold („Faltung“) bekannt und für die Verbindung zu Nachbarhistonen verantwortlich (Arents et al., 1991). Wie in Abbildung 2 zeigt sich die Verbindung der carboxyterminalen Enden der Histone H3 untereinander.

der. Das Histon H3 nimmt zudem Kontakt zu Histon H2A auf und die H2A-H2B-Dimere positionieren sich innerhalb des Nukleosomkernpartikel so, dass zwei H2A-Histone miteinander interagieren (Khorasanizadeh, 2004).

Eine Vielzahl von Histon-DNA-Interaktionen stabilisiert das Nukleosom, so sind die „globulären“ Anteile der einzelnen Histone, in einem Abstand von etwa 10 Basenpaaren, mit der DNA verbunden. Für die bereits erwähnten übergeordneten Chromatinstrukturen sind die flexiblen N- und C-Termini der Histone bedeutsam, da diese über das Nukleosomen hinausreichen und Wechselwirkungen mit benachbarten Nukleosomen eingehen können. So kann sich der aminoterminal Arm des Histon H4 an ein H2A-H2B-Dimer in einem benachbarten Nukleosom anlagern (Luger und Richmond, 1998; Liu et al., 2011).

Die exakte Positionierung von Nukleosomen ist wesentlich für den Ablauf von biologischen Prozessen in der Zelle (an Jansen und Verstrepen 2011). Im Hinblick auf einflussnehmende Faktoren an der Anordnung der Nukleosomen wird zunächst der DNA Sequenz an sich eine zentrale Bedeutung zugeschrieben (Widom 2001; Lee et al. 2007). Beispielsweise kommt einer Basenpaarsequenz mit fünf aufeinanderfolgenden Adeninen sowie periodisch angeordnete Dinukleotide mit Adenin oder Thymin, einer durchschnittlich geringeren Besetzung an Nukleosomen gleich (Widom, 2001; Field et al., 2008). Diese Positionierungssignale der DNA-Sequenz scheinen zudem allgemein gültig für eukaryotischen Organismen zu sein (Field et al., 2008). Die Nukleosomen-Verteilung in vivo, also innerhalb des lebenden Organismus, steht allerdings unter dem Einfluss einer Vielzahl an beeinflussenden Parametern, und kann nicht durch die DNA-Sequenz allein erklärt werden. So wirken auch RNA-Polymerasen, Chromatin-Remodeling-Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Histonvarianten und posttranslationale Histonmodifikationen sowie benachbarte Nukleosomen und die übergeordnete Chromatinstruktur auf die Positionierung von Nukleosomen ein (an Jansen und Verstrepen 2011). Generell lässt sich eine Präferenz von Nukleosomen für Protein-kodierende Genombereiche festhalten (Schwartz et al., 2009; Andersson et al., 2009; Lee et al. 2004), wobei in Bereichen starker Transkription ein Verlust von Nukleosomen zu verzeichnen ist (Lee et al. 2004; Bernstein et al. 2004; Schones et al. 2008). Dies kann durch die Aktivität von Chromatin-Remodeling-Enzymen erklärt werden, die über eine Veränderung der Nukleosomenposition, die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren ermöglichen (Kim et al. 2006; siehe Punkt 1.2).

1.2 Regulation der Genexpression

Die Ausübung hochspezifischer Funktionen einzelner Zellen innerhalb eines vielzelligen Organismus erfordert das Vorhandensein eines geordneten regulatorischen Systems, das das Ablesen der DNA steuert. Diese Regulation der Genexpression findet an zahlreichen Stellen auf dem Weg von der DNA als Informationsträgerin, bis zum fertigen Protein statt, beispielsweise in Form der Transkriptionskontrolle, der Modifikation von RNA-Transkripten oder der posttranslationalen Veränderung von Proteinen. Da eine Vielzahl an Proteinen während der Genexpression, aber auch bei der DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination, direkt mit der DNA interagiert, muss die Struktur des Chromatins also auch eine gewisse Dynamik gestatten. So ermöglicht

eine Relaxierung des Chromatins den Zugang regulatorischer Proteine zur DNA, während in Zeiten der Inaktivität, dieser Prozess wieder umgekehrt werden kann (Németh und Längst, 2004).

Die Struktur des Chromatins ist damit wesentlich für die Regulation genetischer Aktivität. Bereits frühe Untersuchungen unterschieden chromosomale Regionen, die sich während des Zellzyklus unter dem Lichtmikroskop stärker anfärbten und als Heterochromatin bezeichnet wurden, von einem Euchromatin, das sich zwar während der Zellteilung verdichtete, sich in den Zwischenphasen allerdings diffus im Zellkern darstellte (Weiler und Wakimoto, 1995). Im Allgemeinen wird das Euchromatin, mit seiner weniger dichten Struktur, mit aktiven Genen in Verbindung gebracht, während das Heterochromatin als inaktiv im Bezug auf die Genexpression gilt. Obwohl es Ausnahmen von dieser Regel gibt, lässt die morphologische Betrachtung der Chromatinstruktur doch wichtige Rückschlüsse auf Funktion und Aktivität zu (Ball, 2003).

Im Folgenden werden die Modifikation des Chromatins sowie die Chromatindynamik näher beschrieben.

1.2.1 Chromatinmodifikation

Die in Punkt 1.1.1 beschriebenen Histonproteine sind nicht starr in ihrer Funktion. Die verschiedenen Histogene kodieren für unterschiedliche Subtypen von Histonen sowie für Histonvarianten, denen spezifische Funktionen zukommen (Talbert und Henikoff, 2010). Ferner können die Seitenketten der Aminosäuren in den flexiblen N-Termini der Histone unter anderem durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung posttranslational modifiziert werden und nehmen so Einfluss auf Prozesse der Replikation, Transkription, DNA-Reparatur und Chromosomenkondensation im Zellkern (Kouzarides, 2007). Am besten untersucht ist dabei die Histonacetylierung: über die Histon-Acetyltransferase (HAT) wird eine Acetylgruppe an die positiv geladene Aminogruppe angefügt, die auf einer Seitenkette der Aminosäure Lysin vorkommt. Dadurch verändert sich die Nettoladung des Proteins, was sich wiederum auf die Bindungseigenschaften auswirkt. So können beispielsweise Kontakte zu benachbarten Nukleosomen gelöst werden, die zuvor für die Stabilität der 30 nm-Faser erforderlich waren (Kouzarides, 2007). Die Acetylierung der Histone steht damit in Zusammenhang mit der Aktivierung von Genen (Allfrey und Mirsky, 1964). Bei der Methylierung dagegen, werden über eine Methyltransferase Methylgruppen an die Aminosäuren Lysin und Arginin angefügt, bei der Phosphorylierung Phosphatgruppen an die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin (Bannister und Kouzarides, 2011). Die Entdeckung der vielfältigen Möglichkeiten Histone zu modifizieren, führte zu der Idee der Existenz eines „Histon-Codes“, wobei ein spezifisches Muster an Modifikationen spezifische Funktionen auslöst, die im Dienste der Genregulation stehen (Jenuwein und Allis, 2001). Die Modifikation der Histone ist ein dynamischer und sich schnell ändernder Prozess, dessen Wirkung auf die Transkription sich zum einen in einer direkten Beeinflussung der Chromatinstruktur zeigt, um beispielsweise die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen, zum anderen in der Rekrutierung DNA-bindender Effektor-Moleküle beschrieben werden kann (Berger, 2007). Im nächsten Abschnitt wird auf diesen zweiten Punkt näher eingegangen.

1.2.2 Chromatindynamik

Die Genexpression kann durch eine Veränderung der Chromatinstruktur beeinflusst werden. Während des Chromatin-Remodelings werden Histon-DNA-Interaktionen verändert (Lusser und Kadonaga 2003), mit dem Ergebnis einer veränderten Position des Histonoktamers auf der DNA, bzw. einer Destabilisierung oder Entfernung des Nukleosoms. Die Veränderungen des Chromatins sind das Resultat einer ATP-abhängigen Vermittlung durch sogenannte Chromatin-Remodeling-Komplexe oder „Remodeler“.

Diesen Multiprotein-Komplexen sind eine Affinität zu Nukleosomen gemeinsam sowie die Tatsache, dass einige ihrer Domänen kovalente Histonmodifikationen erkennen können. Sie weisen außerdem Proteine auf, die mit anderen Chromatin- oder Transkriptionsfaktoren interagieren können (Clapier und Cairns, 2009). Das wohl entscheidende Merkmal aller Chromatin-Remodeling-Komplexe ist jedoch ein Motorprotein der Snf2-ATPase-Familie, die selbst eine Untergruppe der Helikase-Superfamilie 2 (SF2) ist (Eisen et al., 1995). Schon 1995 waren acht Untergruppen der Snf2-ATPase-Familie beschrieben worden (Eisen et al., 1995), ein durchgeführter Sequenzabgleich der ATPase-Region von 1300 identifizierten Snf2-ATPase-Mitgliedern (Flaus et al., 2006) ergab die Einteilung derselben in 24 Untergruppen (siehe Abbildung 4A). Die ATPase ist für die Remodeling-Reaktion essentiell und wird in ihrer Ausprägung von den weiteren Untereinheiten des Komplexes moduliert. Dabei kann eine ATPase bzw. der Subtyp einer ATPase Bestandteil verschiedener Chromatin-Remodeling-Komplexe sein, wobei zudem ein Austausch der Motorproteine innerhalb der Subgruppen stattfindet (Rippe et al. 2007).

Chromatin-Remodeling-Komplexe sind in der Ausführung spezieller zellbiologischer Prozesse involviert. Beispielsweise spielen sie eine große Rolle im Rahmen der Transkription, durch das Ermöglichen der Zugänglichkeit bestimmter Gene und im Bereich der DNA-Reparaturen sowie der Rekombination. Einige Komplexe erlauben den Austausch eines H2A-H2B-Dimers gegen ein alternatives Dimer (Bruno et al., 2003), das bestimmte Histonvarianten enthalten kann. Für spezifische Aufgaben sind verschiedene Remodeling-Komplexe mit unterschiedlichen molekularen Mechanismen erforderlich. Einen Teil dieser Spezifität leisten die flankierenden Domänen der ATPasen. So kann über Bromodomänen acetyliertes Lysin gebunden werden, während Chromodomänen an methylierte Lysine binden (Bannister und Kouzarides, 2011).

Unter anderem diesen Domänen, aber auch der ATPase-Sequenz, liegt die Einteilung einer mehr auf empirischer Zuordnung basierenden (Flaus und Owen-Hughes, 2011) Klassifikation der Chromatin-Remodeling-Komplexe zu Grunde (Tsukiyama, 2002; Clapier und Cairns, 2009). Darin werden vier Familien von Chromatin-Remodeling-Komplexen näher beschrieben: die SWI/SNF Familie, die ISWI Familie, die CHD Familie und die INO80 Familie (siehe Abbildung 4B).

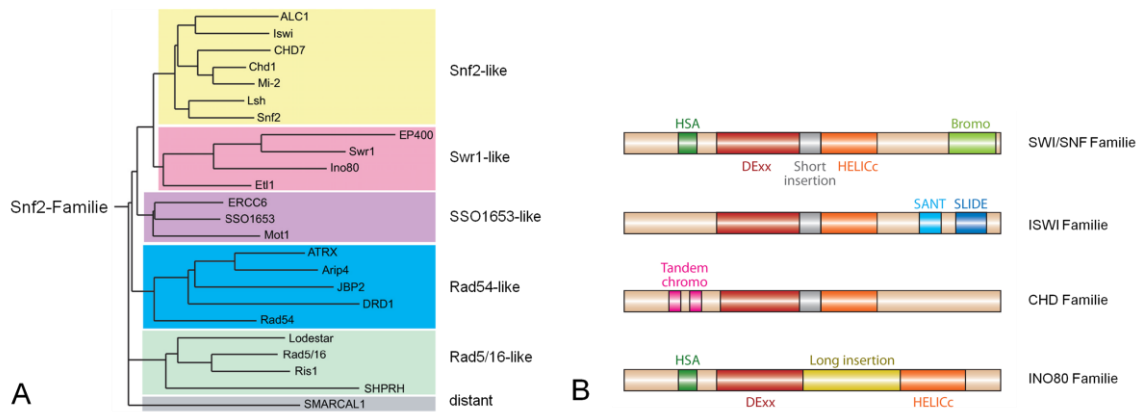


Abbildung 4: Einteilung von Chromatin-Remodeling-Komplexen. **A:** Einteilung der Snf2-Familie in 24 Untergruppen (modifiziert nach Flaus et al., 2006). **B:** Einteilung von Chromatin-Remodeling-Komplexen in vier Familien: SWI/SNF, ISWI, CHD und INO80 (modifiziert nach Clapier und Cairns, 2009).

Abbildung 4B zeigt, dass allen vier beschriebenen Chromatin-Remodeling-Familien eine ATPase-Untereinheit gemein ist, die aus zwei Teilen besteht: DExx (in rot dargestellt) und HELICc (in orange dargestellt), zwei recA-ähnliche Domänen (Subramanya et al., 1996). Im Folgenden werden nun die vier Familien der Chromatin-Remodeling-Komplexe aus Abbildung 4B näher beschrieben.

Der zuerst entdeckte Remodeling-Komplex, der SWI/SNF-Komplex (SWI: „**switch**“, SNF: „**sucrose non-fermenting**“), dessen Name auf seine Entdeckung in Hefezellen hinweist, besteht aus 8 bis 14 Untereinheiten (Clapier und Cairns, 2009). Er besitzt eine HSA („**helicase-SANT**“)-Domäne (in dunkelgrün dargestellt) sowie eine C-terminale Bromodomäne (in hellgrün dargestellt). In Eukaryoten kommen zwei verschiedene SWI/SNF-Komplexe vor. Die Komplexe der ISWI Familie (ISWI: „**imitation switch**“) sind deutlich kleiner, sie zeigen 2 bis 4 Untereinheiten und weisen eine carboxyterminale SANT-(in hellblau dargestellt) und eine SLIDE Domäne (in dunkelblau dargestellt) auf, während die CHD Familie (CHD: „**chromodomain, helicase, DNA-binding**“) der Remodeling-Komplexe 1 bis 10 Untereinheiten sowie zwei aminoterminalen Tandem-Chromodomänen (in pink dargestellt) aufweist. Die INO80 Familie (INO: „**inositol requiring 80**“) schließlich bezieht eine aminoterminalen HSA-Domäne mit ein. Ihr Charakteristikum ist eine lange Insertion zwischen den beiden Teilen der ATPase-Sequenz (in gelb dargestellt), während die Remodeling-Komplexe der SWI/SNF-, ISWI- und CHD Familie eine kurze Insertion aufweisen (in grau dargestellt).

Grundsätzlich betrachtet ist der Prozess des ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling ein enzymatischer Prozess, bei dem die Chromatin-Remodeling-Enzyme die Bewegung eines Histonoktamers, relativ zum assoziierten DNA-Abschnitt, induzieren können. Aber auch erhöhte Salzkonzentrationen (Weischet, 1979) bzw. moderate Salzkonzentrationen bei erhöhten Temperaturen (Beard, 1978) ermöglichen ein Verschieben der Nukleosomen. Ursprünglich wurde der Mechanismus des Gleitens der Nukleosomen auf der DNA („**nucleosome sliding**“) durch ein Modell erklärt, das auf der Verdrehung der DNA-Helix beruht („**twist diffusion model**“, Widom 2001; siehe Abbildung 5A). Danach sollen thermische Bewegungen ausreichen, um die DNA am Rand des

Nukleosoms zu verdrehen, was zu einer Ablösung eines Basenpaares führt. Dieser Twist-Effekt kann sich über das ganze Nukleosom ausbreiten und so zu einer schrittweisen Verschiebung des Nukleosoms auf der DNA führen, deren Schritt-Länge jeweils ein Basenpaar beträgt. Die Nukleosomen-Verschiebung würde so zu einer veränderten Drehlage der DNA führen.

Ein weiteres Modell, das „loop-recapture“-Modell (Schiessel et al., 2001; siehe Abbildung 5B) besagt, dass thermische Energie zu einer Ablösung eines 30-35 bp-langen DNA-Abschnittes am Eingang bzw. Ausgang der DNA in das Nukleosom führt. Dieser DNA-Abschnitt kann nun entweder erneut mit derselben Position auf dem Histonoktamer interagieren, oder aber eine Schleife („loop“) auf der Oberfläche des Nukleosoms ausbilden. In einer gerichteten Ausbreitung dieser DNA-Schleife um das Histonoktamer nimmt die Schleifen-Sequenz eine neue Position auf dem Histon-Oktamer ein („recapture“) und führt so insgesamt zu einer relativen Verschiebung des Nukleosoms auf der DNA, genau um die Schritt-Länge der DNA-Schleife. Die Chromatin-Remodeling-Komplexe würden im Rahmen beider Modelle die beschriebenen Prozesse katalysieren. Neuere Untersuchungen präferieren das zweite Modell (Längst und Becker, 2004; Strohner et al., 2005), mit dem sich nahezu alle beobachteten Phänomene der Chromatindynamik erklären lassen (Längst und Becker, 2004).

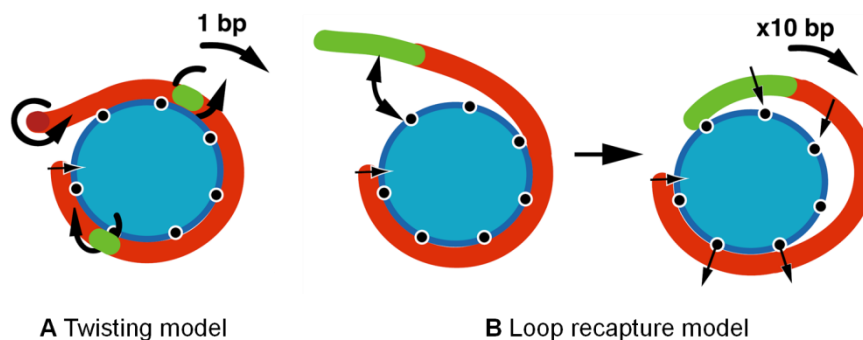


Abbildung 5: Zwei Modelle für den Mechanismus der Nukleosomen-Verschiebung (Längst und Becker, 2004). Darstellung des Nukleosoms in blau, der DNA-Strang ist rot dargestellt. **A:** Twisting Modell. **B:** Loop-recapture-Modell.

Abbildung 5 zeigt schematisch die zwei beschriebenen Modelle der Nukleosomen-Verschiebung: das Twisting-Modell und das Loop-recapture-Modell. Im Twisting-Modell zeigt die grüne Markierung das Basenpaar, das sich über eine Verdrehung auf dem Nukleosom entlang schraubt. Im Loop-recapture-Modell bildet sich über mehrere Basenpaare hinweg, wiederum grün markiert, eine Schleife, die sich entlang des DNA-Stranges fortsetzt.

1.3 Plasmodium falciparum

Plasmodien, einzellige Parasiten und Erreger der Malaria, wurden 1880 von Charles Louis Alphonse Laveran in Nordafrika in humanen Blutzellen entdeckt (Levine, 1988).

1.3.1 Systematik

Plasmodien lassen sich einer der sechs großen Gruppen der Eukaryoten, den Chromalveolata zuteilen und zählen somit, im Gegensatz zu Archäen und Bakterien, zu Lebewesen, die einen Zellkern besitzen (Adl et al., 2005). Die Gruppe der Alveolata, eine Untergruppe der Chromalveolata, entstand wahrscheinlich durch eine Symbiose zwischen phagotrophischen Algen und Photosynthese betreibenden Rotalgen (Adl et al., 2005). Sie umfasst drei große Unterstämme: Dinoflagellata, Ciliophora und Apicomplexa. Plasmodien zählen zum Stamm der Apicomplexa („Sporentierchen“), einer Gruppe, die ausschließlich parasitische Formen mit zum Teil hochkomplexen Lebenszyklen aufweist (Lucius und Loos-Frank, 2008). Der Name „Apicomplexa“ bezieht sich dabei auf einen apikalen Organellenkomplex, der aus Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula besteht (Bannister et al., 2000; siehe Punkt 1.3.2).

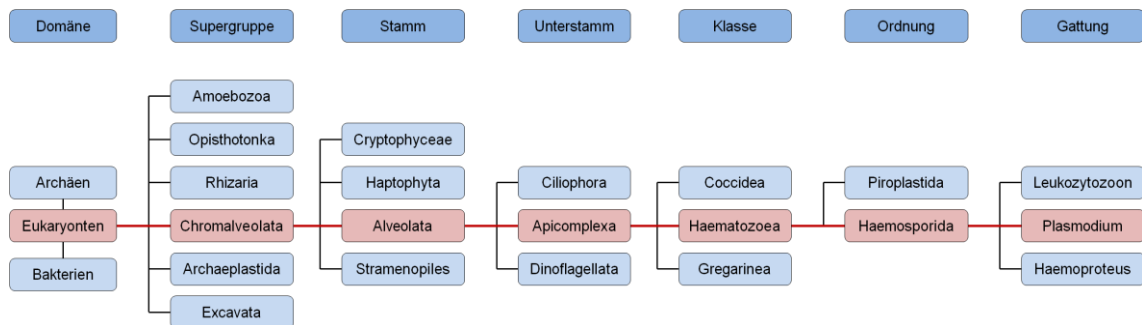


Abbildung 6: Einteilung der Gattung Plasmodium in eine übergeordnete Systematik (erarbeitet nach Adl 2005; Lucius und Loos-Frank: Biologie von Parasiten, 2. Auflage).

Abbildung 6 zeigt die oben beschriebene Einordnung der Plasmodium-Familie in eine übergeordnete Systematik bis hin zur Domäne der Eukaryoten. Des Weiteren weist die Plasmodium-Gattung vier Untergattungen mit mehr als 170 Arten auf. Darunter befinden sich vier humanpathogene Arten: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium falciparum*, die eine ähnliche Biologie aufweisen, aber unterschiedliche Typen der Malaria-Erkrankung verursachen (Lucius und Loos-Frank, 2008).

1.3.2 Morphologie

Die Ausstattung der Apicomplexa mit Zellorganellen variiert mit den verschiedenen Stadien des Lebenszyklus der Parasiten (siehe Punkt 1.3.3). Am Beispiel der im Invasionsstadium vorkommenden *Plasmodium falciparum*-Merozoiten zeigt sich ein für Eukaryoten typischer Zellaufbau mit einem basal liegenden Zellkern, einem für verschiedene Zellstoffwechselforgänge benötigten Golgi-Apparat und rauem endoplasmatischem Retikulum als verzweigtes Kanalsystem innerhalb des Zytoplasmas (Bannister et al., 2000). Der bereits beschriebene apikale Komplex mit seinen Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula besteht aus Membranvesikeln, deren Inhalt die Membran der infizierten Zelle während der Invasion bzw. die Membran einer parasitophoren Vakuole modifiziert, in der sich die Parasiten vermehren (Bannister et al., 2000). Unter einem Band von Mikrotubuli, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, liegt ein einziges Mitochondrium und ein rudimentäres Plastid, ein auch als Apicoplast bezeichnet.

netes Zellorganell, das Pflanzen und Algen für die Photosynthese benötigen und das auf die Herkunft der Apicomplexa aus Rotalgen hinweist. Obwohl der Apicoplast essentiell für das Überleben der Parasiten zu sein scheint (Fichera und Roos, 1997), beispielsweise wurde seine Funktion in der anabolen Fettsäure-Synthese bestätigt (Waller et al., 1998), ist seine genaue Rolle unklar. Durch den Verlust ihrer Geißeln bedingt, bewegen sich Plasmodien gleitend fort.

1.3.3 Lebenszyklus

Das Wort Parasit leitet sich aus dem griechischen ab (griech. *pará* – bei, neben und griech. *sítos* – Essen) und wird definiert als ein Lebewesen, das in oder auf einem artfremden Organismus lebt, von ihm Nahrung bezieht und ihn schädigt. Plasmodien gehören dabei zu den obligaten Parasiten und weisen einen komplexen Lebenszyklus auf, der zwei Wirte einschließt sowie einen Wechsel zwischen geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung (Lucius und Loos-Frank, 2008).

Die den Apicomplexa zugeordnete Parasiten durchlaufen während ihrer Entwicklung drei Phasen, bestehend aus der Schizogonie als ungeschlechtlicher Vermehrungsphase, der Gamogonie, bei der sich Geschlechtszellen (Gameten) ausbilden und der Sporogonie, bei der durch ungeschlechtliche Vermehrung Sporozoiten ausgebildet werden (Hiepe, 2006). Die Parasiten durchlaufen dabei mehrere Formwechsel, wobei die sich ungeschlechtlich teilenden Stadien obligat intrazellulär anzutreffen sind (Hiepe, 2006).

Moskitos wurden 1897 durch Ronald Ross als Vektor der Vogel-Malaria identifiziert und einige Jahre später wurden sie auch als Vektoren der humanen Malaria bestätigt (Cox, 2010). Die Infektion des Menschen mit Plasmodium Sporozoiten erfolgt durch den Stich einer weiblichen Anopheles-Mücke. Etwa 15-45 Minuten nach der Infektion erreichen die übertragenen Sporozoiten über den Blutweg die Leber-Sinusoide, durchwandern die als Kupffer'sche Sternzellen bezeichneten Lebermakrophagen und dringen schließlich in Leberparenchymzellen ein. Bevor sie sich jedoch unter Bildung einer parasitophoren Vakuole niederlassen, durchwandern sie mehrere Hepatozyten (Mota et al., 2001). In der gebildeten Vakuole durchlaufen die Sporozoiten die sogenannte „exoerythrozytäre Schizogonie“, die zunächst zur Entwicklung von Schizonten führt, die nach starker Kernvermehrung zerfallen und mehrere Zehntausend Merozoiten freisetzen (Prudêncio et al., 2006). Nach Ausschwemmung von Merozoiten in die Blutbahn erfolgt der Befall von Erythrozyten, wo wiederholte Schizogonien in Gang gesetzt werden („erythrozytäre Schizogonie“). Nach dem mikroskopischen Bild unterscheidet man in den Erythrozyten ein frühes Siegelring-Stadium sowie die späteren runden oder bandförmigen Trophozoiten, aus denen sich Schizonten und anschließend Merozoiten entwickeln. Die neu gebildeten Merozoiten, können nun ihrerseits Erythrozyten befallen. Während bei Plasmodium ovale, Plasmodium vivax und Plasmodium malariae eine Synchronisation der erythrozytären Schizogonien stattfindet, die mit der Ausschwemmung von Merozoiten in die Blutbahn zu den für Malaria typischen Fieberschüben führt, findet bei Plasmodium falciparum nach einer synchronen Anfangsphase keine Synchronisation mehr statt (Hiepe, 2006). Anschließend differenziert sich ein Teil der Merozoiten zu Geschlechtsformen, entweder zu männlichen Mikrogametozyten oder weiblichen Makrogametozyten (Alano, 2007). Diese persistieren im Falle von Plasmodium falciparum bis zu 22 Tage im Blut (Bousema und Drakeley, 2011) und können in dieser Zeit durch einen erneuten Stich von einer Anopheles-Mücke als Endwirt aufge-

nommen werden, wo die geschlechtliche Entwicklung vonstattengeht. Die physiologischen Verhältnisse im Mückenmagen induzieren dabei die Ausbildung von Gameten, wobei diese Differenzierung im Falle der männlichen Mikrogametozyten als Exflagellation bezeichnet wird. Nach der Befruchtung von Makrogameten durch Mikrogameten wandert die bewegliche Zygote zunächst in die Epithelzellen des Mückenmagens, wo schließlich Sporozoiten gebildet werden. Diese wandern wiederum in die Speicheldrüsen der Mücken und sind damit für den Menschen infektiös (James und Rossignol, 1991; Lucius und Loos-Frank, 2008). Nachfolgende Abbildung 7 gibt einen Überblick über den Lebenszyklus des Parasiten.

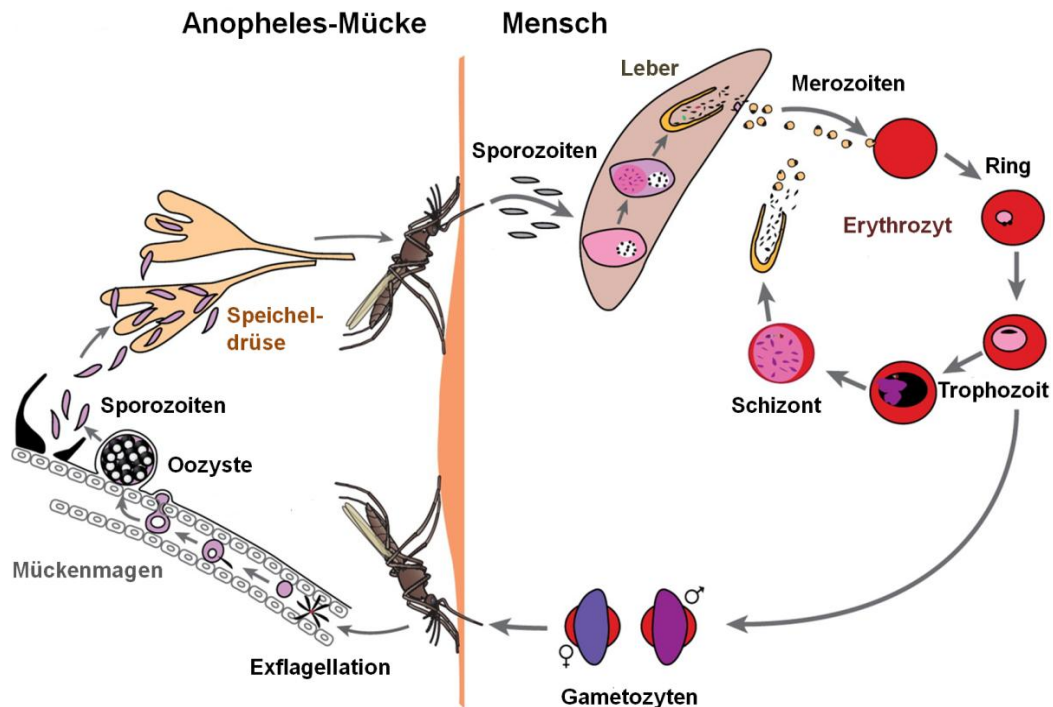


Abbildung 7: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (modifiziert nach Scherf et al., 2008).

In späten Stadien der Infektion von roten Blutzellen erscheinen auf der Erythrocytenoberfläche kleine Höcker („knobs“) (Horrocks et al., 2005), die ein von *Plasmodium falciparum* exprimiertes Oberflächenprotein enthalten (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1). Dieses Oberflächenantigen hat eine Größe von etwa 200-350 kDa und ermöglicht die Adhäsion an Endothelzellen von Kapillaren, so dass ältere Trophozyten und Schizonten nicht mehr im Blut zirkulieren und damit der Milzpassage entgehen, wo veränderte Erythrozyten aussortiert und zerstört werden können (Pasternak und Dzikowski, 2009; Leech et al., 1984). Diese Oberflächenproteine werden von etwa 60 var Genen kodiert und können ausgetauscht werden, um einer Immunantwort durch den Wirt zu entgehen, wobei immer nur ein var Gen exprimiert wird (Scherf et al., 2008; siehe Punkt 1.3.4)

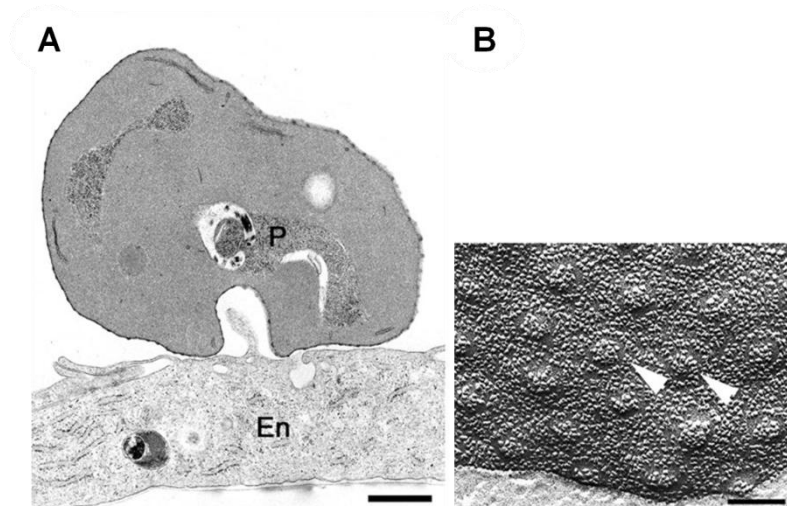


Abbildung 8: Interaktion eines Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten mit einer Endothelzelle (Horrocks et al., 2005). **A:** Aufnahme durch ein Transmissionselektronenmikroskop, ein Pf-infizierter Erythrozyt (P) haftet an einer Endothelzelle (En). **B:** Aufnahme durch ein Rasterelektronenmikroskop, die Pfeile kennzeichnen die Höcker auf der Oberfläche eines Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten.

1.3.4 Genom

Mit dem Ziel neue Forschungszugänge zu ermöglichen, wurde im Jahr 1995 über das Malaria-Genom-Projekt mit der Sequenzierung des Plasmodium falciparum-Genoms begonnen, wobei zunächst das mitochondriale Genom und anschließend die Plastid-DNA sequenziert wurden (Feagin, 1992; Wilson et al., 1996). In den folgenden Jahren wurden nach und nach auch die Sequenzen der nukleären Chromosomen bekannt, bis schließlich im Oktober 2002 das gesamte Genom des Plasmodium falciparum-Klons 3D7 zur Verfügung stand (Gardner et al., 1998; Bowman et al., 1999; Hall et al., 2002; Hyman et al., 2002; Gardner et al., 2002). Das Plasmodium falciparum-Genom setzt sich aus 14 Chromosomen mit Längen zwischen 0,6 und 3,3 Megabasen zusammen, die insgesamt eine DNA-Länge von 22,8 Megabasen ergeben (Gardner et al., 2002). Dabei beziehen sich die Längensvarianten zumeist auf die Subtelomer-Regionen, Chromosomenabschnitte, die unmittelbar an die repetitiven Sequenzen der Telomere am Chromosomenende angrenzen und die im Falle von Plasmodium falciparum unter anderem mit Genen assoziiert sind, die im Zusammenhang mit der Antigenvariation stehen (Gardner et al., 2002). Obwohl in Malariaparasiten experimentell keine Zentromere identifiziert worden waren, zeigte die Sequenzanalyse mutmaßliche Zentromere, die mit ihren AT-reichen Regionen von über 93 % eine Ähnlichkeit zu den regionalen Zentromeren der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe aufweisen (Bowman et al., 1999; Gardner et al., 2002).

Die Zusammensetzung der Plasmodium falciparum DNA besteht zu 80,6 % aus Adenin und Thymin, wobei der AT-Gehalt in Introns und Zwischengenregionen auf etwa 90 % steigt (Gardner et al., 2002). Da Plasmodium vivax, ein weiterer humanpathogener Parasit der Gattung Plasmodium, mit 67,7 % einen wesentlich geringeren AT-Anteil aufweist, scheint dieser hohe Gehalt wenig mit der Malaria-Krankheit an sich zu tun zu haben, möglicherweise aber durchaus mit einer vermehrten Rekombination der AT-

reichen Gene und der Umgehung der Immunantwort des Wirtes in Verbindung zu stehen (Winzeler, 2008).

Durch die Sequenzierung wurden etwa 5300 Protein-kodierende Gene identifiziert, etwa gleich viele Gene, wie in *Schizosaccharomyces pombe*. Auch der Gehalt an Introns im *Plasmodium falciparum* Genom ist mit 54 % diesem Modellorganismus ähnlich, im Vergleich zur Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* allerdings sehr hoch, wo nur 5 % der Gene Introns enthalten (Gardner et al., 2002). Auffällig ist ebenfalls die, verglichen mit *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae*, relativ große Anzahl an langen Gensequenzen, bei nicht einbezogenen Introns, die oft für nicht-charakterisierte Proteine, möglicherweise des Zytosols, kodieren (Gardner et al., 2002). Etwa 60 % der 5268 hypothetischen Proteine zeigen keine ausreichende Ähnlichkeit mit Proteinen anderer Organismen um eine funktionelle Zuordnung zu rechtfertigen und scheinen somit einzigartig für diesen Organismus zu sein, was einer relativ großen Anzahl an organismus-eigenen Proteinen im Vergleich zu anderen sequenzierten eukaryotischen Organismen gleichkommt. Dieser Unterschied wurde möglicherweise aber, wie auch der mit 14 % relativ niedrige Anteil an Enzymen unter den Proteinen, durch die entwicklungsgeschichtliche Entfernung oder einer verringerten Sequenzähnlichkeit durch den hohen AT-Gehalt hervorgerufen (Gardner et al., 2002). Mindestens 1,3 % der Gene sind an Zell-Zell-Adhäsionen oder dem Befall von Wirtszellen und 3,9 % sind an der Umgehung des Immunsystems des Wirtes beteiligt (Gardner et al., 2002). Im Hinblick auf das 35 Kilobasen große ringförmige Genom des Apicoplasten fällt auf, dass nahezu alle Gene für Komponenten der Genexpression kodieren, wie zum Beispiel tRNAs, rRNAs, Untereinheiten der RNA-Polymerase und ribosomalen Proteine (Wilson et al., 1996), wobei auch nukleär kodierte Proteine post-translational in dem Zellorganell vorgefunden werden (Zuegge et al., 2001).

Plasmodium falciparum weist drei variable Genfamilien auf, die sich, wie zuvor bereits erwähnt, in den subtelomerischen Chromosomenabschnitten befinden und als „var“, „rif“ und „stevor“ bezeichnet werden. Sie kodieren für Proteine, die unter anderem bekannt sind als das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. Im *Plasmodium falciparum* Genom wurden 59 var, 149 rif und 28 stevor Gene gezählt.

Aber auch annähernd ein Jahrzehnt nach der erfolgreich abgeschlossenen Sequenzierung des *Plasmodium falciparum* Genoms bleiben viele Fragen der funktionellen Genomanalyse offen, zum einen bedingt durch die Komplexität des Lebenszyklus des Parasiten, zum anderen durch den hohen AT-Gehalt, der genetische Manipulationen und biochemische Analysen erschwert (Miao et al., 2006). So sind nach wie vor mehr als die Hälfte der vorausgesagten Gene noch immer „hypothetisch“ und die meisten Promotorstrukturen und vermeintlichen Regulationseinheiten bleiben unbestimmt (Ponts et al., 2010). Im Folgenden werden die Fortschritte im Bereich der Chromatinstruktur und Genregulation näher beschrieben.

1.3.5 Chromatinstruktur

Während der ebenfalls den Alveolata zugehörige Dinoflagellat *Gyrodinium cohnii* sich durch ein Fehlen von Histonen und damit einer fehlenden Organisation der chromosomalen DNA in Form von Nukleosomen auszeichnet (Bodansky et al., 1979), gleicht die Chromatinstruktur von Plasmodien der anderer eukaryotischer Organismen (Cary et

al., 1994). Sie zeichnet sich durch das Vorhandensein der vier kanonischen Histone H2A, H2B, H3 und H4 und der Ausbildung der typischen Grundstruktur der DNA-Organisation in Form von Nukleosomen aus (Westenberger et al., 2009). Allerdings ist das Linker-Histon H1 in diesem parasitären Organismus nicht vorhanden, mit der Folge, dass die typische dichte Verpackung der DNA in Metaphasen-Chromosomen (siehe Abbildung 1) während der Mitose nicht vorgefunden wird (Ponts et al., 2010). Es gibt gleichwohl indirekte Hinweise darauf, dass auch Plasmodium-Chromosomen in Euchromatin- und Heterochromatin-Strukturen gegliedert werden können (Chookajorn et al., 2008). Und im Gegensatz zu anderen höheren Eukaryoten, die mehrere Histon-Gen-Abschriften pro haploidem Genom aufweisen (Marzluff et al., 2002), besitzt das haploide Genom von Plasmodium falciparum nur eine Kopie aller vier kanonischen Histone (Miao et al., 2006). Dabei ist das Histon H4, mit nur acht Aminosäuren Unterschied im Vergleich zum humanen Histon H4, das am stärksten konservierte Histonprotein (Beauchamps et al., 1997; Miao et al., 2006). Da Histone generell hochkonservierte Proteine darstellen, ist diese hohe Identität nicht weiter verwunderlich, vielmehr sind die großen Unterschiede im Hinblick auf die Histonproteine H2A und H2B ein interessanter Aspekt an der Erforschung der Chromatinstruktur von Plasmodien. Nachfolgende Abbildung 9 zeigt die Sequenzanalyse der humanen und Plasmodium Histonproteine.

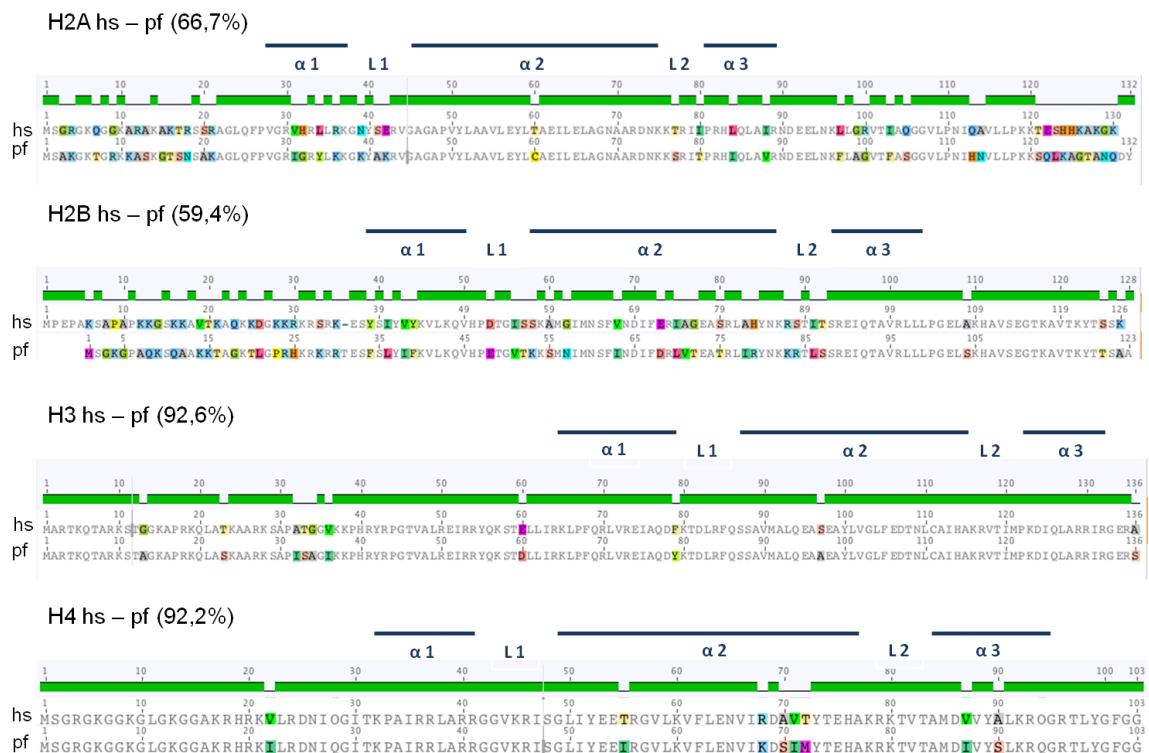


Abbildung 9: Sequenzanalyse humaner und Plasmodium falciparum-Histone. Angegeben sind die Aminosäuresequenzen der humanen sowie der Plasmodium falciparum-Histone H2A, H2B, H3 und H4, die Übereinstimmung in Prozent ist angegeben. Oberhalb der Sequenzvergleiche markieren blaue Balken die α -Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) und loops (L1, L2) der Sekundärstrukturen und umfassen somit die Aminosäure-Kernsequenz des Histon-fold (Luger et al. 1997a). Abweichungen zwischen humanen und Plasmodium Aminosäuren sind innerhalb der Sequenz bunt hervorgehoben.

Abbildung 9 zeigt die Aminosäuresequenz-Unterschiede zwischen humanen und Plasmodium Histonproteinen. Im Falle von H2A liegen die Sequenzunterschiede fast ausschließlich im C- und N-terminalen Bereich sowie im Bereich der N-terminalen kurzen α 1-Helix und L1, die lange α 2-Helix bleibt nahezu unverändert. Bei Histon H2B betreffen die Abweichungen den N-terminalen Bereich sowie die α 1- und α 2-Helix, der C-terminale Bereich zeigt hingegen kaum Veränderungen. Vergleicht man die Sequenzen zwischen hs H4 und pf H4 zeigt sich, dass der N-terminale Bereich, der grundsätzlich eine Bedeutung für die Genregulation besitzt, weitgehend konserviert ist. Auch pf H3 und die Histonvariante pf H3.3 zeigen keine größeren Abweichungen (Miao et al. 2006).

Das Vorhandensein der vier Histonvarianten H2A.Z, H3.3, CenH3 und H2Bv (Westenberger et al., 2009; Miao et al., 2006), wobei die Synthese der Histonvariante CenH3 bisher nicht bestätigt wurde sowie die Beobachtung zahlreicher Modifikationen der flexiblen N-Termini, lässt eine Wichtigkeit epigenetischer Regulationsmechanismen vermuten (Miao et al., 2006). Zudem wird eine große Zahl an Proteinen beschrieben, die für RNA-Stabilität und den Erhalt der Chromatinstruktur bedeutsam sind (Coulson et al., 2004; Ponts et al., 2010).

Etwa 26-50 % des Plasmodium-Genoms ist in die Nukleosomenstruktur eingebunden, wobei sich die Dichte der Nukleosomenbesetzung im Verlauf des asexuellen Lebenszyklus deutlich ändert und grundsätzlich eine eindeutige Präferenz für Proteinkodierende Regionen besteht (Ponts et al., 2010). Diese Zahl von maximal 50 % mit Nukleosomen assoziierter DNA ist, verglichen mit 81 % bei *Saccharomyces cerevisiae*, jedoch relativ gering (Lee et al., 2007). Dabei scheint es möglich, dass der hohe AT-Gehalt des Genoms die Interaktion der DNA mit den Histonoktameren erschwert (Ponts et al., 2010), da die DNA-Sequenz generell ein wesentlicher Faktor für die Organisation der Nukleosomen zu sein scheint (Kaplan et al., 2009).

Grundsätzlich lassen sich Änderungen der Chromatinstruktur während des Lebenszyklus mit einer Öffnung der Chromatinstruktur in der frühen Phase des Erythrozyten-Befalls durch *Plasmodium falciparum*, einer maximal offenen Struktur während des Trophozoiten-Stadiums und einer relativ „geschlossenen“ Chromatinstruktur der Schizonten kurz vor der nächsten Invasion beschreiben. Diese massiven genomweiten Veränderungen der Chromatinstruktur unterscheiden sich im Vorkommen von anderen Eukaryoten, bei denen sich die Umgestaltungen eher auf eine Verschiebung bzw. Neupositionierung einzelner Nukleosomen beschränken (Ponts et al., 2010).

1.3.6 Regulation der Genexpression

Im Hinblick auf das Präsentieren und Variieren von Proteinen auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten scheinen Plasmodien durch eine Regulation der var-Genexpression optimal an eine Umgehung der Wirtabwehr angepasst zu sein. Andererseits zeigten Untersuchungen, dass der Parasit nur eine geringe Kapazität aufweist, auf schädigende Umwelteinflüsse mit einer Regulation der Genexpression zu reagieren (Ganesan et al., 2008; Le Roch et al., 2008).

Im Vergleich des *Plasmodium falciparum*-Genoms mit dem Genom von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt sich, dass nur relativ wenige Gene mit Funktionen der Zellorganisation, der Zellteilung oder auch Transkriptionsfaktoren assoziiert sind (Gardner

et al., 2002). Dies impliziert nicht notwendigerweise, dass weniger Gene in diese Prozesse involviert sind, zeigt aber unter Umständen, dass das gegenwärtige Wissen über die Biologie der Malaria-Erreger begrenzt ist. Denn obwohl bisher nur wenige Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden und sich scheinbar eine fehlende Rückkopplung der Genexpression im Bezug auf Umweltstress zeigt, ergaben genomweite Analysen der Genexpression eine streng regulierte Abfolge von DNA-Abschriften während des Lebenszyklus des Parasiten, verbunden mit einer bedarfsorientierten Genexpression (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2008; Cui und Miao, 2010). Dieses Transkriptionsprogramm scheint sich auf die vorhersehbare biochemischen Umgebungsbedingungen des Wirtes hin entwickelt zu haben, was zu einer schematisch aufeinanderfolgenden Rhythmik der Expression von Regulatormolekülen geführt haben kann (Ganesan et al., 2008).

Gegebenenfalls könnte die Veränderung von DNA-Strukturen, wie sie vor allem während der Infektion von Erythrozyten beobachtet wird (siehe Punkt 1.3.5), durch eine Modellierung der Zugänglichkeit für DNA-bindende Proteine eine grundlegende Rolle bei der Genregulation spielen (Ponts et al., 2010). Wie in Punkt 1.3.5 beschrieben, zeigt die Chromatin-Architektur drastische Veränderungen während des Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*, im Gegensatz zu anderen Eukaryoten, bei denen die Chromatinorganisation zielgerichteter erfolgt. Die Nukleosomenbesetzung innerhalb von Promotorregionen folgt dabei, mit Ausnahmen beispielsweise der *var*-Gene, den genomweiten Mustern. Damit scheint die Transkription massiv durch die Chromatinstruktur beeinflusst zu sein. (Ponts et al., 2010). Ein Vergleich des genomweiten Grades an Chromatinöffnung in vermeintlichen Promotor-Regionen mit gemessenen mRNA Mengen während der intraerythrozytären Phase, unter anderem durch Le Roch et al. 2003, bestätigte, dass die meisten dieser mRNA-Levels sich nicht durch eine präzise Regulation erklären lassen (Ponts et al., 2010). Lediglich die spezifischen Gene des Ring-Stadiums scheinen dem klassischen Muster der Genregulation zu folgen und zeigen eine kürzere mRNA Halbwertszeit. Alles in allem scheinen auch posttranskriptionale Mechanismen während der asexuellen Vermehrung in Erythrozyten eine wesentliche Rolle bei der Genregulation zu spielen.

Auch der Vergleich von mRNA und Proteinmenge zeigt einen gewissen Widerspruch, wie am Beispiel der Histonproteine ersichtlich wird: Transkriptionsprofile deuteten darauf hin, dass Abschriften der Histongene während des Ring-Stadiums nur in geringem Maße vorhanden sind oder ganz fehlen und sich während des Trophozoiten-Stadiums, bzw. Schizonten-Stadiums anhäufen. Vor dem Hintergrund der Proteinanalyse stellte sich jedoch heraus, dass die mRNA-Transkripte der Histongene nicht unmittelbar weiter umgesetzt worden waren und die Proteinmenge an H2A, H2B, H3 und H4 im Ringstadium tatsächlich recht hoch war. Die Abnahme an Histonproteinen von Ring- zu frühem Trophozoiten-Stadium ist ungewöhnlich, als die DNA-Synthese während des frühen Trophozoitenstadiums beginnt. So erscheint es denkbar, dass die Histone des Ring-Stadiums als ein allgemeiner Repressor der Gesamt-Transkription in den Genomregionen dienen, die in Nukleosomen verpackt sind. Somit könnte eine Unterdrückung der Histonprotein-Fülle mit einer allgemein erhöhten Transkription in Verbindung stehen (Le Roch et al., 2004). Damit zeigen sich in *Plasmodium falciparum* Mechanismen der posttranslationalen Kontrolle mit Beteiligung entweder eines Zusammenspiels von

mRNA-Stabilität und -Abbau oder genspezifischer Kontrolle der Translation von mRNA oder eine Kombination von beidem (Le Roch et al., 2004).

Die Regulation der Genexpression in *Plasmodium falciparum* zeigt, wie zuvor erwähnt, jedoch auch klassischere Mechanismen, die vermuten lassen, dass die grundsätzlichen Mechanismen der Genregulation ähnlich wie bei anderen einzelligen eukaryotischen Organismen ablaufen (Coulson et al., 2004). So wurde eine vollständige Besetzung von Chromatin-modifizierenden Proteinen nachgewiesen sowie der Austausch von Histonen durch Histonvarianten, was die Bedeutung dieser epigenetischen Mechanismen der Transkriptionsregulation unterstreicht (Templeton et al., 2004; Cui und Miao, 2010). Die Identifizierung konservierter wie neuer posttranslationaler Modifikationen zeichnet dabei das Bild eines komplexen und möglicherweise abweichenden „Histon-Codes“ (Cui und Miao, 2010). Analysen durch Massenspektrometrie ergaben eine große Zahl an posttranslationalen Histon-Modifikationen, wobei wie in anderen einzelligen Eukaryoten, die Acetylierung und Methylierung die größte Rolle spielen (Cui und Miao, 2010). Die Analyse des *Plasmodium falciparum*-Genoms führte außerdem zur Identifizierung von 11 Snf2/Swi2 ATPasen mit Ähnlichkeit zu den vier Klassen von Chromatin-Remodeling-Enzymen SWI/SNF, ISWI, CHD und INO80 (Horrocks et al., 2009), wobei bisher nur wenige Mitglieder dieser Remodeling-Komplex-Familien in Apicomplexa näher charakterisiert wurden (Sullivan et al., 2003; Ji und Arnot, 1997). Das Gen für die Chromatin-Remodeling-Maschine SNF2L beispielsweise liegt auf Chromosom 11 und kodiert ein Protein mit 1422 Aminosäuren und einer molekularen Masse von etwa 167 kDa. Es zeigt eine Übereinstimmung von 60 % mit der ATPase Domäne in *Saccharomyces cerevisiae* und von 63 % mit dem humanen Homolog (Ji und Arnot, 1997). Da die Aktivierung von var-Genen mit lokalen Chromatinveränderungen und einer reduzierten Nukleosomenbesetzung an den Promotoren assoziiert ist, erscheint es denkbar, dass auch Chromatin-Remodeling-Enzymen an der Regulation des Antigen-Wechsels beteiligt sind (Cui und Miao, 2010; Ponts et al., 2010; Voss et al., 2007). Dabei wird jeweils nur ein var-Gen exprimiert, während die Expression der restlichen var Gene unterdrückt wird (Chen et al., 1998). So wurden in subtelomeren Regionen, ein abgestimmtes Muster an Acetylierung und Methylierung in den flankierenden Regionen der var-Gene vorgefunden, die mit einer Aktivierung bzw. Inaktivierung der var-Gene in Verbindung stehen (Lopez-Rubio et al., 2007). Es scheinen allerdings noch weitere Faktoren auf die Regulation der var-Genexpression Einfluss zu nehmen, wie beispielsweise die Lokalisation der Gene innerhalb des Nukleus (Ralph et al., 2005).

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
37 °C Inkubator BM 400	memmert
37 °C Schüttelinkubator Minitron	Infors HT
37 °C Schüttelinkubator Multitron	Infors HT
-80 °C Gefrierschrank	Sanyo
-20 °C Kühlschranks	Siemens
ÄKTApurifier™ (inklusive Zubehör)	GE Healthcare
Agarose-Gelkammern	Universität Regensburg
Autoklav	Zirbus
Concentrator plus	Eppendorf
Drehrad-Inkubator Model L28	Labinco
Eismaschine	Ziegra
Electrophoresis Power-Supply– EPS 301	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power-Supply– EPS 301	GE Healthcare
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Millipore Anlage	Purelab
NanoDrop® ND-1000	peqlab
PCR Maschine peq STAR	peqlab
PCR Maschine primus 96	peqlab
PH-Meter 646	Knick
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Pipettierhilfe „Pipetboy comfort“	Integra Biosciences
Pipettierhilfe Handy Step	Brand
Promega Vac-Man™	Promega
Proteingelkammer Novex Mini Gel	Invitrogen
Pumpdrive 5001	Heidolph
Rotilabo® Mini-Zentrifuge	Roth
SDS-Minigelapparatur XCell SureLock™	Invitrogen
Tischzentrifuge centrifuge 5415 R	Eppendorf

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge centrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge Sigma 1-14	SIGMA
Safe Imager™	Invitrogen
Sonifier 250	Branson
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf
Unigeldryer 3545D	UniEquip
Vakuumpumpe FB 70155	Fisher scientific
Vakuumpumpe	vacuubrand
Vortex „Reax top“	Heidolph
Zentrifuge Centrikon T-324	Kontron Instruments
Zentrifuge Sigma 3-16K	SIGMA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Amicon Ultra Centrifugal Filters (MWCO: 10,000)	Millipore
Dialyseschlauch 6-8 kDa	Roth
Dialysemembran MWCO: 6-8,000	Spectra Por
Einwegspritzen Omnifix® 1ml	Braun Biotech
Kunststoffküvetten 1 ml	Sarstedt
Latex Handschuhe Safeskin	Roth
Nitril-Handschuhe Safeskin	VWR
Parafilm „M“ Laboratory Film	Pechiney
PCR Cups	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen 92x16 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt
Reagenzröhrchen 13ml	Sarstedt
Reagenzröhrchen mit Schraubdeckel 15 ml	Sarstedt
Reagenzröhrchen mit Schraubdeckel 50 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipette steril 6 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt

Material	Hersteller
Silikonisierte Reaktionsgefäße 1,5 ml	Biozym Scientific GmbH
Whatman Papier	Macherey-Nagel

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	Merck, Roth, Sigma-Aldrich u.a.
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka
Ampicillin (Na-Salz)	Biozym
ATP (300mM)	Sigma-Aldrich
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Bacto™ Tryptone	BD Biosciences
Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences
Bovines Serum Albumin (BSA, 10mg/ml)	NEB
Bromphenolblau	Serva
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Merck
dNTPs (10mg/ml)	Invitrogen
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerin ca. 87 %	Merck
IGEPAL R CA-630 (NP40)	Fluka
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Merck
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Rotiphorese® Gel30 (37.5:1)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
SYBR® Safe	Invitrogen

2.4 Kits

Kit	Hersteller
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN

2.5 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen. Die Taq Polymerase für die PCR-Reaktionen wurde im Labor hergestellt.

2.6 DNA-Längenstandard

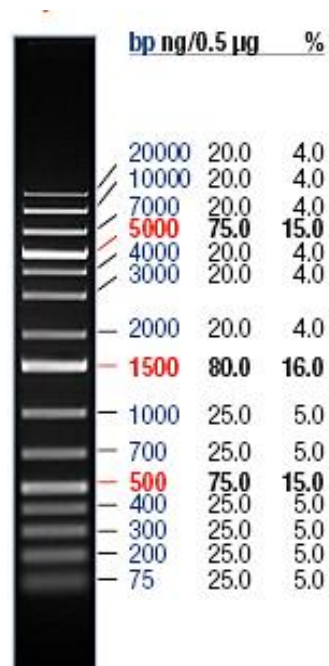


Abbildung 10: DNA-Längenstandard (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas).

2.7 Protein-Größenstandard

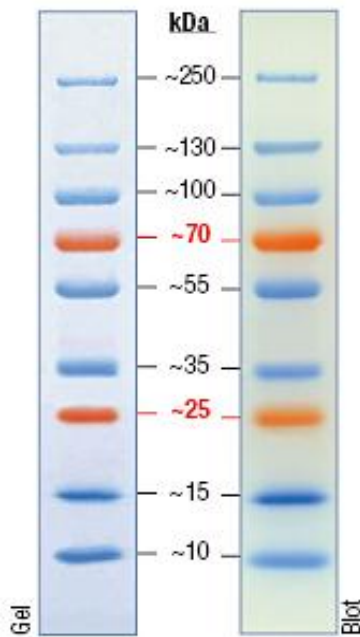


Abbildung 11: Protein-Größenstandard 1
(PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus;
Fermentas).

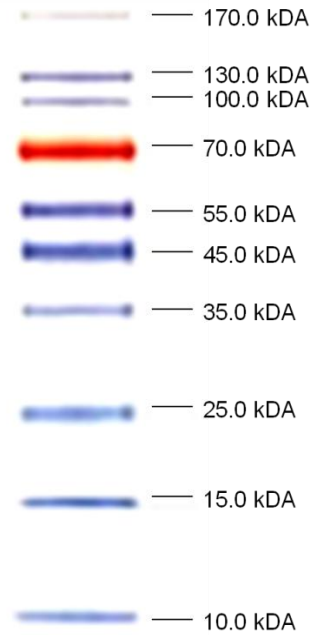


Abbildung 12: Protein-Größenstandard 2
(peqGOLD Protein Marker IV; peqlab).

2.8 Standardlösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden gemäß Standardprotokollen hergestellt, die Häufigsten werden im Folgenden aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Benzamidine, DTT sowie β -Mercaptoethanol wurden stets frisch den Puffern zugegeben.

2.8.1 Gelelektrophorese

1x TBE (Tris-Borat-EDTA)- Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA
DNA Probenpuffer (10x)	60 % Glycerol 10 mM EDTA Orange G (Spatelspitze)
Rotiphorese® Gel 30	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; Lagerung bei 4 °C
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-	20 % APS in Wasser gelöst; steril filtriert; Lagerung

Lösung	bei 4 °C
Lower Tris	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Upper Tris (4x)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (10x)	2 M Glycerin 250 mM Tris 1 % (w/v) SDS
SDS-Protein-Probenpuffer (6x)	350 mM Tris/HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	45 % Methanol 45 % H ₂ O 10 % Essigsäure 1 g/l Coomassie Brilliant Blue G250

2.8.2 Arbeit mit Bakterien

Ampicillin-Stammlösung (1000x)	100 μ g/ml Ampicillin in Wasser gelöst; steril filtriert; Lagerung bei -20 °C
IPTG-Stammlösung (1M)	1 M IPTG in Wasser gelöst; steril filtriert; Lagerung bei -20 °C
LB-Medium	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Bacto Tryptone 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 2 % Agar für Platten Autoklaviert

2.8.3 Histon Expression und Aufreinigung

Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM Na-EDTA
-------------	--

	1 mM Benzamidine
	5 mM β -Mercaptoethanol
Triton-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM NaCl
	1 mM Na-EDTA
	1 mM Benzamidine
	5 mM β -Mercaptoethanol
	1 % (v/v) Triton X-100
Entfaltungspuffer	7 M Guanidinium HCl
	20 mM Tris/HCl pH 7,5
	10 mM DTT
Harnstoffpuffer (SAU-X-Puffer)	7 M Harnstoff
	20 mM Natriumacetat pH 5,2
	X mM NaCl
	1 mM Na-EDTA
	5 mM β -Mercaptoethanol

2.8.4 Rekonstitution von Histon-Oktameren

Entfaltungspuffer	7 M Guanidinium HCl
	20 mM Tris/HCl pH 7,5
	10 mM DTT
Faltungspuffer	2 M NaCl
	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	1 mM Na-EDTA
	5 mM β -Mercaptoethanol

2.8.5 Rekonstitution von Chromatin

Hochsalzpuffer (1x)	10 mM Tris/HCl pH 7,6
	2 M NaCl
	1 mM EDTA
	0,05 % (v/v) NP40
	1 mM β -Mercaptoethanol

Niedrigsalzpuffer (20x)	10 mM Tris/HCl pH 7,6
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,05 % (v/v) NP40
	1 mM β -Mercaptoethanol

2.8.6 Chromatin-Remodeling

EX-X-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,6
	1,5 mM MgCl ₂
	0,5 mM EGTA
	X mM KCl
	10 % (v/v) Glycerin

2.9 Primer

Primer	Bezeichnung	DNA-Sequenz	Funktion
LP31	601_ <i>NotI</i> _for	GGCCGCCCTGGA GAATC	Primer, um zusammen mit LP32, fLP1 (cy5) oder fLP2 (cy3) das 601_ <i>NotI</i> -DNA-Fragment über PCR zu vervielfältigen (siehe Punkt 3.1.8)
LP32	601_ <i>NotI</i> _rev	GCGTATAGGGTCC ATCACATAACC	Primer, um zusammen mit LP31 das 601_ <i>NotI</i> -DNA-Fragment über PCR zu vervielfältigen (siehe Punkt 3.1.8)
fLP1	601_ <i>NotI</i> -cy5_rev	GCGTATAGGGTCC ATCACATAACC	Primer, um zusammen mit LP31 das 601_ <i>NotI</i> -DNA-Fragment über PCR cy5-fluoreszent zu vervielfältigen (siehe Punkt 3.1.8)
fLP2	601_ <i>NotI</i> -cy3_rev	GCGTATAGGGTCC ATCACATAACC	Primer, um zusammen mit LP31 das 601_ <i>NotI</i> -DNA-Fragment über PCR cy3-fluoreszent zu vervielfältigen (siehe Punkt 3.1.8)

Tabelle 1: Aufführung der verwendeten Primer.

2.10 Plasmide

Plasmid	Restriktionsenzym	Antibiotika-Resistenz	Ursprung	Funktion
pUC18 12x601	NotI, Aval	Ampicillin	Daniela Rhodes	Nach <i>NotI</i> -Verdau diente das 208 bp große als Template für die PCR; das dadurch erhaltene 200 bp große 601_NotI DNA-Fragment wurde zur Chromatinrekonstitution verwendet (siehe Punkt 2.11)
pT11	BamHI, PstI	Ampicillin	Inventar Labor Längst	4 kDa großes Plasmid, das zum Abstoppen von Remodeling-Reaktionen verwendet wurde (siehe Punkt 3.7)
Pf_H2A_132 aa_pTriEx-1_1		Ampicillin	Synthetisiert durch MrGene	Der pTriEx Vektor enthält die Sequenz für das Plasmodium falciparum Histon H2A und wurde für die Expression dieses Histons in Bakterienzellen transformiert (siehe Punkt 3.3)
Pf_H2B_117 aa_pTriEx-1_1		Ampicillin	Synthetisiert durch MrGene	Der pTriEx Vektor enthält die Sequenz für das Plasmodium falciparum Histon H2B und wurde für die Expression dieses Histons in Bakterienzellen transformiert (siehe Punkt 3.3)
Pf_H3_136a a_pTriEx-1_1		Ampicillin	Synthetisiert durch MrGene	Der pTriEx Vektor enthält die Sequenz für das Plasmodium falciparum Histon H3 und wurde für die Expression dieses Histons in Bakterienzellen transformiert (siehe Punkt 3.3)
Pf_H4_103a a_pTriEx-1_1-1		Ampicillin	Synthetisiert durch MrGene	Der pTriEx Vektor enthält die Sequenz für das Plasmodium falciparum Histon H4 und wurde für die Expression dieses Histons in Bakterienzellen transformiert (siehe Punkt 3.3)

Tabelle 2: Aufführung der verwendeten Plasmide.

2.11 DNA-Fragmente für die Chromatin-Rekonstruktion

Fragment	Sequenz	Länge
601_NotI	Sequenz nach <i>NotI</i> -Verdau des Plasmids pUC18 12x601: GCGGCCGCCCTGGAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCAATTGG TCGTAGCAAGCTCTAGCACCGCTTAAACGCACGTACGCGCTGTCC CCCGCGTTTTAAACGCCAAGGGGATTACTCCCTAGTCTCAGGCAC GTGTCAGATATATACATCCTGTGCATGTATTGAACAGCGACTCGG GTTATGTGATGGACCCTATACGCGGCCGC	208 bp
	Sequenz für die Chromatin Rekonstruktion (nach PCR): GGCCGCCCTGGAGAATCCCGGTGCCGAGGCCGCTCAATTGGTC GTAGCAAGCTCTAGCACCGCTTAAACGCACGTACGCGCTGTCCC CCGCGTTTTAAACGCCAAGGGGATTACTCCCTAGTCTCCAGCACG TGTCAGATATATACATCCTGTGCATGTATTGAACAGCGACTCGGG TTATGTGATGGACCCTATACGC	200 bp
Hsp70 promotor	AATTCGGATCCCACGATAAGCATAACCAAGCTCTGCGATTATCTCT ACCATAATTAATTTAAGCAGCCGATTTATAAAGAAATTTCCAAAAT AAAGCGAATATTCTAGAATCCCAAACAAACTGGTGTTCGCGTAG GTCATTTGTTTGGCAGAAAAGAACTCGAGAAATTTCTCTGGCCG TTATTCTCTATTCGTTTTGTGACTCTCCCTCTCTGTACTATTGCTCT CTCCTCTGTGCGCACAGTAAACGGACACTGTTCTCGTTGCTTCGA GAGAGCGCGCCTCGAATGTTTCGCGAAAAGAGCGCCGGAGTATAA ATAGAGGCGCTTCGTCGACGGAACGTCAATTCAGATCTG	359 bp
O2-40/-60 rDNA spa- cer promo- ter	CCCTTACTGTGCTCCCTTCCCCTAACTGTGCCTAACTGTGCCTGT TCCCTCACCCCGCTGATTCGCCAGCGACGTACTTTGACTTCAAGA ACGATTTTGCCTGTTTTACCGCTCCCTGTCATACTTCGTTTTTGG GTGCCCGAGTCTAGCCCGTTCGCTATGTTCCGGCGGGACGATGG GGACCGTTTGTGCCACTCGGGAGAAGTGGTGGGTGGGTACGCTG CTCCGTGCGTGCCTGAGTGCCGGAACCTGAGCTCGGGAGAC CCTCCGGAGAGACAGAATGAGTGAGTGAATGTGGCGGCC	308 bp

Tabelle 3: Aufführung der verwendeten DNA-Fragmente.

2.12 Software

Software	Anbieter
Adobe Photoshop CS5	Adobe
ÄKTA Unicorn Version 5.01	Amersham Biosciences
Citavi	Swiss Academic Software
Image Reader FLA-5000 V2.0	Fujifilm
Microsoft Word 2007	Microsoft
Multi Gauge V3.0	Fujifilm

Tabelle 4: Aufführung der verwendeten Software.

3 Methoden

3.1 DNA-spezifische Methoden

3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter E.coli Bakterienzellen wurde am Lehrstuhl routinemäßig nach Standardmethoden von technischen Assistentinnen durchgeführt.

3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien wurde ca. 100 ng der gewünschten Plasmid-DNA zu 50 µl auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten E.coli Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock zugeführt, um die DNA in die Zelle zu schleusen. Dafür wurde eine Inkubation für 45 Sekunden bei 42 °C gewählt. Nachfolgend wurde die Mischung für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin mit 250-500 µl SOC Medium versetzt. Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C für 30-60 Minuten und 400 rpm kuriert und anschließend in geeigneten Mengen und unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Glas-Spatels sowie einer rotierenden Plattform auf LB-Amp-Platten ausplattiert und bei 37 °C ü.N. inkubiert.

3.1.3 Vervielfältigung von Plasmid-DNA in Bakterien und Isolierung

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden zwei Derivate des E.coli-Stammes K12 verwendet. Diesem Bakterienstamm fehlen die für die Pathogenität verantwortlichen Gene, beispielsweise Gene für Adhäsions-, Invasionsfaktoren oder Toxine. Standardmäßig wurden die Wirtsstämme DH5α und XL1 Blue verwendet, wobei XL1 Blue zusätzlich eine Rekombinationsdefizienz (recA-) aufweist, die unerwünschten Rekombinationen innerhalb der DNA entgegenwirkt. Nach der Transformation der Plasmid-DNA in die genannten chemisch kompetenten Wirtsstämme und der Inkubation auf LB-Amp-Platten ü.N. (siehe Punkt 3.1.2), erfolgte die Anzucht der Bakterien, ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie, in flüssigem autoklavierten LB-Amp-Medium. Je nach erwünschter DNA-Menge erfolgte das Animpfen in 5-50 ml Medium und die Inkubation ü.N. bei 37 °C im Schüttelinkubator. Anschließend konnten Mini- bzw. Midi-Präparationen durchgeführt werden, wofür die Kitsysteme von QIAGEN dienten (siehe Punkt 2.4), die die DNA über Anionenaustauschersäulen reinigen. Die Behandlung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmidpräparationen wurden bei -20 °C gelagert.

3.1.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für die Analyse von Plasmiden sowie das Herausschneiden bestimmter DNA-Fragmente aus dem Plasmid für eine nachfolgende Isolierung, wurde Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen an spezifischen Stellen geschnitten. Angesetzt wurden analytische Restriktionsverdau in 10-20 µl, präparative Verdau in 50 µl Gesamtvolumen. Das Restriktionsenzym (NEB) wurde in geeigneter Menge (ca. 10 U pro 1 µg DNA) dem Ansatz mit der zu schneidenden DNA, dem von NEB empfohlenen Puffer

sowie ggf. BSA (0,1 mg/ml) und MQ H₂O zugegeben. Dieser wurde anschließend, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, danach gegebenenfalls hitzeinaktiviert und zur Analyse bzw. Gelelution (siehe Punkt 3.1.6) auf ein Agarose-Gel (siehe Punkt 3.1.5) aufgetragen.

3.1.5 Agarose Gelelektrophorese

Die Elektrophorese trennt Nukleinsäuren im elektrischen Feld und innerhalb eines festen Trägermaterials auf. Im Falle der Agarose-Gelelektrophorese besteht dieses Trägermaterial aus einem Polymer verschieden verknüpfter Galactose-Einheiten, worin die DNA, als negativ geladenes Molekül, in Richtung Anode wandert. Unterschiede in der Wandergeschwindigkeit werden, durch die gleich bleibende Ladungsdichte, ausschließlich durch verschiedene Molekülgrößen hervorgerufen. Verwendet wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA-Fragmenten sowie zu präparativen Zwecken. Dazu wurde die gewünschte Menge an Agarose in ca. 70 ml 1xTBE durch zwei-dreiminütiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Der Flüssigkeit wurde mit 0,5xSYBR® Safe (7 µl in 70 ml Volumen) ein Cyanin-Farbstoff zugegeben, bevor sie anschließend in eine Gelkammer gegossen wurde, wobei vor dem Erkalten ein geeigneter Kamm eingefügt wurde. Zum Auftragen der DNA wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an Orange G-DNA-Ladungspuffer versetzt und zusammen mit 4 µl eines vorgefärbten 1 kb DNA-Markers bei 120 V und 400 mA aufgetrennt. Als Ladungspuffer diente dabei 1xTBE. Die Dokumentation des Gels erfolgte mit dem Safe Imager™ System der Firma Invitrogen.

3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente, die nach einem präparativen Restriktionsverdau aufgereinigt werden sollten, wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX® II Gel Extraction Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. Prinzipiell werden DNA Fragmente mit Hilfe chaotroper Salze, die die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckern im Agarose-Polymer zerstören, aus der Agarose gelöst und unter hohen Salzbedingungen und einem pH von ca. 7,5 an Silica-Gelpartikel gebunden. Die Elution findet anschließend, nach mehreren Waschschritten, unter niedrigen Salzbedingungen (z.B. Tris, MQ H₂O) statt.

3.1.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native, nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde für die Analyse von Nukleosomen verwendet. Durch den Käfigeffekt des Polyacrylamids bleiben die DNA-Protein-Komplexe während der Elektrophorese erhalten. Die Windung der DNA um das Histon-Oktamer führt zu einer Verminderung der elektrophoretischen Mobilität und damit zu einer langsameren Wandergeschwindigkeit im Gel, verglichen mit freier DNA.

Standardmäßig wurden die Nukleosomen auf 5 % bzw. 6 % Polyacrylamid-Gelen analysiert. Die Zusammensetzung für je etwa 50 ml Gesamtvolumen zeigt Tabelle 5.

Bestandteile	5 %	6 %
0,4xTBE	41,7 ml	40 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (30 %)	8,3 ml	10 ml
TEMED	30 μ l	30 μ l
APS 20 %	150 μ l	150 μ l

Tabelle 5: Zusammensetzung nativer 5 % und 6 % Polyacrylamid-Gele.

Die Mischung der verschiedenen Bestandteile wurde sofort in eine vorgefertigte Gelkassette des Novex-Systems (Invitrogen) gegossen, mit einem passenden Kamm versehen und bei RT auspolymerisiert. Vor dem Auftragen von ca. 300-500 ng Nukleosomen wurden die Proben mit Glycerin (Endkonzentration 5 %) versehen und das Gel einem Vorlauf bei 80 V für 30 Minuten unterzogen, um verbliebene Radikale der Polymerisationsreaktion zu entfernen. Die Auftrennung der DNA und nativer Nukleoproteinkomplexe erfolgte bei einer Spannung von 85 V für ca. 80 Minuten, als Laufpuffer diente dabei 0,4xTBE. Anschließend wurde die DNA mit EtBr (600 ng/ml) gefärbt. Das native PAA-Gel wurde dazu in 50 ml, mit 3 μ l EtBr (10 mg/ml) versetzten 0,4x TBE Puffer für 15 Minuten geschwenkt. Nachfolgend wurde das Gel zweimal für 10 Minuten in bidestilliertem H₂O geschwenkt, bevor es über eine UV-Lampe detektiert werden konnte. Bei der Arbeit mit fluoreszent markierten Nukleosomen wurde das PAA-Gel über den Fluorescence Image Reader FLA-5000 (Fujifilm) ausgelesen.

3.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine von Kary Mullis entwickelte Methode zur Vervielfältigung der DNA in vitro (Mullis et al., 1986). Dabei wird ein DNA-Template, unter Zugabe von zwei Primern, Desoxyribonukleosidtriphosphaten, einer DNA-Polymerase und einem geeigneten Puffer mit Mg²⁺-Ionen, wiederholt verschiedenen Temperaturphasen unterzogen, was die wiederholte Abfolge der Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation ermöglicht und so zu einer Vervielfältigung der DNA führt.

Die Polymerasekettenreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Amplifikation des artifiziellen 601_NotI DNA-Fragments, das zur Rekonstitution von Mononukleosomen dient, verwendet (siehe Punkt 4.3.1).

Für die Vervielfältigung dieses DNA-Fragments wurde zunächst eine Test-PCR mit einem 50 μ l Ansatz, anschließend eine PCR im größeren Maßstab mit einem Gesamtvolumen von 5000 μ l durchgeführt. Dabei wurden nicht mehr als 100 μ l Volumen in die PCR-Cups pipettiert. Nachfolgende Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes, Tabelle 7 das PCR-Programm zur Vervielfältigung des 601_NotI DNA-Fragments.

Bestandteile	Volumen
Taq-DNA-Polymerase	1 μ l
10xTaq-Puffer	5 μ l
Nukleotidmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 10 mM	1 μ l
Primer 1 (10 μ M)	1 μ l
Primer 2 (10 μ M)	1 μ l
DNA-Template 0,5-1 ng	1 μ l
MQ H ₂ O	auf 50 μ l

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für die Vervielfältigung des 601_*NotI* DNA-Fragments mittels PCR.

Für die Vervielfältigung des 601_*NotI* DNA-Fragments wurden sowohl nicht-fluoreszente Primer, als auch fluoreszente cy3- und cy5-Primer eingesetzt (siehe Punkt 2.9), wobei für die Herstellung der fluoreszenten 601_*NotI* Fragmente nur ein Drittel der Primer-Menge in der PCR verwendet wurde.

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung initial	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	59 °C	45 sec 25x
Extension	72 °C	30 sec
Extension final	72 °C	10 min

Tabelle 7: PCR-Programm für die Vervielfältigung des 601_*NotI*-Fragments.

3.1.9 DNA-Fällung

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren sowie für die Erzeugung neuer Pufferbedingungen, wurde eine Präzipitation mit Ethanol durchgeführt. Dabei werden bevorzugt, durch Zugabe von Natriumacetat oder Ammoniumacetat, monovalente Kationen bereitgestellt, die die Hydrathülle der DNA vermindern und die Löslichkeit auf diese Weise herabsetzen. In Ethanol bildet die DNA einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Das mitgefällte Salz kann durch Waschen des Nukleinsäurepellets mit 70%igem Ethanol größtenteils entfernt werden.

Die zugegebene Menge an Salz bzw. Ethanol richtete sich nach dem Ausgangsvolumen der DNA-Lösung, so wurde 50 % Volumenanteil Ammoniumacetat (7,5 M) bzw. 10 % Volumenanteil Natriumacetat (3 M; pH 5,2) zugesetzt, Ethanol dagegen wurde als zweifaches Volumen zugegeben. Der Fällungsansatz wurde bei -20 °C für mindestens 30 Minuten inkubiert, anschließend bei 13 000 rpm und 4°C für 20 Minuten ab-

zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Lösung des Nukleinsäurepellets erfolgte nach 2-5-minütigem Trocknen in vorgewärmtem MQ H₂O.

3.1.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA kann durch die Absorptionsmaxima der aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Dabei weist eine Lösung, die 50 µg doppelsträngige DNA/ml enthält, bei einer Küvetten-Schichtdicke von 1cm, einen Absorptionwert von 1 auf (so genannte Optische Dichte, OD). Der OD-Wert dient somit zur Bestimmung der Konzentration einer unbekannt DNA-Lösung. Um die Reinheit der Nukleinsäurelösung abzuschätzen ist es hilfreich, das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm zu bestimmen (OD_{260nm}/OD_{280nm}). Da das Absorptionsmaximum für Proteine, durch die Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm liegt, besitzt eine reine DNA-Lösung einen OD_{260nm}/OD_{280nm} -Wert von 1,8.

Die DNA-Konzentration im Labor wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierfür wurde die NanoDrop® ND1000 von PeqLAB verwendet.

3.2 Proteinspezifische Methoden

3.2.1 Standardmethoden

Bei der Arbeit mit Proteinen wurde stets darauf geachtet, diese auf Eis zu halten. Außerdem wurden Benzamidine als Proteaseinhibitor sowie Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel jeweils frisch allen verwendeten Puffern und Lösungen zugegeben.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese stellt eine Elektrophorese-Methode dar, bei der Proteingemische im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. SDS (engl. für **sodium dodecyl sulfate**, Natriumdodecylsulfat) denaturiert als anionisches Detergens dabei die Proteine und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen durch Anlagerung, womit konstant negative Ladungen pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Die Porengröße des polymerisierten Gels entscheidet über die Auftrennung der jeweiligen Proteine im Gel.

Für diese Arbeit wurden standardmäßig 17% SDS-Polyacrylamidgele verwendet, um die zwischen 11 und 15 kDa großen Histone aufzutrennen und die relativ geringen Größenunterschiede sichtbar zu machen. Das Gießen der Gele und die Elektrophorese wurden mit dem Novex-System (vormontierte Gelkassetten, Invitrogen) durchgeführt. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für ein 17 % SDS-Gel zeigt Tabelle 8.

Bestandteile	Sammelgel (5 %)	Trenngel (17 %)
Rotiphorese Gel30: 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)	0,25 ml	3,4 ml
Lower Tris-Puffer (4x)		1,5 ml
Upper Tris-Puffer (4x)	0,38 ml	
TEMED	0,0015 ml	0,006 ml
APS (20)	0,0075 ml	0,03 ml
MQ H ₂ O	0,861 ml	1,064 ml
Gesamtmenge	1,5 ml	6 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung 17%iger SDS-Polyacrylamidgelen.

Zunächst wurde das Trenngel mit Hilfe einer 5 ml Glaspipette in die Kassetten gefüllt und mit Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Gelkassette mit Sammelgel aufgefüllt und ein geeigneter Kamm eingefügt.

Für die Elektrophorese wurden Proteinproben mit 6x SDS-Protein-Probenpuffer versetzt, für ca. 5 min bei 95 °C inkubiert und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 300 V und 40 mA für ca. 45 Minuten.

3.2.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue

Nach der Elektrophorese wurde SDS-Gelen eine Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung zugegeben und mit dieser wurden sie für ca. 20 Minuten auf einem rotierenden Plattformschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel mehrfach mit bidestilliertem Wasser aufgeköcht und geschwenkt, bis der Farbstoff ausreichend ausgewaschen und eine gute Sichtbarkeit der Proteinbanden vorhanden war.

3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Alle Proteinkonzentrationen wurden mittels einer Modifikation des Bradford-Assays bestimmt (Bradford, 1976). Der Grundgedanke basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum blauer Säurefarbstoffe (als „Coomassie-Brilliantblau“ bezeichnet) in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 265 nm zu 595 nm verschiebt. Durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein, wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Form stabilisiert. Die Bindung erfolgt dabei vor allem an kationischen und nicht polaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Für die praktische Arbeit wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet. Zu je 800 µl Protein-Lösung (mit jeweils 1 µl und 5 µl an Protein) bzw. BSA-Lösung (mit jeweils 1, 2, 5, 10 und 15 µg an BSA) wurde 200 µl BIO-RAD Protein Assay zugegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Im Vergleich zu der gemessenen Absorption von BSA wurde die Konzentration des Proteins von Interesse bestimmt.

3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Plasmodium falciparum Histone

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Plasmodium falciparum Histone wurde gemäß eines Protokolls von Luger et al. durchgeführt, das von Claudia Huber im Labor etabliert worden war (Luger et al., 1999).

Für die Proteinexpression und -aufreinigung spielen im Allgemeinen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle. Dazu zählen die vorhandene Menge und die Art des Proteins in der Zelle, Säure-Base-Eigenschaften, die biologische Aktivität und auch die Stabilität des Proteins. So können die exprimierten Proteine beispielsweise in Form von unlöslichen, dichten Aggregaten in der Zelle vorliegen oder auch in löslichem Zustand innerhalb oder außerhalb der Zelle.

Die Expression von Plasmodium falciparum Histonen wurde in E.coli Bakterien durchgeführt. Das Molekulargewicht beträgt für die Plasmodium falciparum Histone für pf H2A 14,13 kDa, für pf H2B 13,84 kDa, für pf H3 15,42 kDa und für pf H4 11,41 kDa, was zeigt, dass Histonproteine generell relativ kleine Proteine darstellen, die grundsätzlich leichter in Bakterien exprimiert werden können. Histonproteine akkumulieren in der Bakterienzelle in Form der beschriebenen unlöslichen, dichten Aggregate, den „inclusion bodies“ (Einschlusskörperchen). Diese lassen sich relativ einfach über Zentrifugationsschritte abtrennen und können einen hohen Gesamtproteinanteil der Zelle ausmachen. Die Proteine liegen dabei, durch Überexpression oder fehlerhafte Faltung im Bakterienmilieu, in nicht-nativem Zustand vor. Die Sequenz aller vier Plasmodium Histone befindet sich in einem pTriEx-1.1 Vektor, der ein Ampicillin-Resistenz-Gen und die T7-Promotor-Sequenz enthält.

3.3.1 Histon-Testexpression

Zur Überprüfung der Induzierbarkeit und der Ermittlung der idealen Inkubationszeit nach der Induktion, wurde für jedes Plasmodium falciparum Histon eine Testexpression durchgeführt. Dazu wurde ca. 100 ng Histon-DNA in E.coli BL21 (DE3) bzw. E.coli BL21 (DE3) pLacI chemisch kompetente Zellen transformiert, ausplattiert und mit einer einzelnen Bakterienkolonie eine 5ml-LB-Amp-ÜN-Kultur angeimpft. Mit dieser wiederum wurden zwei 25 ml LB-Amp-Medien auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert. Eine der beiden 25 ml-Kulturen wurde nun mit IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) induziert, die zweite 25 ml-Kultur diente als nicht-induzierte Kontrolle. Nach 2, 3, 4 und 5 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 1,5 ml Bakterienkultur entnommen, abzentrifugiert (13000 rpm, 2 min) und die Pellets in 300 µl B-PER Reagenz resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 5 min) wurden die Pellets erneut in 300 µl B-PER Reagenz resuspendiert und anschließend wurden jeweils 10 µl der Suspension auf einem 17 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

3.3.2 Glycerin-Dauerkulturen

Im Rahmen der Expression rekombinanter Plasmodium falciparum Histone wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurde von Bakterienkulturen, vor der Induktion mit IPTG, 1 ml steril entnommen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 420 µl sterilem 50%igen Glycerin versetzt. Das Kultur-Glycerin-Gemisch wurde

kurz gevortext, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Glycerin-Dauerkulturen können dazu verwendet werden, neue Vorkulturen direkt anzuzüchten.

3.3.3 Präparative Proteinexpression

Für die Expression der Plasmodium falciparum Histone im großen Maßstab wurde erneut je 100 ng an Plasmid-DNA in E.coli BL21 (DE3) bzw. E.coli BL21 (DE3) pLacI chemisch kompetente Zellen transformiert. Mit den 5 ml LB-Amp-ÜN-Kulturen wurden im Folgenden 100 ml LB-Amp-Medien auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde jeweils ein 1-Liter-LB-Amp Medium mit der 100 ml Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,05 angeimpft und bei 37 °C weiter inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG (Endkonzentration 0,2 mM). Die 1-Liter-Kulturen wurden nach der Induktion, entsprechend den in der Testexpression ermittelten idealen Inkubationszeiten, bei 37 °C im Schüttelinkubator weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4500 rpm, 20 min), die Pellets in 20 ml Waschpuffer (siehe Punkt 2.8.3) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellsuspension erfolge bei -80 °C.

3.3.4 Präparation von inclusion bodies

Für die Präparation der inclusion bodies wurde die bei -80 °C gelagerte Zellsuspension zunächst in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Durch Sonifikation, unter Verwendung eines breiten Sonifizierstabs, erfolgte anschließend, mit dem Branson Sonifier 250, das Aufbrechen der noch intakten Zellen (5 min, Amplitude 70 %, Puls 5 sec an/ 5 sec aus), wobei die Ultraschallwellen schnelle Druckänderungen erzeugen und auf diese Weise zu einem effizienten Aufbruch der Zellen führen. Gleichzeitig wird viel Wärme freigesetzt, weshalb die Suspension während des Sonifizierens auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch differenzielle Zentrifugation pelletiert (Rotor 8.24, 18000 rpm, 20min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst in 20 ml Triton-Waschpuffer (siehe Punkt 2.8.3), anschließend zweimal in 20 ml Waschpuffer resuspendiert. Dazwischen und danach wurde bei 18000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Entfaltung der Proteine in den inclusion bodies

Dem gefrorenen Pellet wurde mit Dimethylsulfoxid (1 ml) ein organisches Lösungsmittel zugegeben, das als amphiphiles Molekül in der Lage ist, sowohl polare, als auch unpolare Bestandteile in Lösung zu bringen. Nachdem das Pellet vollständig aufgetaut war, wurde es in einigen ml Entfaltungspuffer (siehe Punkt 2.8.3) resuspendiert, anschließend wurde mit diesem auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt. Das im Puffer enthaltene Guanidiniumchlorid (7 M) diente dem Aufbrechen der inclusion bodies und der vollständigen Denaturierung der Proteine. Dithiothreitol wurde in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Im Folgenden wurde das homogenisierte Pellet für 60 min auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen, erneut bei 18000 rpm und 4 °C (Rotor A8.24) abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun die Histone befanden, wurde in einen Dialyseschlauch (MWCO 6,000-8,000) überführt, der an beiden Enden verschlossen wurde und nun gegen insgesamt 3 l Harnstoffpuffer (SAU-200; siehe Punkt 2.8.3) dia-

lysiert werden konnte. Zunächst erfolgte die Dialyse zweimal für eine Stunde gegen je 1 l Harnstoffpuffer, anschließend über Nacht gegen einen dritten Liter SAU-200 Puffer.

3.3.6 Reinigung der Histone über Anionenaustausch-Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Verfahren, bei dem eine gelöste Substanz über eine stationäre Phase geleitet wird und deren Einzelbestandteile dabei, durch unterschiedliche Verteilung in der stationären und mobilen Phase, aufgetrennt werden. Die Wechselwirkungen des Substanzgemisches mit dem Füllmaterial einer chromatographischen Säule (stationäre Phase) bewirken eine Bindung an das Säulenmaterial und können durch die Veränderung des Laufmittels (mobile Phase) beeinflusst werden.

Zur Aufreinigung der rekombinanten Histone wurde eine Ionenaustauschchromatographie über den ÄKTApurifier™ bei 4 °C durchgeführt. Hierbei konkurrieren die Probenmoleküle mit Salz-Ionen um geladene Positionen auf dem Trägermaterial der Säule. Im Falle der Histon-Aufreinigung handelte es sich bei dem Säulenmaterial um SP-Sepharose, einen starken Kationenaustauscher, bestehend aus einer quervernetzten Agarose-Matrix, an die Sulfopropylgruppen gebunden sind.

Zunächst wurde die ungefähre Konzentrationsbestimmung der in SAU-200-Puffer befindlichen Proteine mittels Bradford-Test ermittelt, da auf die Sepharosesäule (Säulenvolumen 1 ml) maximal 15 mg Protein geladen werden können. Zudem wurden unlösliche Bestandteile in der Probe vor dem Auftragen auf die Säule, durch erneute Zentrifugation (18000 rpm, 20 min, 4 °C) entfernt.

Um die nötige Salzkonzentration für die Elution der Histone von der Säule herauszufinden, wurde in einem ersten Schritt ein linearer Salzgradient gefahren.

Die Sepharose-Säule wurde zunächst mit SAU-200-Puffer äquilibriert. Es wurde stets eine Flussrate von 1 ml/min gewählt, als Puffer A diente SAU-0-Puffer, als Puffer B SAU-1000-Puffer. Nun wurde für jedes Histon (je 1 ml der in SAU-200-Puffer gelösten Proteine) mit einem linearen Salzgradienten, beginnend mit 200 mM NaCl, aufsteigend bis 1 M NaCl eluiert und die Fraktionen auf einem 17 % SDS-Gel analysiert. Im nächsten Schritt konnte nun mit der Reinigung der Histone im großen Maßstab begonnen werden. Die ermittelten Salzkonzentrationen für die Elution dienten zur Programmierung eines Stufengradienten, der, ausgehend von 200 mM NaCl, in einem Schritt auf die benötigte Elutionskonzentration ansteigend zur vollständigen Elution der Histone von der Säule führt. Ein weiterer stufenförmiger Anstieg der Salzkonzentration diente der Reinigung der Säule. Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss auf einem 17 % SDS-Gel analysiert, anschließend wurden reine Fraktionen zusammengeführt und in einen Dialyseschlauch überführt (MWCO 6,000-8,000). Für die Dialyse gegen bidestilliertes MQ Wasser wurde diesem zunächst 2 mM 2-Mercaptoethanol zugesetzt und die Dialyse erfolgte anschließend zweimal für eine Stunde gegen je 3 l Wasser, nachfolgend, über Nacht, gegen weitere 3 l Wasser.

Im Folgenden wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test ermittelt und mit bidestilliertem MQ H₂O wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Anschließend wurden 1 ml Portionen der Histone in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4 Rekonstitution und Gelchromatographie von Plasmodium falciparum Histonoktameren

Die Rekonstitution und Gelchromatographie der Plasmodium falciparum Histonoktamere wurde, wie bereits die Expression und Aufreinigung rekombinanter Histonproteine, nach einem Protokoll von Luger et al. durchgeführt (Luger et al., 1999). Dabei ist es wichtig, äquimolare Mengen der einzelnen Histone einzusetzen, um die Ausbildung von unerwünschten Aggregaten sowie von Hexameren oder Tetrameren zu vermeiden (Eberharter et al., 2004).

Für die Rekonstitution der Histonoktamere wurde zunächst je 1 mg von Histon H2A, H2B, H3 und H4 lyophilisiert und danach in je 500 µl Entfaltungspuffer (siehe Punkt 2.8.4) gelöst. Auf einem Drehrad wurden die Ansätze ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden alle vier gelösten Histone gemischt und das Volumen wurde mit Entfaltungspuffer auf 4 ml aufgefüllt. Zur Rekonstruktion der Histonoktamere wurden die Ansätze im Folgenden gegen insgesamt 6 l Faltungspuffer (siehe Punkt 2.8.4), zunächst zweimal für eine Stunde, und weiter über Nacht dialysiert. Bevor die Histonoktamere per Gelfiltration mittels ÄKTApurifier™ von anderen hochmolekularen Aggregaten, (H3-H4)₂-Tetrameren, H2A-H2B-Dimeren und einzelnen Histonen getrennt werden konnten, wurden die Histonoktamer-Gemische über einen Zentrifugationsschritt von Präzipitaten befreit (18000 rpm, 20 min) sowie über Amicon Säulen (MWCO 10,000) auf ein Volumen von ca. 1 ml aufkonzentriert.

Die Gelchromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung von gelösten Molekülen gemäß ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von Teilchen durch ein poröses Trägermaterial. Moleküle ab einer bestimmte Größe dringen nicht mehr in die Poren des Trägermaterials ein und wandern so schneller durch die Säule als kleinere Moleküle, die eine Verzögerung erfahren, indem sie sich ungehinderter bewegen können und in die Poren eindringen. Das Laufmittel dient hierbei als Lösungsmittel und hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennung selbst.

Im Falle der Gewinnung von Histonoktameren wurde eine Säule (Superdex-200) verwendet, deren Trägermaterial aus kugelförmigen Verbundteilchen von quervernetzter Agarose und Dextran besteht. Das Gesamtvolumen der Säule beträgt 120 ml, die Flussrate wurde stets auf 1 ml/min gehalten. Zunächst wurde die Säule über Nacht äquilibriert, das heißt, mit sterilem, partikelfreiem bidestilliertem Wasser und anschließend mit sterilem Faltungspuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die in 1 ml Volumen gelösten rekonstituierten Histonoktamere auf die Säule aufgetragen. Im Laufprofil von Luger et al. hatte sich gezeigt, dass hochmolekulare Aggregate etwa nach 45 ml Durchfluss die Säule passiert hatten, der Peak für die Histonoktamere bei 65-68 ml begann und die H2A-H2B-Dimere nach etwa 84 ml Durchflussvolumen eluiert worden waren. Die Oktamer-Fractionen wurden anschließend zusammengeführt und mit Hilfe von Amicon Säulen (MWCO 10,000) auf eine Konzentration von 1 mg/ml aufkonzentriert. 50 % steriles Glycerol wurde auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben, anschließend konnten die Histonoktamere bei -20 °C gelagert werden.

3.5 Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse

Die Rekonstitution von Nukleosomen mittels Salzgradientdialyse ist eine Standardmethode, um Nukleosomen mit hoher Qualität und gleichbleibenden Abständen zu gewinnen (Lee und Narlikar, 2001). Dabei werden Histonoktamere mit DNA-Fragmenten und BSA in einem Reaktionsansatz und einer Ausgangs-Salzkonzentration von 2 M NaCl (Hochsalzpuffer, siehe Punkt 2.8.5) über Nacht kontinuierlich gegen Niedrigsalzpuffer (50 mM NaCl, siehe Punkt 2.8.5) dialysiert. Bei der zunächst hohen Salzkonzentration von 2 M NaCl bleibt der Histonoktamer-Komplex erhalten (Thomas und Butler, 1977), jedoch ohne Bindung an die DNA. Fällt die Salzkonzentration unter 2 M NaCl, zerfallen die Oktamere in ein (H3-H4)₂-Tetramer und zwei H2A-H2B Dimere. Das Tetramer beginnt bei einer Salzkonzentration von ca. 1,3 M NaCl spezifisch an die DNA zu binden, anschließend, bei einer Salzkonzentration von ca. 0,8 M, bindet je ein H2A-H2B Dimer an das Tetramer, ab einer Konzentration von 0,6 M ist das Assembly komplett (Lee und Narlikar 2001). Den Reaktionsaufbau der Salzgradientdialyse zeigt nachfolgende Abbildung 13.

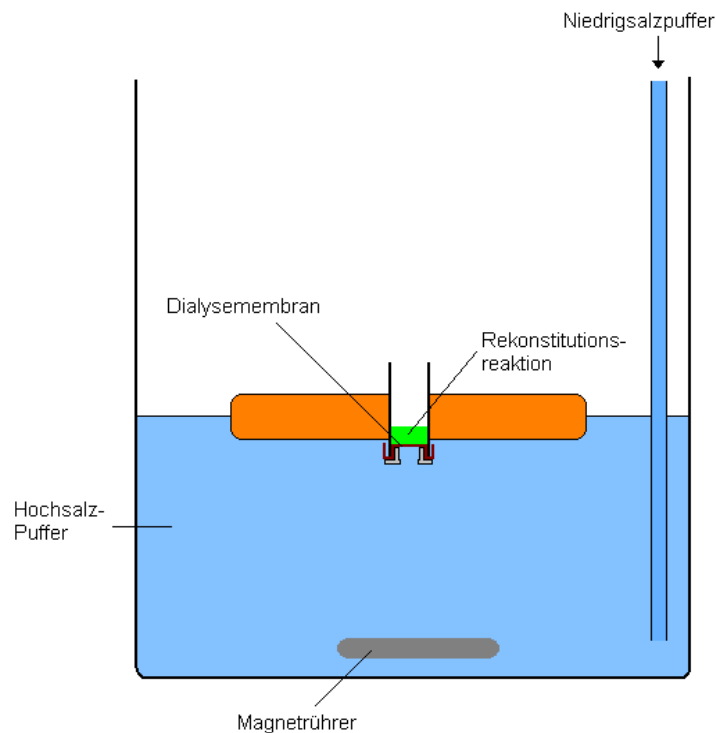


Abbildung 13: Reaktionsaufbau der Salzgradientdialyse zur Chromatin-Rekonstitution (modifiziert nach Sonja Völker, Diplomarbeit 2009).

Abbildung 13 zeigt schematisch den Reaktionsaufbau der Salzgradientdialyse zur Chromatin-Rekonstitution. Der Standard-Reaktionsansatz, hier grün dargestellt, beinhaltet Histonoktamere, DNA und BSA (siehe nachfolgende Tabelle 9) und wird, eingesetzt in einen Schaumstoffschwimmer, über eine Membran der Salzgradientdialyse zugänglich. Die Dialyse erfolgt dabei in einem 3 Liter Behältnis, in dem sich anfänglich 300 ml an Hochsalzpuffer befinden. Durch einen kontinuierlichen Zufluss von Niedrigsalzpuffer (200 ml/h) sinkt die anfängliche Konzentration von 2 M NaCl (Hochsalzpuffer)

fer) allmählich ab, um nach ca. 15 Stunden ihren niedrigsten Wert von 227 mM NaCl zu erreichen.

Für den Aufbau der Chromatin-Rekonstitutions-Reaktion wurden zunächst geeignete Dialysegefäße hergestellt. Dazu wurde von silikonisierten 1,5 ml Reaktionsgefäßen der untere, schmal zulaufende Teil entfernt und anschließend, mit Hilfe eines erhitzten Metallstabs, ein kreisrundes Loch in den Deckel gestanzt, über das der Salzaustausch während der Reaktion stattfinden kann. Überstehende Kunststoff-Reste wurden mittels Skalpell entfernt. Zwischen Reaktionsgefäß-Oberrand und Deckel wurde nun ein zuvor in Hochsalzpuffer eingelegtes ca. 2x 2 cm großes Membranstück (MWCO 6-8,000) eingespannt, das nun den Boden des nach oben offenen Dialysegefäßes bildete.

Das fertige Dialysegefäß wurde im Folgenden über einen Schaumstoffschwimmer auf die Oberfläche des Hochsalzpuffers (2 M NaCl, 300 ml, befindlich in einem 3 l Behälter) aufgesetzt. Mittels einer gebogenen und am unteren Ende angefärbten Pasteurpipette, wurden Luftblasen unter der Membran entfernt, um den Salzaustausch über eine möglichst große Fläche zu ermöglichen. Der Niedrigsalzpuffer (50 mM, 3 l, befindlich in einem 3 l Behälter) wurde, nach Einpipettieren des Reaktionsansatzes in das Dialysegefäß, über ein Pumpsystem kontinuierlich und mit einer Flussrate von 200 ml/h dem Hochsalzpuffer zugeleitet. Der Magnetrührer (ca. 100 rpm) ermöglichte dabei die Durchmischung der beiden Salz-Puffer.

Bei der Arbeit mit fluoreszent markierter DNA wurde stets unter Lichtausschluss gearbeitet.

Die Zusammensetzung eines Standard-Reaktionsansatzes zeigt Tabelle 9.

Bestandteile	Volumen
Hochsalzpuffer	auf 40 µl
BSA 10 µg/µl (200 ng/µl Endkonz.)	0,8 µl
DNA-Fragment	4 µg
Histon-Oktamere (0,5 µg/µl)	entsprechend ermitteltem Verhältnis
Reaktionsvolumen	40 µl
DNA-Konzentration nach Dialyse	100 ng/µl

Tabelle 9: Standard-Reaktionsansatz für die Chromatin-Rekonstitution mittels Salzgradientdialyse.

Ein wichtiger Aspekt der Nukleosomen-Rekonstitution ist die Intaktheit und Gleichartigkeit der Dialyse-Produkte, wobei die Mengenverhältnisse von Histonoktameren und DNA sowie die Positionierung der Histonoktamere auf der DNA, eine entscheidende Rolle spielen. Ist die Menge an DNA beispielsweise zu gering, führt dies zu unspezifischen Bindungen und Aggregation der Histonoktamere (Lee und Narlikar 2001). Bei der Rekonstitution von Mononukleosomen auf kurzen DNA-Fragmenten ergibt sich nach den Massenverhältnissen von DNA und Histonoktameren ein optimales Verhältnis von 1:1, da 147 bp DNA in etwa 100 kDa entsprechen, wobei gleiches auf ein His-

tonoktamer zutrifft, das aus jeweils zwei der Histone H2A (ca. 14 kDa), H2B (ca. 14 kDa), H3 (ca. 15 kDa) und H4 (ca. 11 kDa) besteht und somit eine Masse von etwa 108 kDa aufweist. Zunächst wurde ein Test-Assembly für die jeweiligen DNA-Fragmente bzw. humanen oder Plasmodium falciparum Histonoktamere durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Histonoktamer:DNA-Verhältnisse (z.B. 0,4:1, 0,6:1, 0,8:1 und 1:1) gewählt, um trotz möglicherweise ungenauer Ausgangskonzentrationen ein optimales Verhältnis ausfindig zu machen und die Reaktion wurde entsprechend dem Standardreaktionsansatz (siehe Tabelle 9) angesetzt. Anschließend wurde die Qualität der rekonstituierten Nukleosomen über die Analyse auf einem nativen Polyacrylamid-Gel (siehe Punkt 3.1.7) überprüft. Mit den ermittelten Histonoktamer:DNA-Verhältnissen konnte im Folgenden die Nukleosomen-Rekonstitution in einem größeren Maßstab durchgeführt werden. Die Lagerung der Nukleosomen erfolgte in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei -4 °C.

3.5.1 Verwendung von Histonoktameren

Standardmäßig wurden im Labor für ein Assembly Histonoktamere verwendet. Um die Herstellung von Nukleosomen schnell und im großen Maßstab durchführen zu können, sollte die Technik insofern vereinfacht werden, als an Stelle von Histonoktameren einzelne Histone in den Reaktionsansatz gegeben wurden (siehe Punkt 3.5.2).

3.5.2 Vereinfachung der Methode: Verwendung einzelner Histone

Die rekonstituierten Plasmodium falciparum Histonoktamere sowie einzelne Plasmodium Histone, wurden in verschiedenen Konzentrationen auf ein 17 % SDS-Gel aufgetragen. Über das Multi Gauge Programm konnten die Banden der einzelnen Histone verglichen und das Verhältnis der Proteinmengen der Histone innerhalb eines Histonoktamers zueinander ermittelt werden. Hiervon ausgehend wiederum wurden im Folgenden die benötigten Mengen der einzelnen Histone für eine Chromatin-Rekonstitutions-Reaktion berechnet. Bei der Durchführung der Salzgradientdialyse zur Rekonstitution von Nukleosomen wurde darauf geachtet, schon im Reaktionsansatz eine Salzkonzentration von 2 M NaCl zu erreichen (Verdünnung im herkömmlichen Ansatz durch in Wasser gelöste DNA, die Histonoktamere und BSA). Hierfür wurde die Konzentration mit einem 5 M NaCl Hochsalzpuffer entsprechend ausgeglichen.

3.6 Temperaturverhalten humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen

3.6.1 Temperaturdynamik

Nukleosomen können, neben der ATP-abhängigen Verschiebung durch Chromatin-Remodeling-Enzyme, auch durch Wärmeenergie an eine andere Position verschoben werden (Flaus und Owen-Hughes 2003b). So beobachteten Flaus et al., mit Hilfe eines Fragments der MMTV (mouse mammary tumor virus)-Promotor-Sequenz (siehe Punkt 4.3.4), Bewegungen der mittig positionierten Nukleosomen in Richtung der Randposition der DNA. Für die Untersuchung der thermisch bedingten Mobilität wurden jeweils 400 ng Nukleosomen (entsprechend 4 µl des Salzdialysevolumens) in einem 20 µl Reaktionsansatz (mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6) für mindestens zwei Stunden bei verschiedenen Temperaturen (43 °C, 45 °C, 47 °C) inkubiert. Anschließend wurden die

Reaktionsansätze komplett in die Taschen eines 5-6%igen PAA-Gels pipettiert, bei 85 V und 400 mA für 90 Minuten aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend analysiert.

3.6.2 Thermale Stabilität von Nukleosomen

Zur Untersuchung der thermalen Stabilität humaner und Plasmodium Nukleosomen wurden Nukleosomen verwendet, die mit *NotI* verdauter 601-DNA rekonstituiert und somit mittig auf dem DNA-Fragment positioniert waren. Der Versuchsaufbau wurde dabei ähnlich dem Versuchsaufbau zur Untersuchung der thermisch bedingten Mobilität (siehe Punkt 3.6.1) gestaltet. Hierfür wurden zunächst 300 ng Nukleosomen in einem 20 µl Reaktionsansatz (mit 50 mM Tris/HCl pH 7,6) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze komplett in die Taschen eines 6 % PAA-Gels pipettiert, aufgetrennt und nachfolgend mit Ethidiumbromid gefärbt. Zudem wurden Reaktionsansätze (ebenfalls mit 300 ng Nukleosomen in 20 µl Gesamtvolumen bei 50 mM Tris/HCl pH 7,6) zu verschiedenen langen Inkubationszeiten bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. Auch hierbei wurden die Reaktionsansätze auf ein 6 % PAA-Gel aufgetragen und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.7 Analyse der Dynamik von Nukleosomen

Die rekonstituierten Mononukleosomen konnten in Reaktionen mit Chromatin-Remodeling-Maschinen auf ihre Dynamik hin untersucht werden. Dies erfolgte durch so genannte Remodeling-Reaktionen, auch bezeichnet als „nucleosome sliding assays“ (Längst et al. 1999). Ändert ein Nukleosom seine Position auf einem DNA-Fragment, führt dies zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität in einem nicht-denaturierenden Gel. Positioniert sich ein Histonoktamer dabei randständig auf einem DNA-Fragment, läuft es schneller durch das Gel als ein mittelständig positioniertes Histonoktamer mit DNA-Überhängen zu beiden Seiten (Pennings et al., 1991; Linxweiler und Hörz, 1984). Nachfolgende Abbildung 14 zeigt das Verhalten verschieden positionierter Nukleosomen in einem nativen PAA-Gel schematisch am Beispiel von mononukleosomalen 601_*NotI* Nukleosomen, die durch die Chromatin-Remodeling-Maschine CHD1 von einer randständigen auf eine mittelständige Position auf dem DNA-Fragment verschoben werden. Die randständig positionierten Nukleosomen wandern schneller durch das Gel und erscheinen deshalb „tiefer“ liegend.

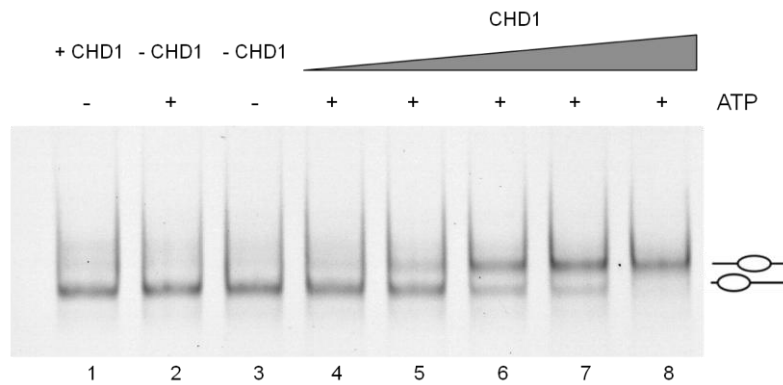


Abbildung 14: Analyse der Dynamik von Nukleosomen. Verhalten verschieden positionierter Plasmodium cy5 601_*NotI* Nukleosomen in einem nativen PAA-Gel im Hinblick auf die Zugabe aufsteigender Konzentrationen einer Chromatin-Remodeling-Maschine (CHD1), Inkubation des Reaktionsansatzes bei 26 °C für 90 Minuten, Zugabe von 200-300 ng Kompetitor-DNA zum Abstoppen der Reaktion, 6 % PAA-Gel, ausgelesen mit dem Fluorescence Image Reader; Spur 1: Ansatz ohne ATP mit CHD1, Spur 2: Ansatz mit ATP ohne CHD1, Spur 3: assemblierte Nukleosomen, Spuren 4-8: Reaktionsansätze mit ATP und aufsteigenden Mengen an CHD1; Position der Nukleosomen schematisch am rechten Bildrand dargestellt.

Die Chromatin-Remodeling Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, waren von Julia Rothammer (Snf2H und CHD1) und Helen Hofmeister (CHD3 und CHD4) exprimiert und aufgereinigt worden. Die Expression war über das Baculovirus System in *SF21* (*Spodoptera frugiperda* 21) Insektenzellen durchgeführt worden.

Für die praktische Durchführung der Remodeling-Reaktionen wurden, wenn möglich, Reaktionsansätze mit einem Volumen von 10-20 µl angesetzt, wobei stets mit silikonisierten 1,5 ml Reaktionsgefäßen gearbeitet wurde. Alle Bestandteile wurden fortwährend auf Eis gehalten, bei der Arbeit mit fluoreszent markierter DNA wurde zusätzlich die Lichtexposition minimiert. Ein Standard-Reaktionsansatz bestand aus EX-X-Puffer, 75-200 ng Nukleosomen (100 ng/µl), 1 mM ATP und dem Chromatin-Remodeling-Enzym, das entsprechend seiner Aktivität zugegeben wurde.

Für eine Standard Remodeling-Reaktion waren ca. 200 ng Nukleosomen notwendig, um eine gute Anfärbbarkeit auf dem Gel zu erreichen. Wurde die Reaktion mit Nukleosomen auf fluoreszent markierter DNA durchgeführt, war in der Regel bereits eine Menge von 75 ng Nukleosomen ausreichend. Beim Pipettieren des Ansatzes wurden zunächst die Nukleosomen in den vorgelegten EX-X-Puffer gegeben, anschließend ATP hinzugefügt und die Chromatin-Remodeling-Enzyme zum Schluss vorsichtig zupipettiert. Die Reaktionsansätze wurden im Folgenden bei 26 °C für 60-90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Reaktion ca. 300-500 ng Kompetitor-DNA (Plasmid pT11) zugegeben, um die Reaktion abzustoppen und die Remodeling Maschinen von den Nukleosomen zu entfernen, und für weitere 5 Minuten inkubiert. Um die Nukleosomenbewegung zu analysieren, wurden die Reaktionsansätze mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 5 %) und auf ein natives 5-6%iges PAA-Gel aufgetragen (siehe Methodenteil 3.1.7). Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, oder, im Falle von Nukleosomen auf fluoreszent markierter DNA, mit dem Fluorescence Image Reader FLA-5000 (Fujifilm) ausgelesen.

Für die Durchführung von Remodeling-Reaktionen ist es wichtig zu beachten, dass in den Reaktionsansätzen eine Gesamtkonzentration an Salz herrscht, die für die Aktivität des jeweiligen Chromatin-Remodeling-Enzyms optimal ist. Für Snf2H hatte sich dabei eine Gesamt-Salzkonzentration von 100 mM, für CHD1, CHD3 und CHD4 eine Gesamt-Salzkonzentration von 80 mM als ideal herausgestellt. Um die jeweiligen Salzkonzentrationen in den Reaktionsansätzen der Remodeling-Reaktionen zu erreichen, wurde der EX-X-Puffer mit dem entsprechenden Salz zugegeben. Für die im Vorfeld durchgeführte Berechnung war dabei zu beachten, dass die Nukleosomen nach der Salzgradientdialyse in 227 mM NaCl und die Remodeling-Enzyme in 300 mM KCl (EX-300-Puffer) vorlagen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Plasmodium falciparum Histone

4.1.1 Testexpression der Plasmodium-Histone

4.1.1.1 Testexpression von pf H2A, pf H2B, pf H3 und pf H4

Die Durchführung einer ersten Testexpression für pf H2A, pf H2B, pf H3 und pf H4 erfolgte durch Regina Gröbner-Ferreira.

Für Ihre Testexpression verwendete Regina Gröbner-Ferreira E.coli BL21 chemisch kompetente Bakterienzellen, in die sie je ca. 100 ng Plasmid DNA transformierte. Die mit einer Bakterienkolonie angeimpften 5 ml Übernachtskulturen wurden verwendet, um für jedes Plasmodium Histon jeweils zwei 10 ml LB-Amp-Medien auf eine OD_{600nm} von 0,1 anzupflanzen. Zudem wurde mit je einem Milliliter der Übernachtskulturen eine Glycerin-Dauerkultur angelegt (siehe Methodenteil 3.3.2). Diese 10 ml-Kulturen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert, anschließend wurde je eine der beiden Kulturen mit IPTG (Endkonzentration 2 mM) induziert. Nach den vorhandenen Erfahrungen im Labor für die Expression von rekombinanten Histonen (Diplomarbeit Claudia Huber, 2007) wurden die Kulturen für die Expression von pf H2A sowie die Kulturen für pf H2B für weitere drei Stunden, die Kulturen für pf H3 und pf H4 für weitere zwei Stunden inkubiert. Die gemessenen OD_{600nm}-Werte zum Zeitpunkt der Ernte zeigt Tabelle 11.

	pf H2A	pf H2B	pf H3	pf H4
induziert	1,948	1,778	1,659	1,355
nicht induziert	1,927	1,910	1,675	1,668

Tabelle 10: OD_{600nm}-Werte der Testexpression der Plasmodium Histonproteine zum Zeitpunkt der Ernte.

Nach der Inkubation wurden je 4 ml der Bakterienkulturen abzentrifugiert (13 000 rpm, 2 min), die Pellets in je 15 µl H₂O resuspendiert und, mit SDS-Ladungspuffer versetzt, auf einem 17 % SDS-Gel analysiert (Abbildung 15).

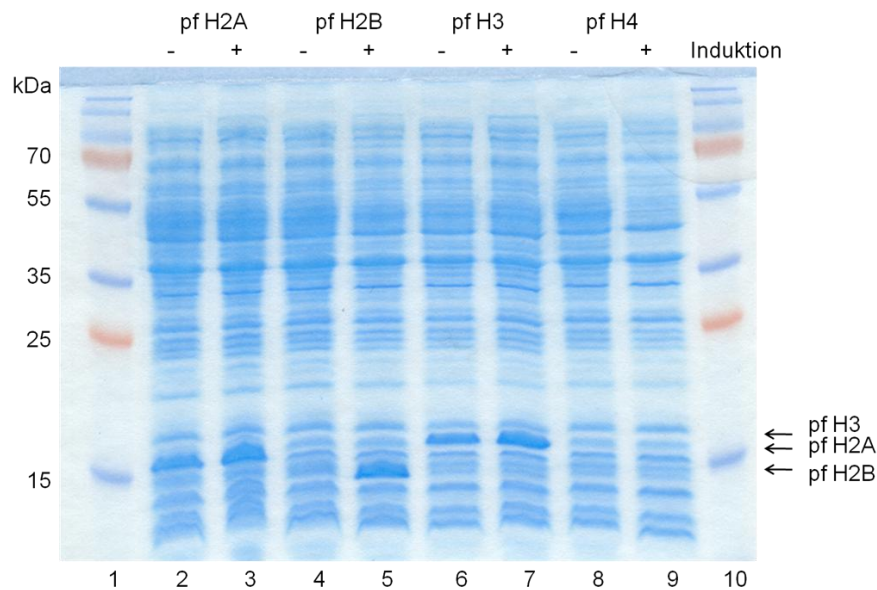


Abbildung 15: Testexpression der Plasmodium falciparum Histone pf H2A, pf H2B, pf H3 und pf H4 in E.coli BL21. Die Histone pf H2A, pf H2B, pf H3 und pf H4 wurden einmal ohne Induktion mit IPTG (Spur 2,4,6,8) und einmal nach Induktion mit IPTG (Spur 3,5,7,9) als Ganzzelllysate auf ein 17 % SDS-Gel aufgetragen und analysiert; die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blue; Spur 1 und 10: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben; die Position der einzelnen Histone ist am rechten Bildrand angegeben.

Abbildung 15 zeigt für pf H2A, mit einer Größe von 14,1 kDa, eine prominente Bande, sowohl für den mit IPTG induzierten, als auch den nicht-induzierten Ansatz („leaky expression“). Der Begriff „leaky expression“ bezeichnet dabei das Auftreten einer gewissen basalen Genexpression, die auch ohne Zugabe eines Induktors stattfindet. In der Auftrennung für pf H2B, mit einer Größe von 13,8 kDa, zeigt sich eine deutliche Bande im induzierten Ansatz, während bei pf H3 erneut eine leaky expression, sowohl im induzierten, als auch im nicht-induzierten Ansatz zu verzeichnen ist. Für pf H4 dagegen ist keine prominente Bande auf der erwarteten Höhe sichtbar (11,4 kDa).

4.1.1.2 Testexpression mit verschiedenen Inkubationszeiten für pf H3 und pf H4

Für die Plasmodium Histone pf H3 und pf H4 wurde in gemeinsamer Arbeit mit Regina Gröbner-Ferreira eine erneute Testexpression mit verschiedenen Expressionszeiten und anschließender B-PER Behandlung durchgeführt (siehe Punkt 3.3.1). Die Analyse der Proben auf einem 17 % SDS-Gel zeigt Abbildung 16.

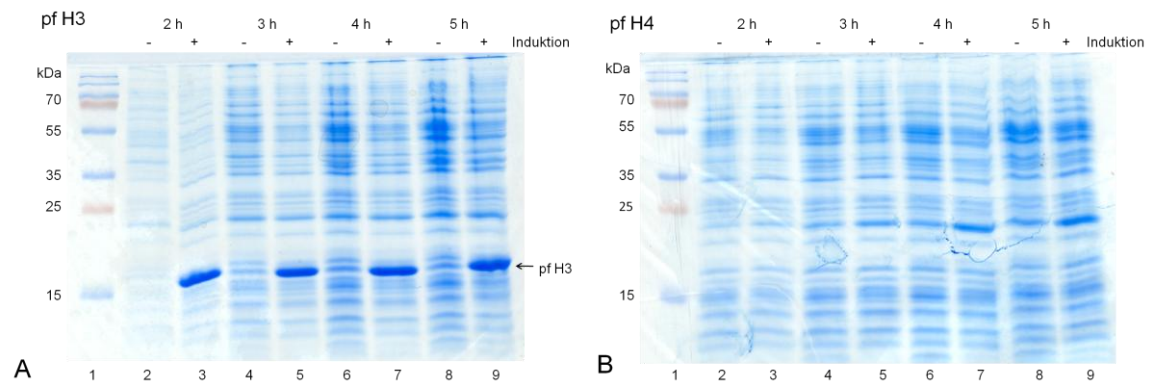


Abbildung 16: Testexpression des Plasmodium falciparum Histon pf H3 und pf H4 in E.coli BL21 pLacI. Die Histone pf H3 und pf H4 wurden einmal ohne Induktion mit IPTG (Spuren 2,4,6,8) und einmal nach Induktion mit IPTG (Spuren 3,5,7,9) für 2-5 h bei 37 °C inkubiert und nach anschließender B-PER-Behandlung auf ein 17 % SDS-Gel aufgetragen und analysiert; die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blue, Spur 1: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben. **A:** Testexpression von pf H3, die Position des Histon pf H3 ist am rechten Bildrand angegeben. **B:** Testexpression von pf H4.

In Abbildung 16 A ist, nach Induktion mit IPTG, die Bildung großer Mengen von pf H3 sichtbar. Im Gegensatz zu Abbildung 15 lässt sich hier keine leaky expression von pf H3 beobachten, möglicherweise bedingt durch die Verwendung von E.coli BL21 pLacI Bakterienzellen. Diese enthalten einen lac Repressor mit dem Ziel, die Gen-Expression im nicht-induzierten Zustand zu unterdrücken. Die Bandenstärke von pf H3 zeigt keine eindeutige Zunahme bei längeren Expressionszeiten. Die Testexpression von pf H4 zeigt keine prominente Bande, die der pf H4 Größe von 11,4 kDa entspricht. Mit steigender Expressionszeit zeigt sich lediglich die Zunahme einer Bande auf Höhe der 20 kDa Marke sowie weiterer, größerer Proteine. Nach der Resuspension der Bakterienpellets in 300 µl B-PER-Reagenz und der darauffolgenden Zentrifugation wurde für pf H4 auch der Überstand auf einem 17 % SDS-Gel analysiert. Auch darauf fand sich kein Anzeichen einer Expression des Plasmodium falciparum Histon H4.

4.1.2 Expression der Plasmodium Histone im großen Maßstab

4.1.2.1 pf H2A

Die Expression von Histon pf H2A im großen Maßstab wurde von Regina Gröbner-Ferreira durchgeführt.

Hierfür impfte Sie eine 5 ml Übernachtskultur mittels Glycerin-Dauerkultur (siehe Punkt 3.3.2) an. Die Weiterarbeit zur 1 Liter-Kultur und die Ernte der Bakterienzellen erfolgte gemäß Punkt 3.3.3 des Methodenteils zur präparativen Proteinexpression. Die Inkubationszeit nach IPTG-Induktion betrug drei Stunden bei 37 °C. Die Pellets wurden nach der Ernte in 20 ml Waschpuffer (siehe Punkt 2.8.3) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte bei -80 °C.

4.1.2.2 *pf H2B*

Die Expression von Histon *pf H2B* im großen Maßstab wurde von Regina Gröbner-Ferreira durchgeführt.

Hierfür impfte Sie eine 5 ml Übernachtkultur mittels Glycerin-Dauerkultur (siehe Punkt 3.3.2) an. Die Weiterarbeit zur 1 Liter-Kultur und die Ernte der Bakterienzellen erfolgte gemäß Punkt 3.3.3 des Methodenteils zur präparativen Proteinexpression. Die Inkubationszeit nach IPTG-Induktion betrug drei Stunden bei 37 °C. Die Pellets wurden nach der Ernte in 20 ml Waschpuffer (siehe Punkt 2.8.3) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte bei -80 °C.

4.1.2.3 *pf H3*

Die Expression von Histon *pf H3* wurde gemäß Punkt 3.3.3 des Methodenteils durchgeführt, wobei die Expressionsschritte hier über die Transformation von 100 ng Plasmid-DNA begonnen und als Bakterienstamm BL21 (DE3) pLacI Zellen verwendet wurden. Die Inkubationszeit nach IPTG-Induktion betrug zwei Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Pellets nach der Ernte in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte bei -80 °C.

4.1.2.4 *pf H4*

Die Expression des Plasmodium falciparum Histon *pf H4* war weder in Testexpressionen (siehe Punkt 4.1.1.1 und Punkt 4.1.1.2) noch im präparativen Maßstab erfolgreich.

4.1.3 Präparation von inclusion bodies und Entfaltung der Proteine in den inclusion bodies

Die Präparation von inclusion bodies der Histone *pf H2A* und *pf HB* wurde von Regina Gröbner-Ferreira durchgeführt.

Nachdem die 1 Liter-Zellkulturen der präparativen Proteinexpression für *pf H2A*, *pf H2B* und *pf H3* abzentrifugiert, in Waschpuffer resuspendiert und schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden waren, waren sie bei -80 °C gelagert worden (siehe Punkt 4.1.2.1, Punkt 4.1.2.2 und Punkt 4.1.2.3). Im Folgenden wurde für alle drei Histone die Präparation der inclusion bodies durchgeführt. Dies geschah gemäß Punkt 3.3.4 und 3.3.5 des Methodenteils. Auf einem 17 %-SDS-Gel wurde das Vorhandensein der Proteine überprüft (Abbildung 17).

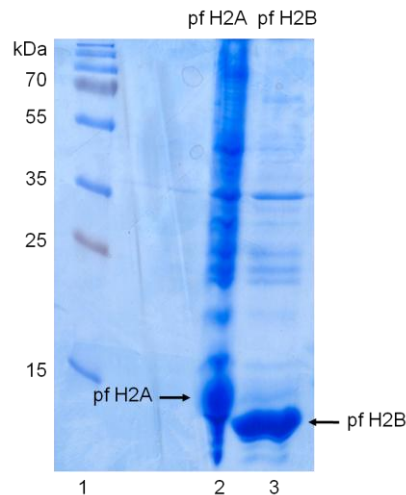


Abbildung 17: Analyse von pf H2A und pf H2B nach der Entfaltung der inclusion bodies (Abbildung von Regina Gröbner-Ferreira). Spur 1: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 10 μ l Probe nach Entfaltung der inclusion bodies von pf H2A, Spur 3: 10 μ l Probe nach Entfaltung der inclusion bodies von pf H2B; die Position der Histone auf dem Gel ist markiert; 17 % SDS-Gel, Färbung mit Coomassie Brilliant-Blue.

In Abbildung 17 wird sichtbar, dass sowohl für pf H2A, als auch für pf H2B das Protein durch die Präparation angereichert wurde (Gelbild für pf H3 nicht dargestellt).

4.1.4 Reinigung der Histone über Anionenaustausch-Chromatographie

Die Aufreinigung der Histone pf H2A und pf H2B wurde von Regina Gröbner-Ferreira durchgeführt.

Die Histone lagen zum Zeitpunkt vor Durchführung der Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Punkt 3.3.5) in SAU-200-Puffer gelöst vor. Bei der Ermittlung der ungefähren Konzentration jedes einzelnen Histons (siehe Punkt 3.2.4), um eine Überladung der Sepharosesäule mit Protein zu vermeiden (max. 15 mg), ergaben sich folgende Konzentrationen: pf H2A: 5 mg/ml, pf H2B: 2 mg/ml, pf H3: 7,8 mg/ml. Unlösliche Bestandteile in der Probe wurden vor dem Auftragen auf die Säule durch Zentrifugation (18000 rpm, 20 min, 4 °C) entfernt.

4.1.4.1 HPLC-Testläufe mit linearem Salzgradienten

Für pf H2A, pf H2B und pf H3 wurde zunächst mit je 1 ml der in SAU-200-Puffer gelösten Proteine ein Testlauf der Anionenaustausch-Chromatographie mit linear ansteigender Salzkonzentration (200 mM NaCl bis 1 M NaCl) durchgeführt, um die ideale Salzkonzentration für die Elution der Histone von der Säule herauszufinden (siehe Punkt 3.3.6). Die Elutionsprofile sowie die Analyse der Fraktionen zeigt Abbildung 18.

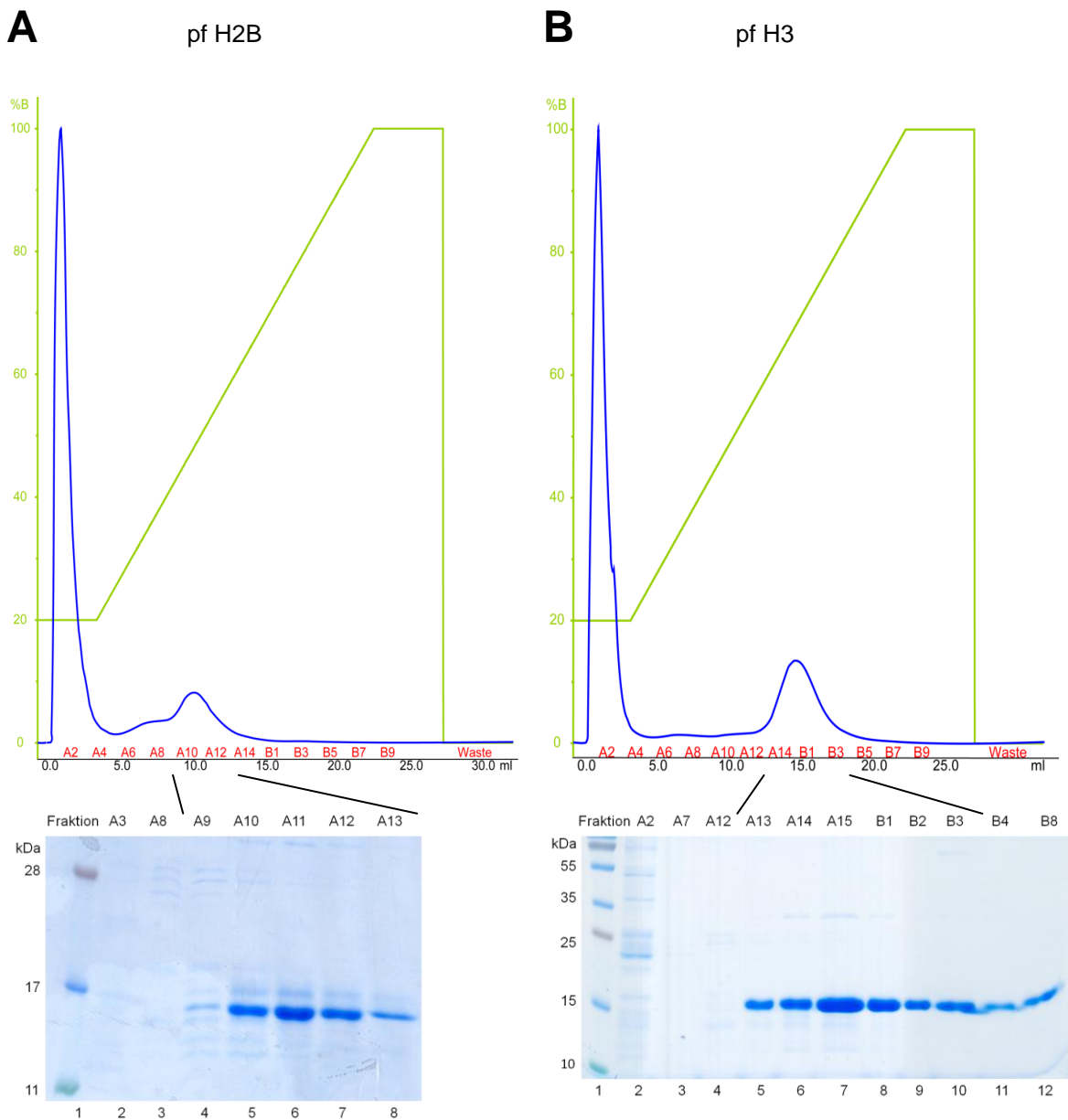


Abbildung 18: HPLC-Testläufe mit linearem Salzgradienten von pf H2B und pf H3. Salzkonzentration linear ansteigend von 200 mM NaCl auf 1 M NaCl, Daten für pf H2A nicht gezeigt; Y-Achse des Laufprofils: grün: Konzentration von Puffer B (entspricht SAU-1000 Puffer), X-Achse des Laufprofils: schwarz: Durchfluss durch die Säule in ml, rot: 1,5 ml Fraktionen des Durchflusses, Fotodetektion blau dargestellt; Gelbilder: Analyse der Fraktionen auf einem 17 % SDS-Gel, ausgewählte Fraktionen sind am oberen Bildrand aufgeführt und der Bezug zu den Laufprofilen ist markiert, Spur 1: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben; Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue. **A:** Linearer Testlauf pf H2B, Spur 2-8 auf dem Gel: Analyse der Fraktionen A3 und A8-A13. **B:** Linearer Testlauf pf H3, Spur 2-12 auf dem Gel: Analyse der Fraktionen A2, A7, A12-B4 und B8.

Im Vergleich der Aufzeichnungen der Anionenaustausch-Chromatographie mit den auf einem SDS-Gel aufgetrennten Fraktionen (Abbildung 18), konnte derjenige Peak in der Fotodetektion der Anionenaustausch-Chromatographie ermittelt werden, der der Eluti-

on der Histone von der Säule entspricht. Über die Fotodetektion konnte nun auf der Y-Achse diejenige Pufferkonzentration ermittelt werden, welche dem Beginn der Histone-Elution entspricht. Entsprechend wurde für die Aufreinigung im großen Maßstab mittels Stufengradienten für pf H2A (Daten nicht gezeigt) und pf H2B eine Konzentration von 450 mM NaCl ermittelt, für pf H3 eine Konzentration von 650 mM NaCl. Die Analysen der Elutionsfraktionen ergeben zudem einen hohen Reinheitsgrad der Histone (Spur 4-8 in Abbildung 18A, Spur 5-10 in Abbildung 18B), während Verunreinigungen der Proben als ungebundene Proteine in einem ersten Peak bei 200 mM NaCl im Durchfluss erscheinen (siehe Spur 2 in Abbildung 18A und 18B).

4.1.4.2 HPLC-Aufreinigung mittels Stufengradienten

Im Folgenden wurde die Aufreinigung der Histone im großen Maßstab über die Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß Punkt 3.3.6 des Methodenteils. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen auf einem 17 % SDS-Gel analysiert (Abbildung 19).

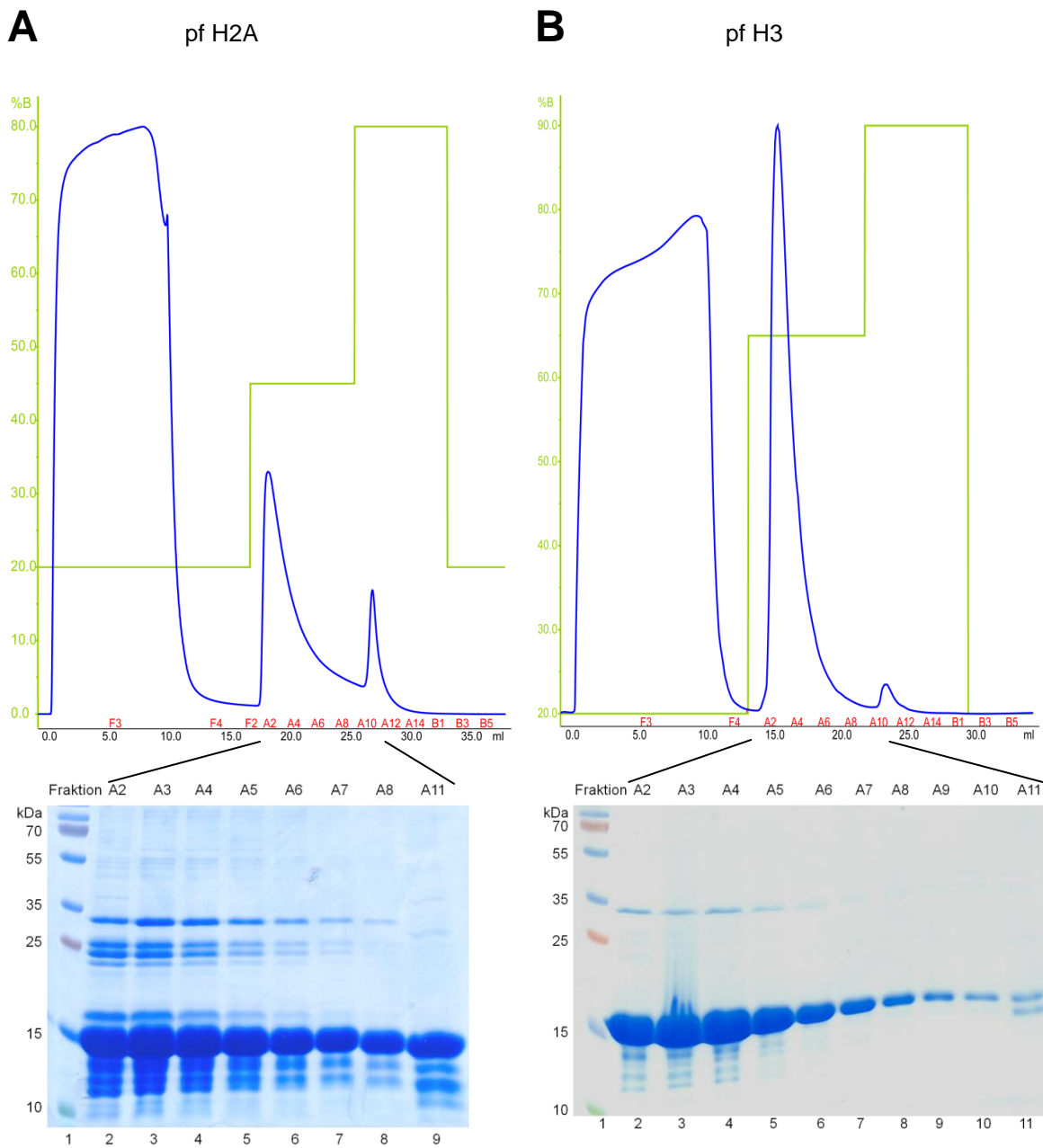


Abbildung 19: HPLC-Aufreinigung mittels Stufengradienten von pf H2A und pf H3. Salzkonzentration stufenförmig ansteigend von 200 mM NaCl auf 450 mM NaCl (pf H2A) bzw. auf 650 mM NaCl (pf H3); Y-Achse des Laufprofils: grün: Konzentration von Puffer B (entspricht SAU-1000 Puffer), X-Achse des Laufprofils: schwarz: Durchfluss durch die Säule in ml, rot: 1,5 ml Fraktionen des Durchflusses, Fotodetektion blau dargestellt; Gelbilder: Analyse der Fraktionen auf einem 17 % SDS-Gel, ausgewählte Fraktionen sind am oberen Bildrand aufgeführt und der Bezug zu den Laufprofilen ist markiert, Spur 1: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben; Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue. **A:** HPLC-Aufreinigung mittels Stufengradienten von pf H2A, Spur 2-9 auf dem Gel: Analyse der Fraktionen A2-A8 und A11. **B:** HPLC-Aufreinigung mittels Stufengradienten von pf H3, Spur 2-11 auf dem Gel: Analyse der Fraktionen A2-A11.

Entsprechend der Peaks im Elutionsprofil nach dem stufenförmigen Anstieg der Konzentration zeigt sich bei Analyse der Proteingele, dass die Histonproteine in reiner Form von der Säule eluiert werden konnten (Daten für pf H2B nicht gezeigt). Für die Weiterarbeit mit den aufgereinigten Histonen gemäß Punkt 3.3.6 des Methodenteils wurden die Histon-Fraktionen hoher Reinheit vereinigt. Die nach der Dialyse gegen bidestilliertes MQ H₂O ermittelten Histonkonzentrationen mittels Bradford-Test sowie das Gesamtvolumen und die Ausbeute der gewonnenen Histone insgesamt, zeigt Tabelle 12.

	Fraktionen	Gesamtvolumen	Histonkonzentration	Ausbeute
pf H2A	A2-A8	10,5 ml	5 mg/ml	52,5 mg
pf H2B	A2-A7	9,0 ml	2 mg/ml	18,0 mg
pf H3	A2-A8	10,5 ml	4,8 mg/ml	50,4 mg

Tabelle 11: Ausbeute der aufgereinigten Plasmodium falciparum Histone H2A, H2B und H3.

4.2 Rekonstitution und Gelchromatographie von Plasmodium falciparum Histonoktameren

Mit den aufgereinigten und gegen Wasser dialysierten Plasmodium Histonen pf H2A, pf H2B und pf H3 sollten Histonoktamere rekonstituiert werden. Da es in den durchgeführten Versuchen nicht gelungen war pf H4 zu exprimieren, wurde an Stelle dessen das humane Histon H4 verwendet (im Folgenden bezeichnet als „hs H4“). Das humane Histon H4 war durch Claudia Huber exprimiert und aufgereinigt worden.

Die Durchführung der Rekonstitution wurde gemäß Punkt 3.4 des Methodenteils durchgeführt. Nach dem Lösen der lyophilisierten Histone pf H2A, pf H2B, pf H3 und hs H4 in Entfaltungspuffer (siehe Punkt 2.8.4) und der nachfolgenden Dialyse gegen Faltungspuffer (siehe Punkt 2.8.4), wurde eine Gelchromatographie durchgeführt, um die während der Dialyse gegen Faltungspuffer entstandenen Histonoktamere von anderen hochmolekularen Aggregaten, (H3-H4)₂-Tetrameren, H2A-H2B-Dimeren und einzelnen Histonen zu trennen (Abbildung 20).

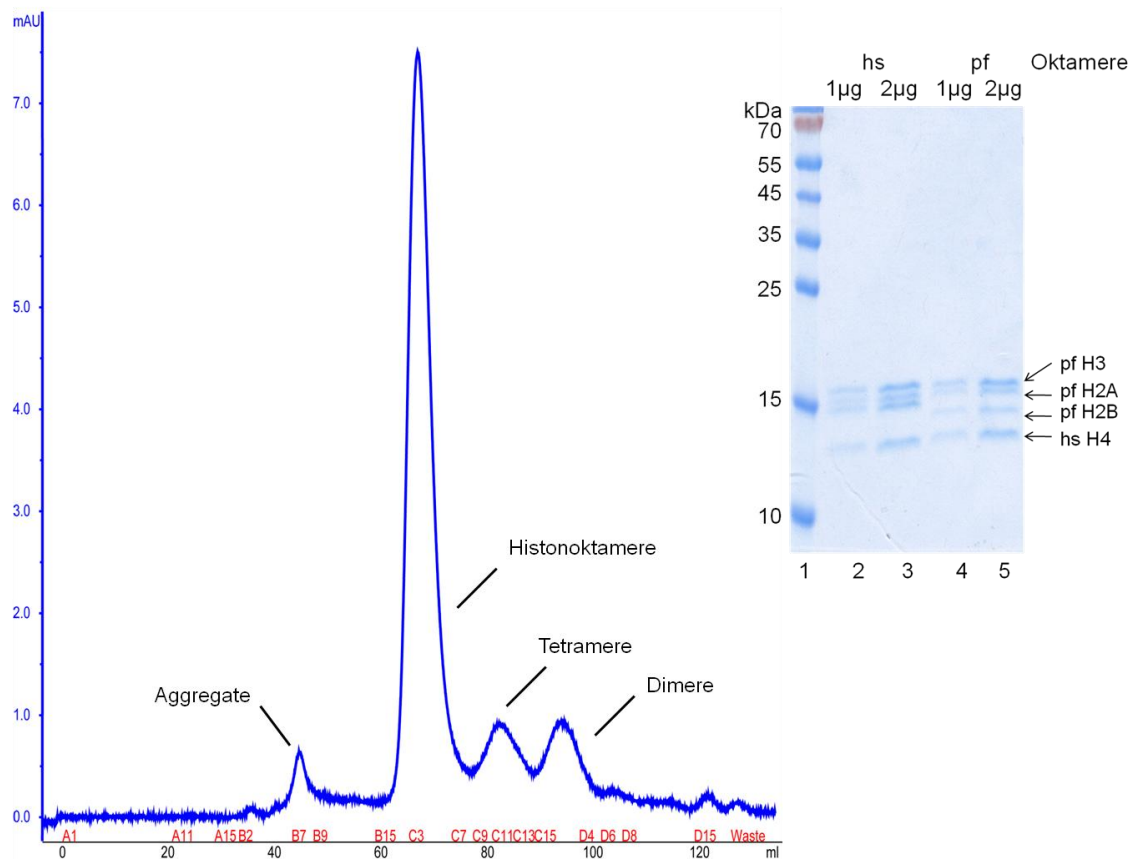


Abbildung 20: Laufprofil der Gelfiltration nach Rekonstitution von Plasmodium falciparum Histonoktameren. Y-Achse des Laufprofils: blau: mAU (milli-absorbance-units), X-Achse des Laufprofils: schwarz: Durchfluss durch die Säule in ml, rot: 1,5 ml Fraktionen des Durchflusses, Fotodetektion blau dargestellt; Gelbild: Humane Histonoktamere und Plasmodium falciparum Histonoktamere aufgetrennt auf einem 17 % SDS-Gel, die Histone sind am rechten Bildrand markiert, Spur 1: Protein-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben; Spur 2-3: humane Histonoktamere 1 µg bzw. 2 µg aufgetragen, Spur 4-5: Plasmodium falciparum Histonoktamere 1 µg bzw. 2 µg aufgetragen; Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

Im Laufprofil der Gelfiltration zeigt sich, dass hochmolekulare Aggregate etwa nach 45 ml Durchfluss die Säule passiert hatten, der Peak für die Histonoktamere begann bei ca. 65 ml, anschließend verließen Tetramere (ab 80 ml), Dimere (ca. 93 ml) sowie einzelne Histone (vermutlich ab ca. 120 ml) die Säule. Der Auswertung lag, wie in Punkt 3.4 des Methodenteils bereits erwähnt, eine Veröffentlichung von Luger et al. zu Grunde (Luger et al., 1997). Die Oktamer-Fractionen wurden zusammengeführt und mit Hilfe von Amicon Säulen (MWCO 10,000) auf eine Konzentration von 1 mg/ml aufkonzentriert. Die Analyse von 1 µg bzw. 2 µg Histonoktameren stellt alle 4 Histon-Banden deutlich dar. Hs H4 bildet, entsprechend der Analyse der Gelbilder, mit den Plasmodium Histonen H2A, H2B und H3 ein Histonoktamer.

4.3 Herstellung von DNA-Substraten für die Chromatin-Rekonstitution

Nachdem es gelungen war, unter Zuhilfenahme des humanen Histon H4, Histonoktameren zu rekonstituieren, sollte im folgenden Schritt Chromatin rekonstituiert werden. Dazu war zunächst die Herstellung einer ausreichenden Menge an DNA-Substraten erforderlich.

Als DNA-Substrat zur Untersuchung der Chromatindynamik sollte das artifizielle 601_*NotI* DNA Fragment dienen (Lowary und Widom, 1998, siehe Punkt 4.3.1), für den Vergleich der Positionierung von humanen und Plasmodium Histonoktameren zum einen das „Hsp 70 promoter fragment“ (Hamiche et al., 1999, siehe Punkt 4.3.2), zum anderen das „O2-40/-60 rDNA spacer promoter fragment“ (siehe Punkt 4.3.3). Die beiden letztgenannten DNA-Fragmente lassen die Positionierung eines Histonoktamers an verschiedenen Stellen zu. Schlussendlich sollte das „MMTV DNA-Fragment“ (Flaus und Owen-Hughes, 2003a, siehe Punkt 4.3.4) für die Untersuchung der Temperaturdynamik von Nukleosomen verwendet werden.

4.3.1 601_*NotI* DNA-Fragment

Das 601-DNA-Fragment, eine 200 bp lange DNA-Sequenz, die sich 12x in einem pUC 18 Plasmid befindet (siehe Punkt 2.11), zeigt eine starke Affinität für die Bindung von Histonoktameren (Lowary und Widom, 1998). Mit *NotI* aus dem Vektor geschnitten, zeichnen sich die randständigen 147 Basenpaare des 200 bp langen Fragments durch ihre hohe Affinität für Histonoktameren aus, so dass eine Positionierung während der Rekonstitution ausschließlich am Rand des Fragments stattfindet („601_*NotI* DNA-Fragment“).

Für die Herstellung einer größeren Menge des 601_*NotI* DNA-Fragments wurde das Plasmid zunächst in *E. coli* Bakterien vervielfältigt und isoliert (siehe Punkt 3.1.3), anschließend wurde das 200 bp lange Fragment mit *NotI* aus dem Vektor geschnitten (siehe Punkt 3.1.4), auf ein Agarose-Gel aufgetragen (siehe Punkt 3.1.5) und isoliert (siehe Punkt 3.1.6). Die isolierte 601_*NotI*-DNA wurde auf eine Konzentration von 0,5 ng/µl verdünnt und diente im Folgenden als Template für die PCR (siehe Punkt 3.1.8). Es wurden sowohl fluoreszente cy3- und cy5-Primer, als auch nicht-fluoreszente Primer eingesetzt (siehe Punkt 2.9), wobei für die Herstellung der fluoreszenten 601_*NotI* Fragmente nur ein Drittel der Menge des fluoreszenten Primers in der PCR verwendet wurde. Dies ist insofern wichtig, als die Bildung fluoreszent markierten DNA-Einzelsträngen minimiert werden soll, da diese über den Fluorescence Image Reader detektiert werden können. Die Ergebnisse der Test-PCR für zur Vervielfältigung fluoreszenter und nicht-fluoreszenter 601_*NotI* DNA-Fragmente zeigt Abbildung 21.

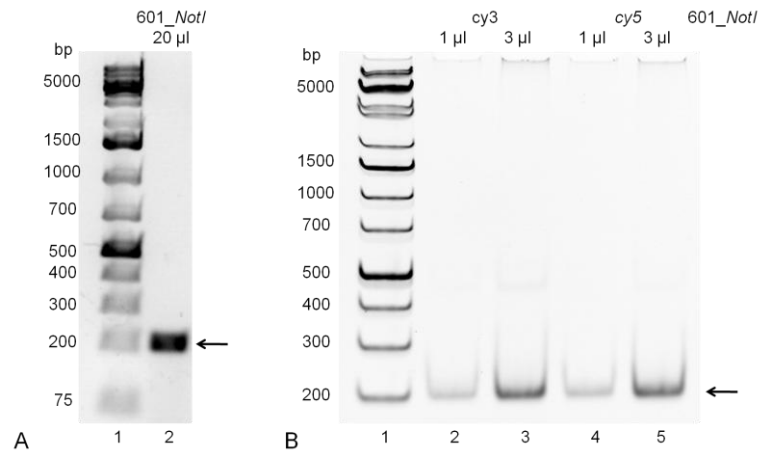


Abbildung 21: Test-PCR zur Vervielfältigung des 601_*NotI* DNA-Fragments. Nach der Test-PCR wurde das Ergebnis auf einem Agarose-Gel bzw. auf einem PAA-Gel überprüft. Die 200 bp großen DNA-Fragmente sind am rechten Bildrand mit einem Pfeil markiert. **A:** Verwendung nicht-fluoreszenter Primer, 1,3 % Agarose-Gel, SYBR-Safe-Zugabe, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 20 µl der Test-PCR aufgetragen. **B:** Verwendung fluoreszenter cy3 und cy5 Primer, 6 % PAA-Gel, ausgelesen über den Fluorescence Image Reader, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2-3: 1 µl bzw. 3 µl der mit cy3 Primern durchgeführten Test-PCR, Spur 4-5: 1 µl bzw. 3 µl der mit cy5 Primern durchgeführten Test-PCR.

Die Analyse der Test-PCR auf einem Agarose- bzw. PAA-Gel (Abbildung 21) zeigt eine deutliche Bande auf Höhe des 200 bp-Markers, eine Größe die der des 601_*NotI* DNA-Fragments entspricht. Die Bande ist klar abgegrenzt und es sind keine Nebenprodukte zu sehen. Es war zudem möglich, das PAA-Gel von Abbildung 21B über den Fluorescence Image Reader auszulesen. Insofern wurde im Folgenden die PCR im größeren Maßstab durchgeführt, wobei ein Volumen von 5000 µl eingesetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden zusammengeführt und erneut auf einem Agarose-Gel bzw. PAA-Gel auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend wurde eine DNA-Fällung mit Natriumacetat gemäß Punkt 3.1.9 des Methodenteils durchgeführt. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Hsp70 promoter DNA-Fragment

Das 359 bp große DNA-Fragment, das den Hsp70 Promoter von *Drosophila melanogaster* enthält, wird verwendet um die Positionierung von Histonoktamern auf einem DNA-Fragment zu untersuchen, das mehreren mögliche Positionen für Histonoktamere zulässt (Hamiche et al., 1999). Das in den Versuchen verwendete Hsp70 promoter Fragment war von Julia Rothammer mittels PCR vervielfältigt worden und lag in einer Konzentration von 1 µg/µl vor.

4.3.3 O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment

Das 308 bp große DNA-Fragment, das dem rDNA spacer promoter von *Mus musculus* vorgeschaltet ist, wurde verwendet um die Positionierung von Histonoktamern zu untersuchen, da es mehrere verschiedene Positionen für Histonoktamere zulässt. Das in den Versuchen verwendete O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment war von Julia

Rothammer mittels PCR vervielfältigt worden und lag in einer Konzentration von 1 µg/µl vor.

4.3.4 MMTV 3' LTR DNA-Fragment

Der MMTV-Promotor (MMTV: „mouse mammary tumor virus“) ist als Modell für die Untersuchung von Chromatin-Veränderungen während der Genaktivierung etabliert und enthält sechs Haupt-Nukleosomenpositionen A-F (Chen et al., 2006). Die Genaktivierung wird dabei über einen Glukokortikoid-Rezeptor vermittelt, was zu einer Rekrutierung des SWI/SNF-Komplex führt und insbesondere eine Veränderung der Nukleosomenpositionen NucA und NucB bewirkt (Pham et al., 2010; Chen et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das 275 bp-lange MMTV 3'LTR (LTR: “long terminal repeat“) DNA-Fragment verwendet (siehe Punkt 2.11), auf dem Histonoktamere vorzugsweise eine zentrale NucA Position einnehmen und dadurch beidseits von 64 bp des DNA-Fragments flankiert werden (Flaus und Owen-Hughes, 2003a). Das in den Versuchen verwendete MMTV Fragment war von Claudia Huber mittels PCR vervielfältigt worden und lag in einer Konzentration von 1 µg/µl vor.

4.4 In vitro Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse

4.4.1 Verwendung von Histonoktameren

Humane Histonoktamere waren von Claudia Huber im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2007) rekonstituiert worden. Sie wurden für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit von ihr übernommen.

4.4.1.1 Rekonstitution von Nukleosomen auf dem 601_NotI-DNA Fragment

Die Rekonstitution von Chromatin mit dem 601_NotI Fragment wurde gemäß Punkt 3.5 des Methodenteils durchgeführt. Wie beschrieben, musste zunächst das optimale Histonoktamer:DNA-Verhältnis ausfindig gemacht werden (Abbildung 22), bevor die Chromatin-Rekonstitution im größeren Maßstab durchgeführt werden konnte.

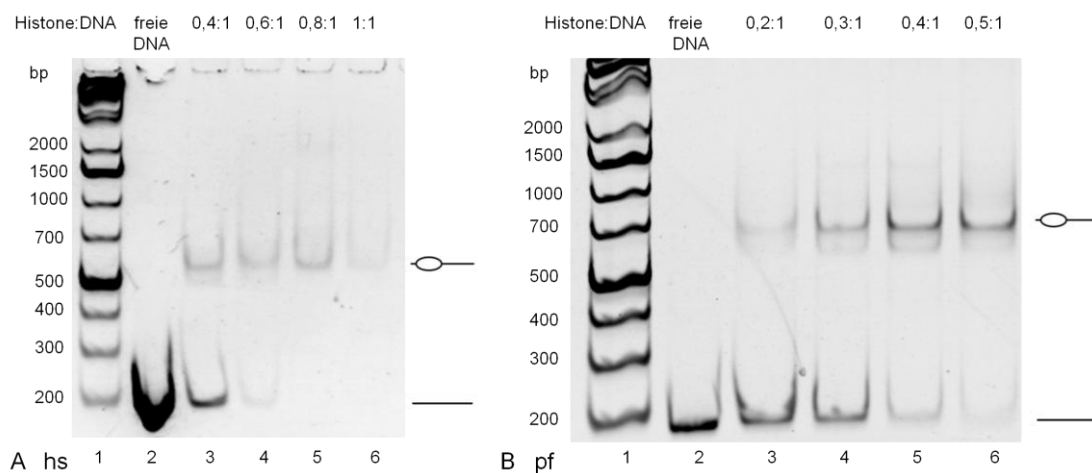


Abbildung 22: Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium 601_NotI-Nukleosomen. Nach dem Test-Assembly wurden je 500 ng der rekonstituierten Nukleosomen auf ein 5% bzw. 6% PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und über eine UV-Lampe detektiert. Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand ange-

geben, Spur 2: freie 601_ *NotI*-DNA, am rechten Bildrand sind die Positionen der Nucleosomen und der freien DNA markiert. **A:** humane nicht-fluoreszente 601_ *NotI*-Nucleosomen aufgetragen auf ein 5 % PAA-Gel, Spur 3-6: Histonoktamer:DNA-Verhältnisse von 0,4:1, 0,6:1, 0,8:1, 1:1. **B:** Plasmodium nicht-fluoreszente 601_ *NotI*-Nucleosomen aufgetragen auf ein 6 % PAA-Gel, Spur 3-6: Histonoktamer:DNA-Verhältnisse von 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1.

Die Test-Assemblys der Rekonstitution humaner (Abbildung 22A) und Plasmodium falciparum (Abbildung 22B) Nucleosomen auf dem 601_ *NotI*-DNA Fragment zeigen in beiden Fällen eine Abnahme der freien DNA sowie eine Zunahme der rekonstituierten Nucleosomen mit Zunahme der Menge an hinzugegebenen Histonoktameren (Spuren 3-6). Es ist somit möglich Plasmodium falciparum Nucleosomen zu rekonstituieren. Sie zeigen ein gleiches Laufverhalten wie humane Nucleosomen auf dem PAA-Gel. Die Nucleoprotein-Komplexe weisen eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel auf (siehe Markierung von Nucleosomen und DNA). Für die Nucleosomenrekonstitution im großen Maßstab wird das optimale Assembly-Verhältnis mit wenig freier DNA bei klaren Nucleosomenbanden anhand der Gelbilder ermittelt und abzüglich 20 % der Histon-Menge eingesetzt. Beispielsweise ist das Histonoktamer:DNA-Verhältnis in Spur 6 in Abbildung 22A deutlich zu hoch, da die Nucleosomenbande nicht mehr klar begrenzt ist, sondern nach oben verstreicht. Für die humanen Nucleosomen wurde ein Verhältnis von 0,6:1, für Plasmodium falciparum Nucleosomen von 0,5:1 als ideal angesehen.

Des Weiteren wurden Test-Assemblys für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium Histonoktameren auf fluorescent markierter 601_ *NotI*-DNA durchgeführt, ebenfalls nach Punkt 3.5 des Methodenteils (Abbildung 23). Die fluorescent-markierten Nucleosomen können auf dasselbe PAA-Gel aufgetragen und anschließend über den Image Reader, entsprechend den jeweiligen Wellenlängen, getrennt voneinander ausgelesen werden.

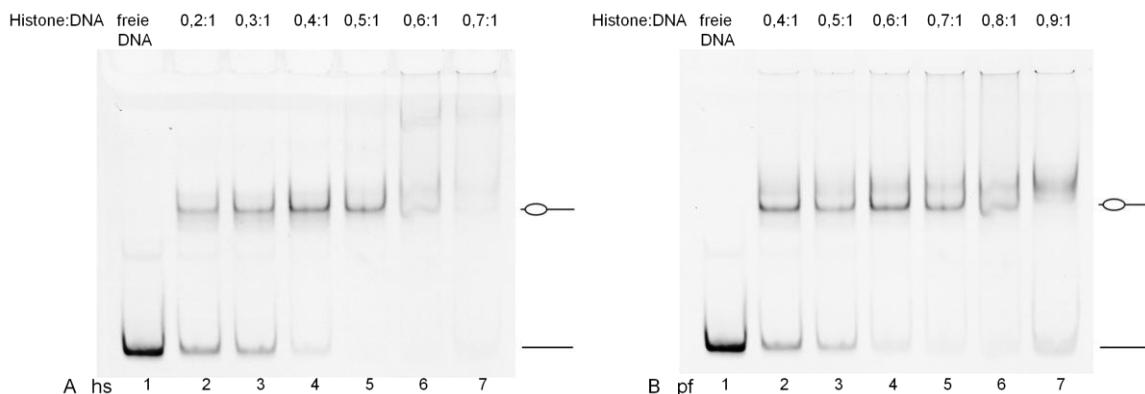


Abbildung 23: Test-Assembly für die Rekonstitution humaner cy3-601_ *NotI*-Nucleosomen und Plasmodium cy5-601_ *NotI*-Nucleosomen. Am rechten Bildrand sind die Positionen der Nucleosomen und der freien DNA markiert. Es wurden je 100 ng der rekonstituierten Nucleosomen auf ein 6% PAA-Gel aufgetragen und anschließend über den Fluorescence Image Reader ausgelesen. **A:** Rekonstitution humaner cy3-601_ *NotI*-Nucleosomen, Spur 1: 100 ng cy3- *NotI*-DNA, Spur 2-7: Histonoktamer:DNA-Verhältnisse von 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1. **B:** Rekonstitution von Plasmodium cy5-601_ *NotI*-Nucleosomen, Spur 1: 100 ng cy5- *NotI*-DNA, Spur 2-7: Histonoktamer:DNA-Verhältnisse von 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1.

Für die Rekonstitution fluoreszent markierten 601_*NotI*-Nukleosomen im größeren Maßstab wurde im Falle der humanen Nukleosomen mit einem Histonoktamer:DNA-Verhältnis von 4,5:1, im Falle der Plasmodium Nukleosomen mit einem Verhältnis von 0,6:1 weitergearbeitet. Es bleibt festzuhalten, dass die Plasmodium *falciparum* Histonoktamere weniger präzise positioniert erscheinen.

4.4.1.2 Rekonstitution von Nukleosomen auf dem Hsp70 promoter Fragment

Wie erwähnt, wurde das 359 bp große Hsp70 promoter Fragment für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium Nukleosomen gewählt, da es mehrere 147 bp-Sequenzen für die Positionierung von Histonoktameren aufweist. Dies erschien hilfreich, um die Positionierung von humanen und Plasmodium Histonoktameren zu vergleichen. Bei der Analyse der Nukleosomen auf einem nativen PAA-Gel gilt, dass mittig und randständig positionierte Nukleosomen ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen (siehe Punkt 3.7). Auch für die Nukleosomen-Rekonstitution auf dem Hsp70 DNA-Fragment wurde zunächst, nach Punkt 3.5 des Methodenteils, ein Test-Assembly mit humanen und Plasmodium Histonoktameren durchgeführt (Abbildung 24). Die rekonstituierten Nukleosomen werden im Folgenden als „humane Hsp70 Nukleosomen“ bzw. „Plasmodium Hsp70 Nukleosomen“ bezeichnet.

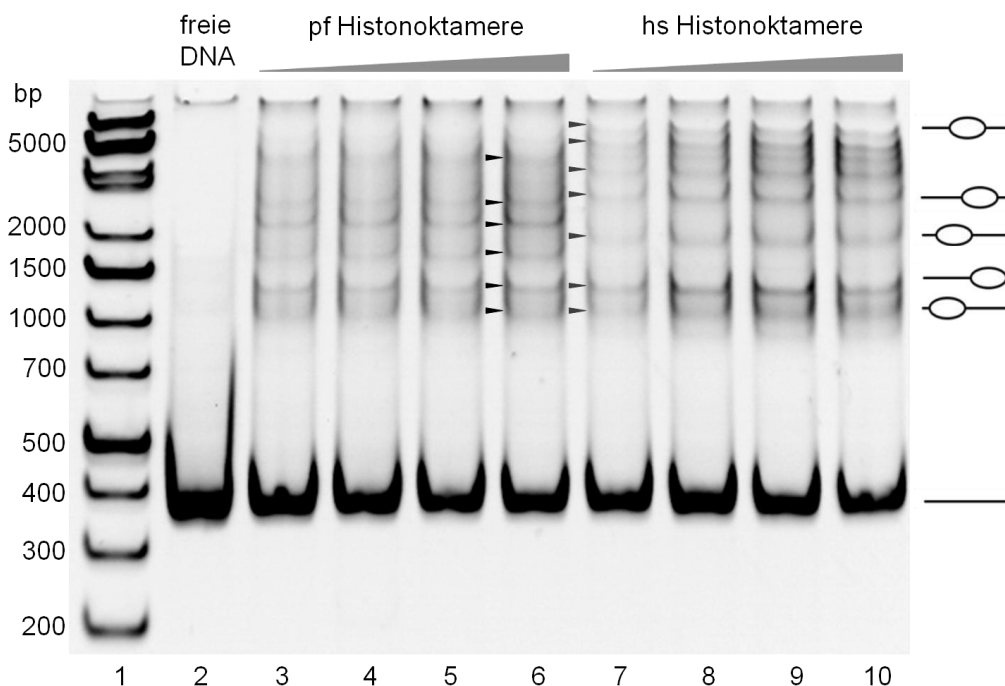


Abbildung 24: Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium Hsp70 Nukleosomen. Nach dem Test-Assembly wurden die mit verschiedenen Histonoktamer:DNA-Verhältnissen rekonstituierten Hsp70 Nukleosomen auf ein 5 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und anschließend über eine UV-Lampe detektiert, Nukleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng Hsp70 promoter DNA aufgetragen, Spur 3-6: rekonstituierte Plasmodium Hsp70 Nukleosomen, aufsteigende Histonoktamer:DNA-Verhältnisse: 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, je 300 ng der rekonstituierten Nukleosomen aufgetragen, Spur 6: die positionierten Histonoktamere sind exemplarisch an der linken Seite mit schwarzen Pfeilen markiert (►), Spur 7-10: rekonstituierte humane Hsp70 Nukleosomen,

aufsteigende Histonoktamer:DNA-Verhältnisse: 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, je 300 ng der rekonstituierten Nucleosomen aufgetragen, Spur 7: die positionierten Histonoktamere sind exemplarisch an der linken Seite mit grauen Pfeilen markiert (►).

Die Rekonstitution der Hsp70 promoter DNA (Spur 2) in Nucleosomen (Spur 3-10) ergab eine große Anzahl von zusätzlichen Banden auf dem nativen Gel, die Nucleosomen mit unterschiedlichen Positionen entsprechen. In Spur 6 und 7 sind die Nucleosomenbanden exemplarisch mit Pfeilen markiert. Im Vergleich zeigt sich, dass Plasmodium und humane Histonoktamere zum Teil unterschiedliche Positionen auf dem DNA-Fragment einnehmen, für eine genauere Beschreibung siehe Punkt 4.7.1 des Ergebnisteils.

Für lange DNA-Fragmente, die mehr als eine Position für Histonoktamere zulassen, ist es wichtig zu beachten, dass nicht mehr als 50 % an freier DNA für die Nucleosomen-Rekonstitution verbraucht wird. Höhere Histonoktamer:DNA-Verhältnisse könnten zur Bildung von Dimeren oder anderen unspezifischen Komplexen führen, was dem Vergleich der Positionierung und Nucleosomenverschiebung von humanen und Plasmodium Hsp70 Nucleosomen entgegen stünde. Für die nachfolgende Salzgradientdialyse im großen Maßstab wurde jeweils ein Histonoktamer:DNA-Verhältnis von 0,6:1 gewählt.

4.4.1.3 *Rekonstitution von Nucleosomen auf dem O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment*

Neben der Rekonstitution auf dem Hsp70 promoter DNA-Fragment wurde unter gleichen Bedingungen die Rekonstitution von Nucleosomen auf dem 308 bp großen O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment durchgeführt. Die rekonstituierten Nucleosomen werden im Folgenden als „humane O2-40/-60 Nucleosomen“ bzw. „Plasmodium O2-40/-60 Nucleosomen“ bezeichnet.

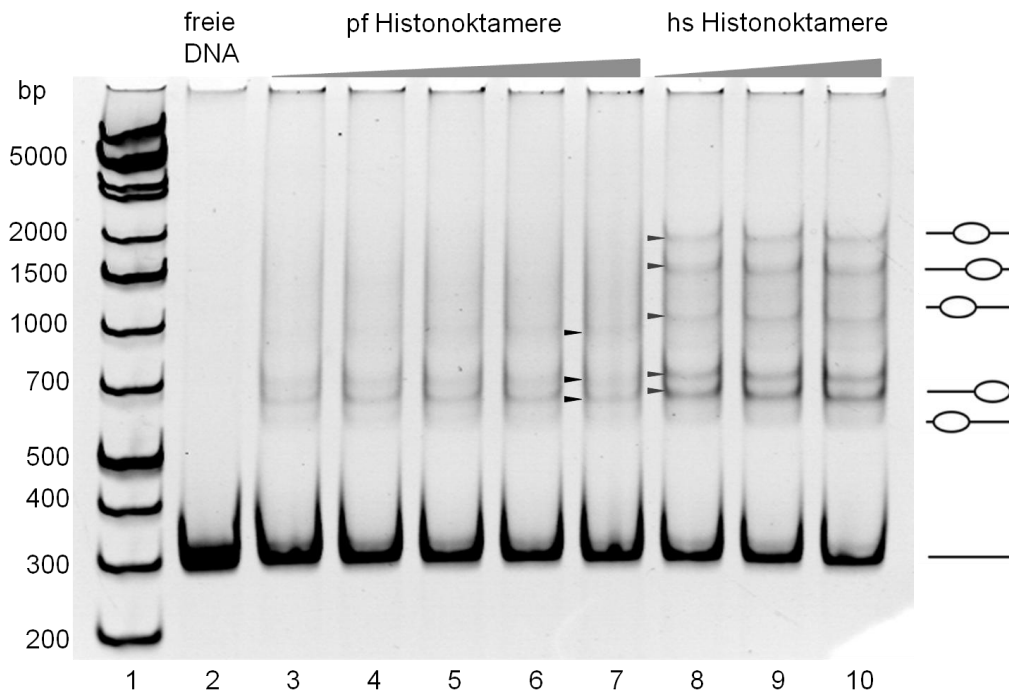


Abbildung 25: Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium O2-40/-60 Nucleosomen. Nach dem Test-Assembly wurden die mit verschiedenen Histonektamer:DNA-Verhältnissen rekonstituierten O2-40/-60 Nucleosomen auf ein 5 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und anschließend über eine UV-Lampe detektiert, Nucleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng O2-40/-60 DNA aufgetragen, Spur 3-7: rekonstituierte Plasmodium O2-40/-60 Nucleosomen, aufsteigende Histonektamer:DNA-Verhältnisse: 0,2:1, 0,25:1, 0,3:1, 0,35:1, 0,4:1, je 300 ng der rekonstituierten Nucleosomen aufgetragen, Spur 7: die positionierten Histonektamere sind exemplarisch an der linken Seite mit schwarzen Pfeilen markiert (►), Spur 8-10: rekonstituierte humane O2-40/-60 Nucleosomen, aufsteigende Histonektamer:DNA-Verhältnisse: 0,3:1, 0,35:1, 0,4:1, je 300 ng der rekonstituierten Nucleosomen aufgetragen, Spur 8: die positionierten Histonektamere sind exemplarisch an der linken Seite mit grauen Pfeilen markiert (►).

Die Rekonstitution von O2-40/-60 Nucleosomen (Spur 3-10) ergab im Falle der humanen Nucleosomen (Spur 8-10) mehrere klare Banden auf dem Gel, die Nucleosomen mit unterschiedlichen Positionen entsprechen. Diese sind in Spur 8 exemplarisch mit Pfeilen markiert. Im Hinblick auf die Plasmodium Nucleosomen (Spur 3-7) zeigte sich, dass diese sich anders verhalten und weniger scharfe Banden als die humanen Nucleosomen präsentieren. In Spur 7 sind die angedeuteten Banden mit Pfeilen markiert. Dieses Verhalten könnte damit erklärt werden, dass Plasmodium Histonektamere keine definierten Positionen auf diesem DNA-Fragment einnehmen oder indem die rekonstituierten Nucleosomen weniger stabil sind, und ein sogenanntes „breathing“ aufweisen, bei dem sich die DNA teilweise vom Nucleosom ablösen kann. Die Rekonstitution von Plasmodium O2-40/-60 Nucleosomen wurde mehrfach wiederholt, wobei stets dasselbe Ergebnis zu verzeichnen war. Für die Weiterarbeit wurden jeweils Histonektamer:DNA-Verhältnisse von 0,3:1 gewählt, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Menge an freier O2-40/-60 DNA vorhanden ist.

4.4.1.4 Rekonstitution von Nukleosomen auf dem MMTV DNA-Fragment

Das MMTV DNA-Fragment wurde ebenso für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium Nukleosomen verwendet (Abbildung 26). Auch dieses DNA-Fragment lässt die Positionierung von Histonoktameren an mehreren Stellen zu. Die Nukleosomen werden im Folgenden als „humane MMTV Nukleosomen“ bzw. „Plasmodium MMTV Nukleosomen“ bezeichnet.

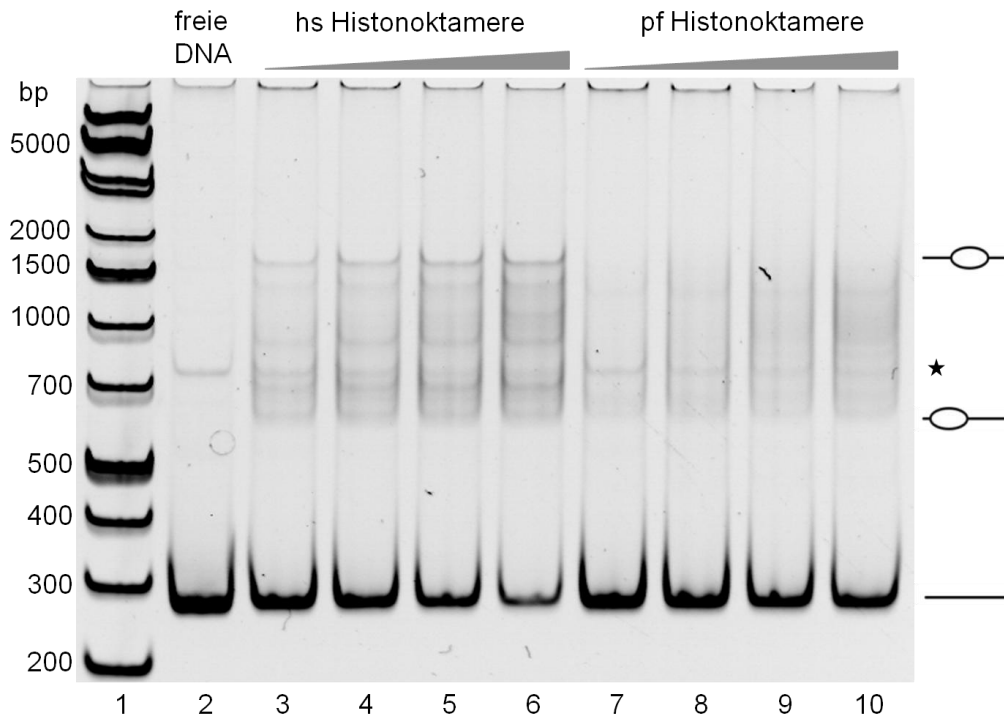


Abbildung 26: Test-Assembly für die Rekonstitution von humanen und Plasmodium MMTV Nukleosomen. Nach dem Test-Assembly wurden die mit verschiedenen Histonoktamer:DNA-Verhältnissen rekonstituierten MMTV Nukleosomen auf ein 5 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und anschließend über eine UV-Lampe detektiert, Nukleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert, eine Verunreinigung der DNA ist mit einem Stern (★) am rechten Bildrand markiert; Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng MMTV DNA aufgetragen, Spur 3-6: rekonstituierte humane MMTV Nukleosomen, aufsteigende Histonoktamer:DNA-Verhältnisse: 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, je 300 ng der rekonstituierten Nukleosomen aufgetragen, Spur 7-10: rekonstituierte Plasmodium MMTV Nukleosomen, aufsteigende Histonoktamer:DNA-Verhältnisse: 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, je 300 ng der rekonstituierten Nukleosomen aufgetragen.

Normalerweise wird auf diesem DNA-Fragment vor allem die zentrale nucA von Histonoktameren besetzt, was der obersten Nukleosomenbande entspricht. Diese Position wird jedoch von Plasmodium Histonoktameren nicht eingenommen. Wie schon im Fall der Plasmodium O2-40/-60 Nukleosomen (siehe Punkt 4.4.1.3) ist hier die Interpretation der Nukleosomenposition schwierig, da nur begrenzt definierte Banden ausgemacht werden können. Für die Weiterarbeit wurde jeweils ein Histonoktamer:DNA-Verhältnis von 0,4:1 gewählt.

4.5 Temperaturverhalten humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen

4.5.1 Temperaturdynamik von MMTV Nukleosomen

Um das Temperaturverhalten humaner und Plasmodium MMTV Nukleosomen (Assembly siehe Punkt 4.4.1.4) auf ihre temperaturinduzierte Mobilität hin zu untersuchen, wurden die Nukleosomen, wie in Punkt 3.7 des Methodenteils beschrieben, bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (Abbildung 27).

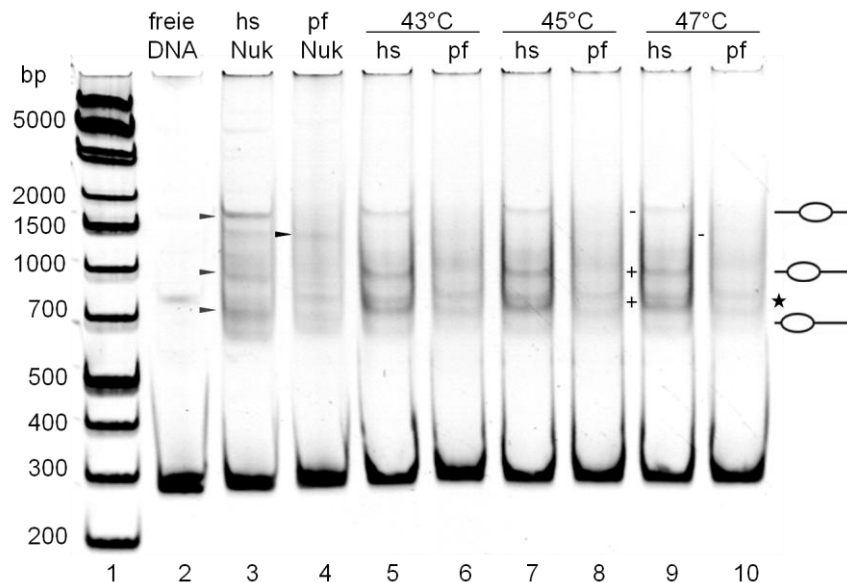


Abbildung 27: Temperaturinduzierte Mobilität von humanen und Plasmodium MMTV Nukleosomen. Analyse der Nukleosomenpositionen nach zwei-stündiger Inkubation bei den angegebenen Temperaturen auf einem 5%igen PAA-Gel, Färbung mit EtBr, Detektion über eine UV-Lampe, Nukleosomenpositionen und freie DNA am rechten Bildrand markiert, eine Verunreinigung der DNA ist mit einem Stern (★) am rechten Bildrand markiert; Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 400 ng MMTV-DNA, Spur 3: 400 ng hs MMTV Nukleosomen, prominente Banden sind links mit einem grauen Pfeil (◄) markiert, Spur 4: 400 ng pf MMTV Nukleosomen, prominente Bande links mit einem schwarzen Pfeil (◄) markiert, Spur 5-6: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 43 °C inkubiert, Spur 7-8: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 45 °C inkubiert, Spur 9-10: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 47 °C inkubiert, verstärkte bzw. abgeschwächte Nukleosomenbanden (Vergleich Spur 3 und 4), sind links mit einem Plus- (+) bzw. Minus-Zeichen (-) markiert.

Durch die Inkubation bei 43-47 °C verändert sich die Positionierung von humanen und Plasmodium MMTV Nukleosomen (Abbildung 27). Die humanen Nukleosomen nehmen zunächst bevorzugt die zentrale *nucA* Position auf dem DNA-Fragment ein, nach der Inkubation positionieren sie sich hingegen verstärkt an randständige Positionen. Die Analyse des Verhaltens von Plasmodium Nukleosomen ist schwieriger zu beurteilen, da sich nur begrenzt klar definierte Nukleosomenbanden ausmachen lassen (vgl. Punkt 4.4.1.4) und sich die Ausgangspositionen von hs und pf MMTV Nukleosomen nicht entsprechen. Im Folgenden wurde das Temperaturverhalten daher mit Hilfe von 601_NotI Nukleosomen untersucht, da hier dieselben Startbedingungen vorliegen.

4.5.2 Hitzestabilität von 601_*NotI* Nukleosomen

Die Rekonstitution von 601_*NotI* Nukleosomen war in Punkt 4.4.1.1 des Ergebnisteils beschrieben worden. Nach Punkt 3.6.2 des Methodenteils wurden nun je 300 ng humane und Plasmodium 601_*NotI* Nukleosomen bei 46 °C, 50 °C, 54 °C sowie 58 °C inkubiert (Abbildung 28A) sowie, bei 58 °C, verschiedenen Inkubationszeiten ausgesetzt (Abbildung 28B).

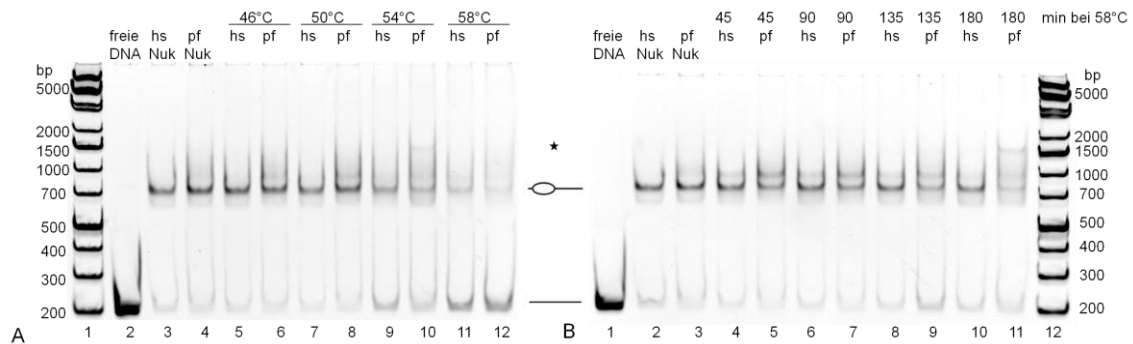


Abbildung 28: Hitzestabilität von 601_*NotI* Nukleosomen. **A:** Untersuchung des Temperaturverhaltens von 601_*NotI* Nukleosomen bei verschiedenen Temperaturen. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte für 4 h und bei den jeweils angegebenen Temperaturen zwischen 46 °C und 58 °C. Die Ansätze wurden auf ein 6 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und mittels einer UV-Lampe detektiert. Nukleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert; Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng 601_*NotI* DNA, Spur 3,4: 300 ng hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen aufgetragen, Spuren 5-12: 20 µl Reaktionsansatz aufgetragen, Spur 5,6 hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 46 °C inkubiert, Spur 7,8: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 50 °C inkubiert, Spur 9,10: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 54 °C inkubiert, zusätzlich sichtbare Bande in Spur 10 am rechten Bildrand mit einem Stern markiert (*), Spur 11,12: hs bzw. pf Reaktionsansätze bei 58 °C inkubiert. **B:** Untersuchung des Temperaturverhaltens von 601_*NotI* Nukleosomen bei 58 °C und verschiedenen Inkubationszeiten zwischen 45 und 180 min. Die Ansätze wurden auf ein 6 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und über eine UV-Lampe detektiert. Nukleosomenpositionen und freie DNA am linken Bildrand markiert, Spur 1: 300 ng 601_*NotI* DNA, Spur 2,3: 300 ng hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen aufgetragen, Spur 4-11: 20 µl Reaktionsansatz aufgetragen: Spur 4,5: hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen 45 min inkubiert, Spur 6,7: hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen 90 min inkubiert, Spur 8,9: hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen 135 min inkubiert, Spur 10,11: hs bzw. pf 601_*NotI* Nukleosomen 180 min inkubiert, zusätzlich sichtbare Bande in Spur 11 am linken Bildrand mit einem Stern markiert (*) Spur 12: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am rechten Bildrand angegeben.

Die in Abbildung 28A dargestellten Nukleosomen wurden bei verschiedenen Temperaturen und gleicher Zeitdauer inkubiert. Sie zeigen bei 54 °C und 58 °C ein verändertes Verhalten im Gel. Dies zeigt sich in einer Abschwächung der Bande der Nukleosomen (Spur 9-12) bei gleichzeitiger Zunahme der Menge freier 601_*NotI* DNA. Die Inkubation bei höheren Temperaturen führt zu einem Stabilitätsverlust der Nukleosomen, die Einheit aus Histonoktamer und DNA zerfällt. In Spur 10 ist außerdem eine zusätzliche Bande oberhalb der Nukleosomenbande zu sehen. Im nächsten Schritt (Abbildung 28B) wurde die Veränderung der Nukleosomenpositionen bei verschiedenen Inkubationszeiten zwischen 45 bis 180 Minuten und einer konstanten Temperatur von 58 °C beobachtet. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Stabilität in den Zeiträu-

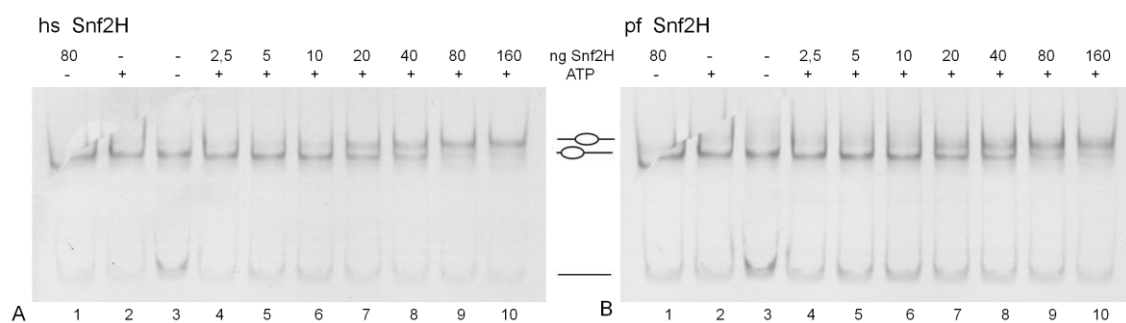
men zwischen 135 und 180 Minuten. In den Spuren 4-7 lassen sich kaum Veränderungen gegenüber den nicht-inkubierten Nukleosomen ausmachen, mit Ausnahme der Tatsache, dass insbesondere über der Plasmodium Nukleosomenbande, aber auch oberhalb der humanen Nukleosomenbande, ein weiteres schwaches Signal zu sehen ist. Für die humane Nukleosomenbande gilt diese Beschreibung auch bei der Inkubation für 135 bzw. 180 Minuten (Spur 8 und 10), so dass sich grundsätzlich keine Veränderung der Nukleosomenbande oder der Bande der freien 601_*NotI* DNA im Verlauf der Inkubation bei 58 °C erkennen lässt. Die Plasmodium Nukleosomen zeigen dagegen bei längerer Inkubationsdauer (Spur 9 und 11) in Spur 9 eine Zunahme der Bandenstärke der freien DNA sowie, in Spur 11, eine abgeschwächte Nukleosomenbande sowie eine neue schwache Bande (mit Stern markiert, vgl. auch Abbildung 28A).

4.6 Remodeling Maschinen abhängige Dynamik von Plasmodium falciparum Nukleosomen

Chromatin-Remodeling-Maschinen verschieben in Zellen Histonoktamere in einem ATP-abhängigen Prozess, so dass Nukleosomen ihre Position verändern können. Über die Durchführung von Remodeling-Reaktionen sollte untersucht werden, ob Remodeling Maschinen auch die Position von Plasmodium Nukleosomen verändern können.

Für die Untersuchung der Dynamik humaner und Plasmodium Nukleosomen wurde mit fluoreszent markierten hs cy3- bzw. pf cy5 601_*NotI* Nukleosomen gearbeitet (Assembly siehe Punkt 4.4.1.1). Die Remodeling-Reaktion beider Nukleosomen konnte im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt werden, da das Auslesen der PAA-Gele bei verschiedenen Wellenlängen mit dem Fluorescence Image Reader erfolgte. Durch die identischen Reaktionsbedingungen war eine Vergleichbarkeit der Dynamik von hs und pf Nukleosomen gegeben.

Die Analyse der Dynamik erfolgte gemäß den Beschreibungen aus Punkt 3.7 des Methodenteils mit den Chromatin-Remodeling-Maschinen Snf2H, CHD1, CHD3 und CHD4 (Abbildung 29).



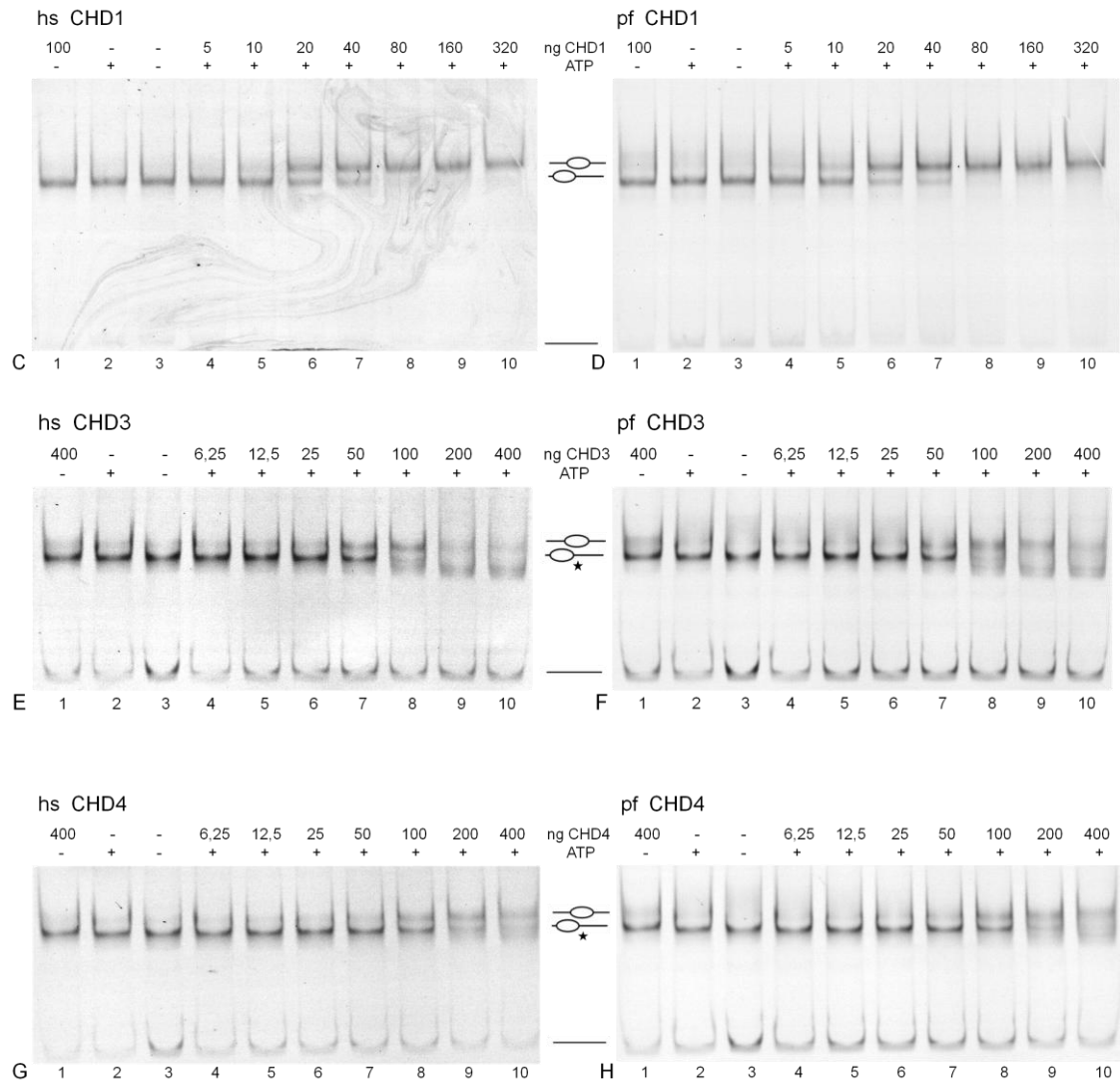


Abbildung 29: Remodeling-Reaktionen mit humanen cy3- bzw. Plasmodium cy5 601_NotI Nucleosomen und Snf2H, CHD1, CHD3 und CHD4. Inkubation des Reaktionsansatzes mit je 75 ng Nucleosomen bei 26 °C für 90 Minuten, Zugabe von 200-300 ng Kompetitor-DNA zum Abstoppen der Reaktion, Ansätze auf ein 6 % PAA-Gele aufgetragen und über den Fluorescence Image Reader ausgelesen, Nucleosomenpositionen und freie DNA sind mittig markiert, eine zusätzliche Bande ist mit einem Stern versehen (*), CRM: Chromatin-Remodeling-Maschine, Spur 1: Negativkontrolle: Reaktionsansatz ohne ATP, mit ausreichender Menge an CRM, Spur 2: Negativkontrolle: Reaktionsansatz mit 1 mM ATP, ohne CRM, Spur 3: Reaktionsansatz ohne ATP, ohne CRM, Spuren 4-10: Reaktionsansatz mit 1 mM ATP sowie mit aufsteigenden Mengen an CRM, Mengenangaben am oberen Bildrand markiert. **A:** Snf2H und hs cy3 601_NotI Nucleosomen. **B:** Snf2H und pf cy5 601_NotI Nucleosomen. **C:** CHD1 und hs cy3 601_NotI Nucleosomen. **D:** CHD1 und pf cy5 601_NotI Nucleosomen. **E:** CHD3 und hs cy3 601_NotI Nucleosomen. **F:** CHD3 und pf cy5 601_NotI Nucleosomen. **G:** CHD4 und hs cy3 601_NotI Nucleosomen. **H:** CHD4 und pf cy5 601_NotI Nucleosomen.

Das Prinzip der Nucleosomenverschiebung durch Chromatin-Remodeling-Enzyme und die Analyse von Remodeling-Reaktion auf einem PAA-Gel wurde in Punkt 3.7 des Methodenteils beschrieben (siehe Abbildung 14).

Die PAA-Gele von Abbildung 29 machen deutlich, dass die Position von Plasmodium Nukleosomen, trotz der großen Sequenzabweichung der pf Histone, durch Chromatin-Remodeling-Maschinen verändert werden kann (siehe 29B, 29D, 29F und 29G). Plasmodium 601_*NotI* Nukleosomen nehmen, bei ausreichender Menge an Enzym, eine mittige Position auf dem DNA-Fragment ein. Im Vergleich von humanen und Plasmodium Nukleosomen zeigt sich zudem, dass die Verschiebung der Nukleosomen gleich schnell, das heißt, bei vergleichbaren Mengen an hinzugegebenem Remodeling-Enzym, erfolgt.

So genügen beispielsweise im Falle von Snf2H (Abbildung 29A und 29B) 40 ng an Remodeling-Enzym, um jeweils die Hälfte der hs und pf Nukleosomen die mittige Nukleosomenposition einnehmen zu lassen.

Ab einer Zugabe von 100 ng CHD1 (Abbildung 29C und 29D) ist bei hs und pf Nukleosomen eine weitere Bande, unterhalb der Bande der randständigen Nukleosomen, auszumachen (★). Diese nimmt in den Spuren 9 und 10 an Stärke zu. Bei der Remodeling-Reaktion mit CHD4 (Abbildung 29G und 29H) ist diese Bande ebenfalls zu sehen (Spur 10), allerdings schwächer als bei CHD3.

4.7 Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen auf DNA-Fragmenten mit mehreren Nukleosomenpositionen

Unterschiedliche Nukleosomen werden, abhängig von der Chromatin-Remodeling-Maschine, unterschiedlich positioniert (Rippe et al. 2007). Es sollte nun untersucht werden, wie sich Plasmodium Histonoktamere auf einem DNA-Fragment positionieren, das mehrere mögliche Sequenzen dafür enthält bzw. wie diese, im Vergleich zu humanen Nukleosomen, durch Snf2H verändert werden.

Dafür wurden hs bzw. pf Hsp70 und O2-40/-60 Nukleosomen verwendet (Rekonstitution siehe Punkt 4.4.1.2 und 4.4.1.3). Auf die unterschiedliche Besetzung von Positionen auf dem MMTV Fragment wurde bereits eingegangen (siehe Punkt 4.4.1.4 und 4.6.1).

4.7.1 Hsp70 promoter Fragment

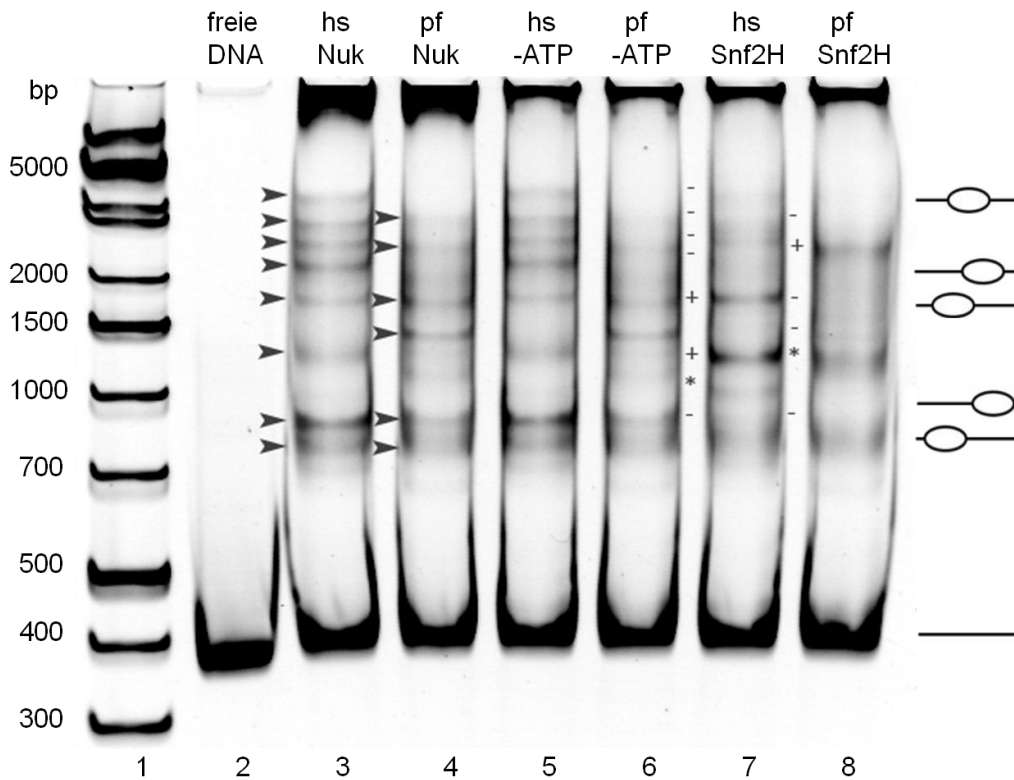


Abbildung 30: Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium Nucleosomen auf dem Hsp70 promoter Fragment. Rekonstituierte Nucleosomen und Reaktionsansätze wurden auf ein 6 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und über eine UV-Lampe detektiert, die Remodeling-Reaktionen (Spuren 7-8) wurden mit je 300 ng hs und pf Nucleosomen, 1 mM ATP und 200 ng Snf2H durchgeführt, die Inkubation erfolgte für 60 min bei 26 °C, das Abstoppen der Reaktion mit 300 ng Kompetitor-DNA (Negativkontrollen Spuren 5-6), Nucleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng Hsp70 DNA, Spuren 3-4: 300 ng hs bzw. pf Hsp70 Nucleosomen aufgetragen, Nucleosomenbanden links der Spuren mit einem Pfeilkopf markiert (▶), Spuren 5-6: Negativkontrollen, Remodeling-Reaktionen von hs und pf Nucleosomen ohne ATP, mit 200 ng Snf2H durchgeführt, Spuren 7-8: Remodeling-Reaktionen von hs und pf Nucleosomen, verstärkte bzw. abgeschwächte Nucleosomenbanden (Vergleich Spuren 3-4), sind links mit einem Plus- (+) bzw. Minus-Zeichen (-) markiert, neu aufgetretene Banden mit einem Stern (*)

Plasmodium Histonoktamere besetzten, im Vergleich zu humanen Histonoktameren, andere Positionen auf dem Hsp70 Fragment und werden durch Snf2H an unterschiedliche Positionen verschoben (Abbildung 30).

Die Positionierung auf dem Hsp70 DNA-Fragment (Spuren 3 und 4) zeigt dabei folgendes: die oberste Nucleosomenbande von Spur 3 findet in Spur 4 kein Korrelat. Auch die folgenden, dicht untereinander liegenden hs Nucleosomenbanden (Spur 3) finden keine Entsprechung in Spur 4. Es können hier zwei schwächere Banden ausgemacht werden, die sich aber nicht eindeutig einer entsprechenden Höhe der Banden von Spur 3 zuordnen lassen. Der deutlichste Unterschied der Positionierung findet sich etwa auf Höhe des 1500 bp Markers. In Spur 3 zeigen sich zwei schwache Banden, in Spur 4

zwei deutliche Banden, wobei die untere kein Korrelat in Spur 3 findet. Zusammenfassend zeigen sich bei den aufgetragenen humanen und Plasmodium Hsp70 Nukleosomen sowohl Nukleosomenbanden auf gleicher Höhe, als auch Nukleosomenbanden, die in der jeweils anderen Spur keine Entsprechung finden oder sich in ihrer Stärke unterscheiden.

Die Remodeling Reaktion mit Snf2H (Spuren 7 und 8) zeigt zwischen hs und pf Nukleosomen deutliche Unterschiede im Muster der Nukleosomenbanden. Einerseits wurde sowohl bei den humanen, als auch bei den Plasmodium Reaktionsansätzen, eine neue Nukleosomenposition eingenommen, andererseits fand eine Umlagerung auf bereits vorbestehende Nukleosomenpositionen statt, was sich in der Zunahme oder Abnahme bestimmter Nukleosomenbanden äußert. Die Markierungen abgeschwächter, verstärkter oder neu aufgetretener Banden zeigen, dass humane Hsp70 Nukleosomen nach dem Remodeling vor allem zwei Positionen auf dem DNA-Fragment besetzten (mit einem + markiert) und eine neue Bande vorliegt (mit einem * markiert). Plasmodium Histonoktamere besetzen ebenso verstärkt zwei Positionen (mit + und * markiert). Die Plasmodium Nukleosomenbanden (Spur 8) wirken grundsätzlich undeutlicher und weniger klar begrenzt als humane Nukleosomenbanden (Spur 7).

4.7.2 O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment

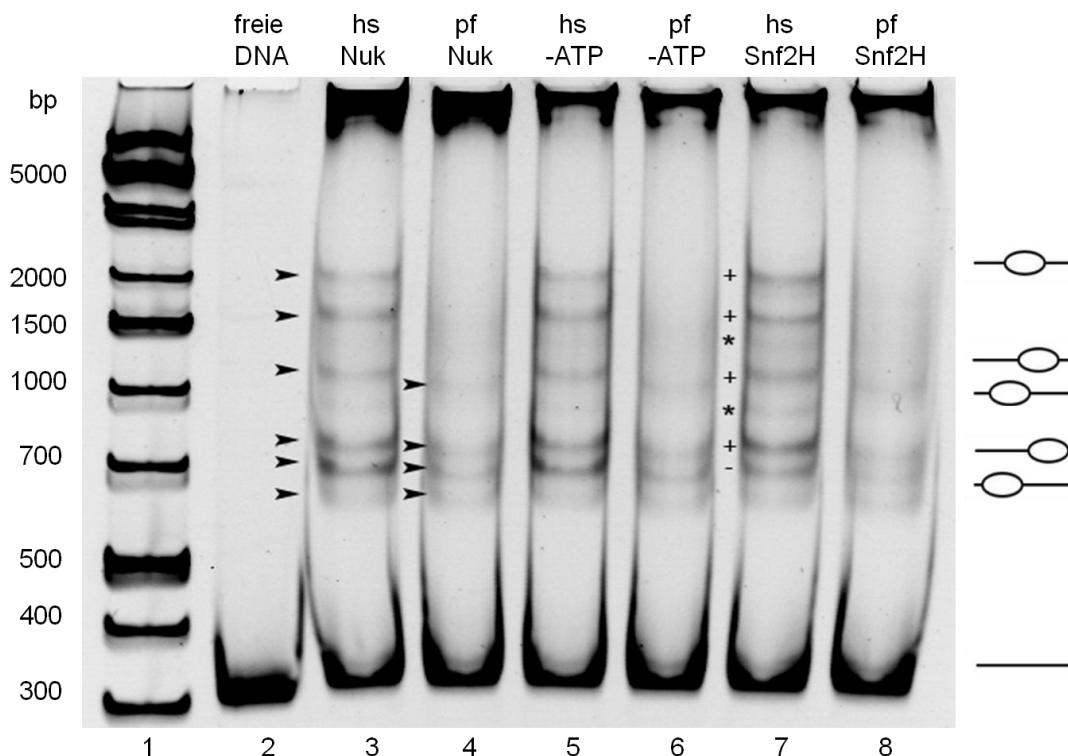


Abbildung 31: Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium Nukleosomen auf dem O2-40/-60 rDNA spacer promoter Fragment. Rekonstituierte Nukleosomen und Reaktionsansätze wurden auf ein 6 % PAA-Gel aufgetragen, mit EtBr gefärbt und über eine UV-Lampe detektiert, die Remodeling-Reaktionen (Spuren 7-8) wurden mit je 300 ng hs und pf Nukleosomen, 1 mM ATP und 200 ng Snf2H durchgeführt, die Inkubation erfolgte für 60 min bei 26 °C, das Abstoppen der Reaktion mit 300 ng Kompetitor-DNA (Negativkontrollen Spuren 5-6), Nukleosomenpositionen und freie DNA sind am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 300 ng

O2-40/-60 DNA, Spuren 3-4: 300 ng hs bzw. pf O2-40/-60 Nucleosomen aufgetragen, Nucleosomenbanden links der Spuren mit einem Pfeilkopf markiert (►), Spuren 5-6: Negativkontrollen, Remodeling-Reaktionen von hs und pf Nucleosomen ohne ATP, mit 200 ng Snf2H durchgeführt, Spuren 7-8: Remodeling-Reaktionen von hs und pf Nucleosomen, verstärkte bzw. abgeschwächte Nucleosomenbanden (Vergleich Spuren 3-4), sind links mit einem Plus- (+) bzw. Minus-Zeichen (-) markiert, neu aufgetretene Banden mit einem Stern (*).

Plasmodium Histonoktamere besetzten, im Vergleich zu humanen Histonoktameren, andere Positionen auf dem O2-40/-60 Fragment (Abbildung 31).

Die Markierungen der Nucleosomenbanden in Spur 3 und 4 zeigen, dass die pf Histonoktamere sich weniger klar auf diesem DNA-Fragment positionieren (siehe auch Punkt 4.4.1.3). Die drei unteren, randständigen Nucleosomenpositionen (Spuren 3 und 4) werden von hs und pf Histonoktameren besetzt. Im Falle der humanen Nucleosomen zeigen sich drei weitere definierte Banden oberhalb davon, für die Plasmodium Nucleosomen eine weitere, sehr schwache Bande. Die pf Nucleosomenbanden sind grundsätzlich weniger deutlich sichtbar und Spur 4 erscheint „verwischter“ als Spur 3.

Im Falle der Verschiebung humaner O2-40/-60 Nucleosomen (Spur 7) stellen sich die oberen drei der sechs prominenten Nucleosomenbanden von Spur 3 nun verstärkt dar, die zweitunterste Bande erscheint hingegen abgeschwächt. Außerdem sind mit einem Stern (*) nun zwei Banden markiert, die im Vergleich zu Spur 3 neu zu sehen sind. Die humanen O2-40/-60 Nucleosomen zeigen demzufolge, nach Zugabe und Inkubation mit Snf2H und ATP, ein verändertes Bandenmuster, wobei keine neuen Positionen eingenommen, jedoch bestimmte (mit einem + markierte) Positionen bevorzugt eingenommen wurden. Im Hinblick auf die Dynamik der Plasmodium O2-40/-60 Nucleosomen zeigt sich in Spur 8 dasselbe Bandenmuster wie in Spur 4. Die Beurteilbarkeit desselben bleibt jedoch durch die unklaren Nucleosomenpositionen eingeschränkt.

4.8 Rekonstruktion von Nucleosomen aus einzelnen Histonen

Wie bereits in Punkt 3.5.2 des Methodenteils beschrieben, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden ob es möglich ist, die Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse mit einzelnen Histonen an Stelle von Histonoktameren durchzuführen. Hierfür wurden zunächst Plasmodium Histonoktamere sowie einzelne Plasmodium Histone in definierten Mengen auf ein 17 % SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 32).

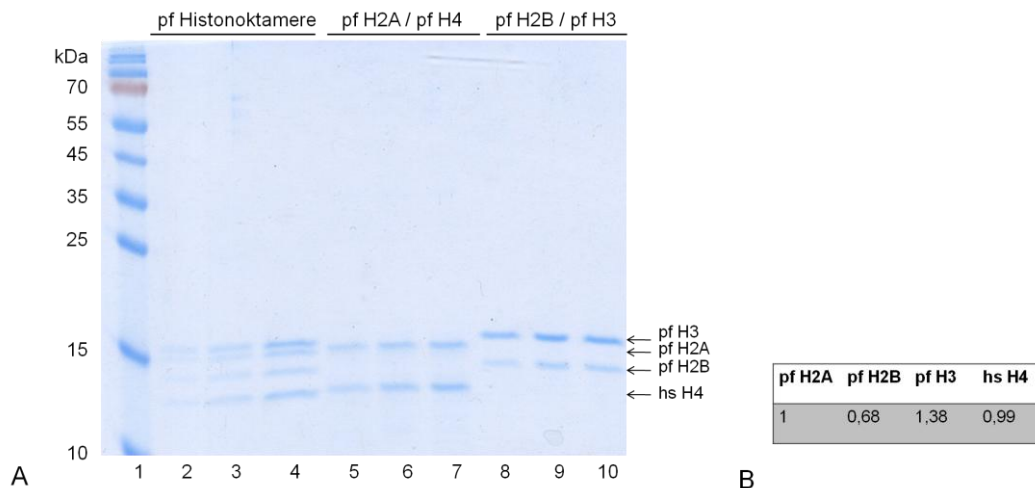


Abbildung 32: Plasmodium Histonoktamere und einzelne Plasmodium Histone aufgetragen auf ein 17 % SDS-Gel. A: 17 % SDS-Gel, Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue, die Position der Histone auf dem Gel ist am rechten Bildrand markiert, Spur 1: Protein-Größenstandard, zugehörigen Werte am linken Bildrand angegeben, Spuren 2-4: Plasmodium Histonoktamere aufgetragen: Spur 2: 500 ng, Spur 3: 1 μ g, Spur 4: 2 μ g; Spuren 5-10: einzelne Histone: Spur 5: 400 ng pf H2A und 400 ng hs H4, Spur 6: 500 ng pf H2A und 500 ng hs H4, Spur 7: 600 ng pf H2A und 600 ng hs H4, Spur 8: 400 ng pf H2B und 400 ng pf H3, Spur 9: 500 ng pf H2B und 500 ng pf H3, Spur 10: 600 ng pf H2B und 600 ng pf H3. **B:** Ergebnis des Vergleichs der Bandenstärken der einzelnen Histone über das Multi Gauge Programm, pf H2A als 1 gesetzt.

Für die Analyse auf einem SDS-Gel (Abbildung 32A) wurden die Histone (1 μ g/ μ l in H₂O) 1:5 bzw. 1:10 verdünnt und 400-600 ng der einzelnen Histone auf das Proteingel aufgetragen. Dabei war relevant, nur mit einem Gel zu arbeiten, da in der Auswertung über das Multi Gauge Programm die Stärken der Banden gemessen werden und die Hintergrundstärke des Gels von dieser Messung abgezogen wird. Insofern spielt beispielsweise die Intensität der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue bei den Berechnungen eine Rolle.

Zunächst wurden die Bandenstärken der Histonoktamere (Spur 2-4) über das Multi Gauge Programm gemittelt und die einzelnen Histone in ein Verhältnis zueinander gebracht, wobei pf H2A als 1 gesetzt wurde (Abbildung 32B). Des Weiteren wurden die Bandenstärken der einzelnen Histone ausgewertet und in Bezug zu den jeweils zugehörigen Bandenstärken der Histonoktamere gesetzt. Dies war von Bedeutung, um die Bildung von Aggregaten, durch stöchiometrische Ungenauigkeiten während der Salzgradientdialyse zu vermeiden.

Bei der Rekonstitution von Nukleosomen mit einzelnen Histonen wurde darauf geachtet, schon zu Beginn im Reaktionsansatz eine Salzkonzentration von 2 M NaCl zu erreichen (Verdünnung im herkömmlichen Ansatz durch in Wasser gelöste DNA, Histonoktamere und BSA), alles Weitere wurde gemäß Punkt 3.5 des Methodenteils durchgeführt. Das Test-Assembly mit 601_*NotI* DNA sowie die eingesetzten Mengen an Histonoktameren bzw. einzelnen Histonen auf einem SDS-Gel zeigt Abbildung 33.

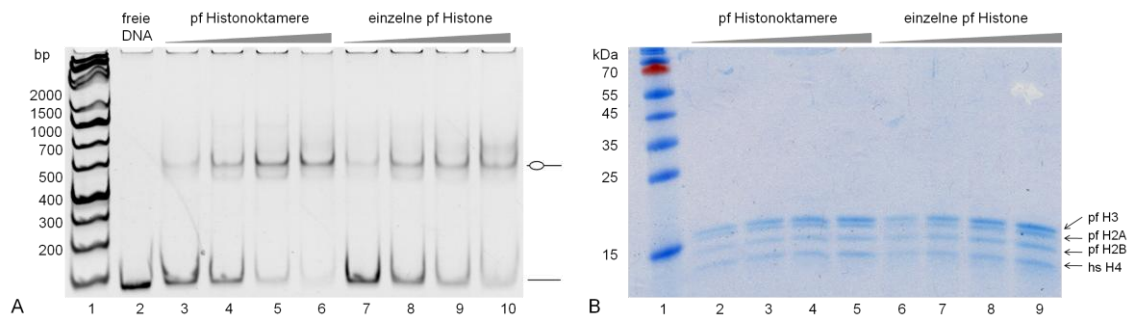


Abbildung 33: Test-Assembly für die Rekonstitution von 601_*NotI* Nukleosomen, durchgeführt mit Histonoktameren sowie einzelnen Histonen. A: 6 % PAA-Gel, Färbung mit EtBr; die Position der Nukleosomen bzw. der DNA ist am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spur 2: 500 ng 601_*NotI*-DNA aufgetragen, Spur 3-6: je 500 ng der rekonstituierten Nukleosomen aufgetragen, verschiedene Histonoktamer:DNA-Verhältnisse: Spur 3: 0,25:1, Spur 4: 0,3:1, Spur 5: 0,35:1, Spur 6: 0,4:1, Spur 7-10: je 500 ng der rekonstituierten Nukleosomen aufgetragen, Menge entsprechend Abbildung 32 berechnet. **B:** 17 % SDS-Gel, Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue, die Position der Histone auf dem Gel ist am rechten Bildrand markiert, Spur 1: Protein-Größenstandard, zugehörigen Werte am linken Bildrand angegeben, Spur 2-9: entsprechende Mengen der im Assembly (siehe A) eingesetzten Mengen auf das SDS-Gel aufgetragen: Spur 2: 1 µg pf Oktamere, Spur 3: 1,2 µg pf Oktamere, Spur 4: 1,4 µg pf Oktamere, Spur 5: 1,6 µg pf Oktamere, Spur 6-9: Menge entsprechend Abbildung 32 berechnet.

Trotz der beiden unterschiedlichen Methoden der Salzdialyse (Histonoktamere gegenüber einzelnen Histonen) zeigen sich keine qualitativen Unterschiede bei Betrachtung der 601_*NotI* Nukleosomen-Banden (Abbildung 33A). Die Höhe der Banden ist identisch und es zeigt sich auf Seite der einzelnen Histone eine ebenso deutlich begrenzte Nukleosomenbande ohne die Ausbildung unerwünschter Aggregate. Im Vergleich der eingesetzten Proteinmengen auf dem SDS-Gel (Abbildung 33B) ergeben sich entsprechende Bandenstärken.

In gleicher Weise wurde ein Assembly unter Verwendung einzelner pf Histone und dem Hsp70 promoter DNA-Fragment durchgeführt. Beide Methoden (Histonoktamere, einzelne Histone) sind nebeneinander aufgetragen (Abbildung 34).

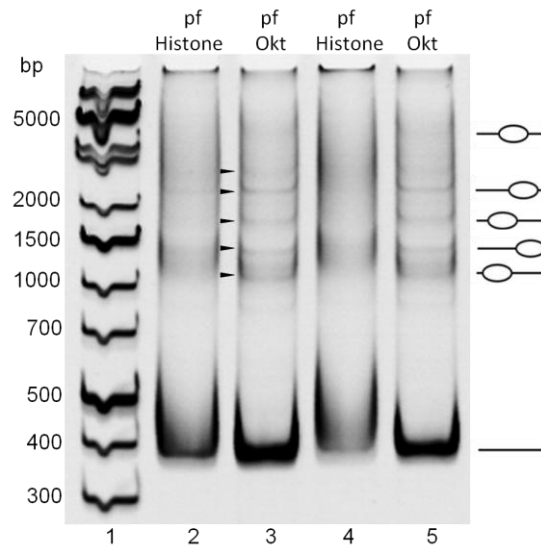


Abbildung 34: Rekonstitution von Hsp70 Nucleosomen mit einzelnen Histonen. Rekonstituierte Nucleosomen auf ein 5 % PAA-Gel aufgetragen, Färbung mit EtBr, die Position der Nucleosomen bzw. der DNA ist am rechten Bildrand markiert, Spur 1: DNA-Größenstandard, die zugehörigen Werte sind am linken Bildrand angegeben, Spuren 2-4: 400 ng rekonstituierte Plasmodium Hsp70 Nucleosomen aufgetragen (einzelne Histone verwendet), Spuren 3-5: 400 ng rekonstituierte Plasmodium Hsp70 Nucleosomen aufgetragen (Histonektamere), Histonektamer:DNA-Verhältnis 0,5:1 (Spur 3) bzw. 0,6:1 (Spur 5).

Unter Verwendung des Hsp70 DNA-Fragments zeigt die Nucleosomenrekonstitution im Vergleich beider Methoden deutliche Unterschiede. Es gelang nicht, aus einzelnen Histonen qualitativ vergleichbare Nucleosomen zu gewinnen. Die Spuren 2 und 4 erscheinen verwischt und zeigen keine deutlichen Banden, die unter Verwendung von Histonektameren zu erkennen sind.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Struktur und Dynamik von *Plasmodium falciparum* Nukleosomen. Dafür war es zunächst erforderlich die Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 zu exprimieren und aufzureinigen, um die anschließende Rekonstitution von *Plasmodium falciparum* Histonoktameren zu ermöglichen. Die Nukleosomen sollten nachfolgend und mit Hilfe verschiedener DNA-Substrate sowie Chromatin-Remodeling-Maschinen auf ihre Dynamik, Positionierung und Stabilität hin untersucht werden, wobei stets humane Nukleosomen als Vergleich hinzugezogen wurden. Der Arbeit lag folgende Fragestellung zu Grunde: Welche Bedeutung haben der große Anteil der Basen Adenin und Thymin im Genom des Parasiten und die Abweichungen der Sequenz der Histone im Bezug auf die Chromatindynamik innerhalb eines außerordentlich komplexen Lebenszyklus?

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht werden, die Salzgradientdialyse zur Rekonstitution von Nukleosomen mit einzelnen Histonen an Stelle von Histonoktameren durchzuführen.

5.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter *Plasmodium falciparum* Histone

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten *Plasmodium falciparum* Histone wurde gemäß eines Protokolls von Luger et al. durchgeführt, das von Claudia Huber im Labor etabliert worden war (Luger et al. 1999). Im Rahmen ihrer Diplomarbeit passte sie das Aufreinigungs-Protokoll insofern an, als sie den Zellaufschluss der *E.coli* Bakterien durch Ultraschallbehandlung bewerkstelligte und darauf hinwies, vor jeder präparativen Expression die Plasmide frisch in *E.coli* Bakterien zu transformieren, um die Expressionsraten zu erhöhen.

Für die Expression und Aufreinigung von *Plasmodium falciparum* Histonen wurden Codon-optimierte Plasmide verwendet, die durch die GENEART AG in Regensburg synthetisiert worden waren. Die Sequenz aller vier *Plasmodium* Histone lag in einem pTriEx-1.1 Vektor vor, der ein Ampicillin-Resistenz-Gen und die T7-Promotor-Sequenz trägt. Dieses Vektorsystem wurde dahingehend entwickelt, mit einem Plasmid die Expression in verschiedenen Expressionssystemen zu ermöglichen, unter anderem in *E.coli*, und enthält Merkmale verschiedener Systeme, beispielsweise des pET-Systems.

Im Vorfeld der Arbeit war es Regina Gröbner-Ferreira bereits gelungen, die *Plasmodium falciparum* Histone H2A und H2B zu exprimieren und aufzureinigen, im Rahmen dieser Arbeit konnte dasselbe für das *Plasmodium falciparum* Histon H3 erreicht werden. Die Elutionsprofile der Aufreinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Punkt 4.1.4.2) zeigen, dass mit dem Anstieg der Salzkonzentration ein Peak im aufgezeichneten Profil zu verzeichnen ist. Im direkten Vergleich zu den darunter angeführten SDS-Gelen zeigen sich die für die Größe der Histone typischen, stark ausge-

prägten Banden bei ca. 15 kDa, wobei weitere Banden sichtbar sind, vor allem unterhalb, im Bereich noch kleinerer Proteine. Diese lassen sich durch den verfrühten Abbruch der Translation bzw. Transkription erklären und stellen somit unvollständige Histonproteine dar.

Die Expression des *Plasmodium falciparum* Histon H4 blieb, trotz Codon-Optimierung, erfolglos. So konnten in Test-Expressionen sowie Large-Scale Expressionen keine Banden auf einer Höhe, die der Größe des pf H4 mit 11,41 kDa entspricht, ausgemacht werden. Unklar blieb zudem, ob dies durch eine gänzlich fehlende Expression oder eine nachträglichen Degradierung bedingt war, zudem, ob keinerlei Protein vorhanden war oder jedoch in so geringen Mengen, dass diese auf einem SDS-Gel nicht sichtbar gemacht werden konnten.

Die Expression des Histon H4 stellt sich schon in der Literatur als grundsätzlich schwieriger im Vergleich zu den übrigen Histonproteinen H2A, H2B und H3 dar. So beschrieben Luger und Rechsteiner 1997 die Expression von *Xenopus laevis* Histonen, wobei das Histon H4, anders als die übrigen Histone, nicht als Fusionsprotein und erst nach einer weiteren Optimierung in signifikanten Mengen als unlösliches Protein exprimiert werden konnte. Des Weiteren blieb die Ausbeute um ein vier- bis fünffaches hinter der anderer Histone zurück (Luger et al. 1997b). Als ein Vorzug bei der H4-Expression wird unter anderem auf langsam wachsende Bakterienstämme hingewiesen (Burnett und Springer 1999), wobei die Erniedrigung der Wachstumstemperatur von Bakterien und die Verwendung Protease-defizienter Stämme grundsätzlich die Bakterienexpression verbessern bzw. ermöglichen können (Schein 1993).

Nun unterscheidet sich das *Plasmodium falciparum* Histon H4 in nur acht Aminosäuren vom menschlichen Histon H4 (Miao et al. 2006), welches im Labor standardmäßig als Sequenz im pET21a Vektor in *E. coli* Bakterien exprimiert werden kann. Möglicherweise könnte der Wechsel hin zu einem anderen Vektor, wie pET21a, einen Vorteil verschaffen. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die Vektorsysteme pET21a und pTriEx sich in hohem Maß gleichen. Die Sequenz des *Plasmodium falciparum* Histon H4 im Vektor pTriEx 1.1 wurde, wie auch das Histon pf H3, neben dem anfänglich verwendeten BL21 (DE3) Expressionsstamm, auch in BL21 (DE3) pLacI Bakterienzellen transformiert. Dieser Bakterienstamm kann für pETBlue™ und pTriEx™ Vektoren verwendet werden und enthält einen lac Repressor mit dem Ziel, im nicht-induzierten Zustand die Expression zu unterdrücken, da oftmals kleine Mengen an T7-RNA-Polymerase vorhanden sind, die zu einer basalen Transkription führen. Auch hierbei zeigte sich keine Expression von H4.

5.2 Rekonstitution und Gelchromatographie von *Plasmodium falciparum* Histonoktameren

Die Rekonstitution und Gelchromatographie der *Plasmodium falciparum* Histonoktameren wurde, wie bereits die Expression und Aufreinigung rekombinanter Histonproteine, nach einem Protokoll von Luger et al. durchgeführt (Luger et al. 1999). Im Unterschied zu diesem Protokoll, dessen Zielsetzung die Durchführung von Kristallisationsexperimenten war, mussten die rekonstituierten Nukleosomen im Rahmen dieser Arbeit nicht

mehrmals aufgereinigt werden, da der Reinheitsgrad der Nukleosomen für die geplanten Experimente ausreichte.

Bedingt durch die Probleme der Expression des Plasmodium falciparum Histon H4, wurde für die Rekonstitution von Nukleosomen das humane Histon H4 verwendet. Dieses war von Claudia Huber exprimiert und aufgereinigt worden und weist, wie schon in der Einleitung detailliert beschrieben, in nur acht Aminosäuren Unterschiede zum pf H4 auf, was einer Übereinstimmung von 92,2 % gleichkommt (siehe Abbildung 9). Die Sequenzalignments können sicherstellen, dass Ergebnisse, trotz Verwendung eines Hybrid-Konstrukts, als aussagekräftig angesehen werden können.

Abbildung 35 wirft nun einen genaueren Blick auf das Alignment des Histon H4, das im Rahmen der Oktamer-Rekonstitution, an Stelle von pf H4 durch hs H4 ersetzt wurde.

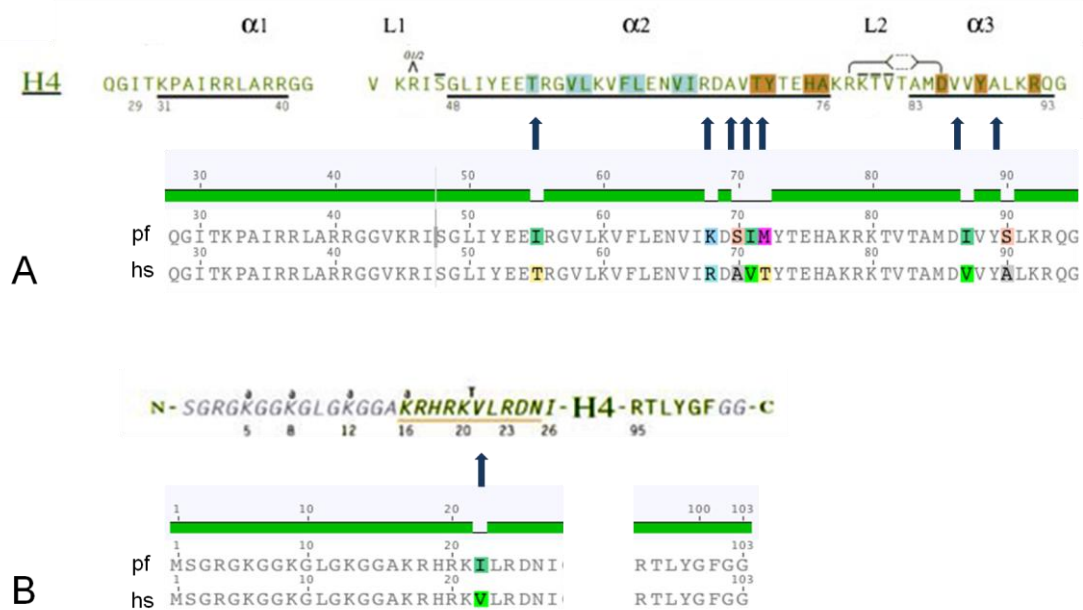


Abbildung 35: Aminosäure-Sequenzvergleich pf H4 und hs H4 (modifiziert nach Luger et al. 1997a). **A:** angegeben ist die Aminosäure-Kernsequenz des Histon-fold des humanen Histon H4, die α -Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) und loops (L1, L2) der Sekundärstruktur sind oberhalb der Sequenz angegeben, α -Helices zusätzlich unterstrichen. Die $\alpha 2$ - $\alpha 2$ -Interaktionen zwischen H3 und H4 sind blau hinterlegt, die H4-H2B-Interaktionen sind braun hinterlegt. Die blauen Pfeile unterhalb der hs H4-Sequenz geben die abweichenden Aminosäure-Sequenzen zwischen hs H4 und pf H4 an. Unterhalb davon ist das Aminosäure-Sequenzalignment pf H4 und hs H4 aufgeführt. **B:** Angegeben ist die Aminosäuresequenz der Histon-Tails des humanen Histon H4. Die Aminosäuren 16-25 sind orange unterstrichen, sie markieren den Kontakt zum H2A-H2B-Dimer. Der blaue Pfeil unterhalb der hs H4-Sequenz gibt die abweichenden Aminosäure-Sequenzen zwischen hs H4 und pf H4 an. Unterhalb davon das Aminosäure-Sequenzalignment pf H4 und hs H4.

Abbildung 35 zeigt, dass die 8 unterschiedlichen Aminosäuren zwischen hs H4 und pf H4 vorwiegend den C-terminalen Bereich der $\alpha 2$ -Helix betreffen, die für die Verbindung des $(H3-H4)_2$ -Tetramers sowie die H4-H2B-Interaktion bedeutsam ist. Im Bereich des N-terminalen Histon-Tails zeigt lediglich eine Aminosäure eine Abweichung in der Aminosäure-Sequenz.

5.3 Herstellung von DNA-Substraten für die Chromatin-Rekonstitution

Für die Rekonstitution von Chromatin war eine ausreichende Menge an DNA-Substraten erforderlich. So wurde das 601_NotI DNA Fragment über das pUC 18 Plasmid und PCR vervielfältigt und stand für die Untersuchung der Chromatindynamik zur Verfügung. Für den Vergleich der Positionierung von humanen und Plasmodium Histonoktameren sollte dagegen zum einen das „Hsp 70 promoter fragment“ sowie das „O2-40/-60 rDNA spacer promoter fragment“ verwendet werden, da diese DNA-Fragmente die Positionierung eines Histonoktamers an verschiedenen Stellen zulassen. Schlussendlich diente das „MMTV DNA-Fragment“ der Untersuchung der Temperaturdynamik von Nukleosomen.

5.4 In vitro Rekonstitution von Chromatin mittels Salzgradientdialyse

Die Rekonstitution von Nukleosomen mittels Salzgradientdialyse ist eine Standardmethode, um Nukleosomen hoher Qualität und gleichbleibenden Abständen zu gewinnen (Lee und Narlikar, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem untersucht ob es möglich ist, die Rekonstitution von Nukleosomen unter Verwendung von einzelnen Histonen an Stelle von Histonoktameren durchzuführen. Dies war im Falle der 601-Nukleosomen in vergleichend guter Qualität gelungen.

Fällt die Salzkonzentration während der Salzgradientdialyse unter 2 M NaCl, zerfallen die Histonoktamere in ein (H3-H4)₂-Tetramer und zwei H2A-H2B Dimere. Zunächst bindet, bei weiterem Abfall der Salzkonzentration, das Tetramer spezifisch an die DNA (Ramakrishnan 1995), anschließend bindet je ein H2A-H2B Dimere an das Tetramer (siehe Punkt 3.5). Da sich Histonproteine unter moderaten Salzkonzentrationen zu (H3-H4)₂-Tetrameren zusammenlagern, und H2A und H2B stabile Dimere bilden, war die Vorstellung, dass auch mit einzelnen Histonen die Rekonstitution von Nukleosomen mittels Salzgradientdialyse gelingen sollte, wenn auf die genaue Stöchiometrie sowie geeignete Pufferbedingungen geachtet wird. In Lösung stehen die einzelnen Histone sowie die (H3-H4)₂-Tetramere und H2A-H2B-Dimere und Histonoktamere in einem reversiblen Gleichgewicht, abhängig von den Umgebungsbedingungen wie Salzkonzentration, Temperatur, pH-Wert oder dem Vorhandensein von Harnstoff. In Anwesenheit von moderaten Salzkonzentrationen finden sich stabile Tetramere in Gestalt eines flachen, gedrehten Hufeisens sowie stabile Dimer-Strukturen. Bei einem pH-Wert zwischen 7 und 10, in Anwesenheit von DNA oder in gepufferten Lösungen mit mehr als 1 M NaCl, bildet sie jedoch ein Histonoktamer aus (Eickbush und Moudrianakis 1978; Khorasanizadeh 2004). Der Zusammenhalt des Histonoktamers ist relativ schwach und kann beispielsweise durch eine leichte Temperaturerhöhung oder eine geringe Konzentration von Harnstoff zerstört werden (Eickbush und Moudrianakis 1978).

Während der Rekonstitution von Nukleosomen mit einzelnen Histonen können die Histone zunächst, als Bestandteile des Reaktionsansatzes im Hochsalzpuffer mit 2 M NaCl, die der Konzentration des Faltungspuffers der Histonoktamer-Rekonstitution entspricht, Histonoktamere sowie H2A-H2B Dimere und (H3-H4)₂-Tetramere ausbilden. Wird die Konzentration nun, entsprechend der Salzgradientdialyse mit Histonoktameren, gesenkt, binden die Tetramere sowie Histon-Dimere entsprechend an die DNA.

Der Erfolg der neuen Herangehensweise wurde durch einen qualitativen Vergleich beider Methoden auf einem nativen PAA-Gel überprüft. Dabei zeigten sich für 601-Nukleosomen identische Bandenhöhen und –schrägen, während für Hsp70 Nukleosomen die Banden der neuen Methode verwischt und weniger scharf abgrenzbar erschienen. Der qualitative Vergleich der Nukleosomenbanden auf dem Gel erlaubt jedoch nur begrenzt einen Rückschluss auf die Zusammensetzung der Protein-DNA-Verbindung. Da die mit einzelnen Histonen rekonstituierten 601-Nukleosomen jedoch auch funktionell unter Inkubation mit Chromatin-Remodeling-Maschinen ein gleiches Verhalten zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass die 601-Nukleosomen in gleicher Weise aus $(H3-H4)_2$ -Tetrameren und H2A-H2B-Dimeren rekonstituiert wurden. Die neue Methode funktioniert damit für Sequenzen mit hoher Affinität der Bindungsstellen wie das 601_*NotI* DNA-Fragment, nicht aber für andere Sequenzen. So könnte, im Falle der Hsp70 Nukleosomen, die Unschärfe der Banden durch die Bildung unspezifischer, fehlgefalteter oder nicht-stöchiometrischer Komplexe bedingt sein.

Insgesamt ermöglicht die Methode mit einzelnen Histonen die Herstellung großer Mengen an 601-Nukleosomen in kurzer Zeit.

5.5 Temperaturverhalten humaner und *Plasmodium falciparum* Nukleosomen

Nukleosomen können, neben der ATP-abhängigen Verschiebung durch Chromatin-Remodeling-Enzyme, auch durch Wärmeenergie an eine andere Position verschoben werden (Flaus und Owen-Hughes, 2003b). So beobachteten Flaus et al., mit Hilfe eines Fragments der MMTV (mouse mammary tumor virus)-Promotor-Sequenz, Bewegungen der mittig positionierten Nukleosomen in Richtung Rand. Da Plasmodium- und humane MMTV-Nukleosomen nicht dieselbe Ausgangsposition auf diesem Fragment einnehmen, wurde das Temperaturverhalten mit randständigen Plasmodium- und humanen 601-Nukleosomen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Plasmodium Nukleosomen einen geringere Hitzestabilität aufweisen.

Das Histonoktamer besteht aus je zwei Paaren an H3-H4- und H2A-H2B-Dimeren. Die zwei H3-H4-Dimere interagieren insofern, als die beiden H3-Histone mittels eines 4-Helix-Bündels ein Tetramer ausbilden. Jedes der H2A-H2B-Dimere interagiert zudem mit einer entsprechenden Verbindung zwischen H2B und H4 (Luger et al. 1997a). Für die Ausbildung dieser 4-Helix-Bündel und damit der Ausbildung von Tetrameren und Oktameren, sind vor allem die C-terminalen Hälften der $\alpha 2$ -Helix sowie die $\alpha 3$ Helix verantwortlich. Dem Histon H3 kommt insofern also eine bedeutende Rolle zu, als es für den Zusammenhalt des $(H3-H4)_2$ -Tetramers wesentlich ist. Es bestehen jedoch weitere Bindungen zwischen H3-H2A, H4-H2A und H4-H2B. Jedes dieser Histon-Paare ist assoziiert mit 27-28 bp DNA, dazwischen befinden sich etwa 4 Linker-Basenpaare (Luger et al. 1997a).

Während das Histonoktamer in Anwesenheit von DNA oder hohen Salzkonzentrationen stabil ist, sind Nukleosomkernpartikel nur unter niedrigen Salzkonzentrationen stabil (Luger et al. 1997b). Die Interaktion des Histonoktamers mit der DNA ändert sich, sobald sich die Salzkonzentration erhöht: Nukleosomen ändern ihre Position auf der

DNA (Lohr et al. 1977), H2A und H2B können vom Nukleosomkernpartikel dissoziieren (Burton et al. 1978) und das gesamte Histonoktamer kann, ab etwa 0,8 M NaCl, auf ein anderes DNA-Fragment überwechseln (Germond et al. 1976).

Auch das Temperaturverhalten von Nukleosomkernpartikeln wurde intensiv untersucht. Bei niedrigen Salzkonzentrationen (1 mM) zeigen gleichförmige Nukleosomkernpartikel bei steigenden Temperaturen einen biphasischen Übergang in Hyperchromizität (Weischet 1979), wobei bei etwa 59-60 °C erste Histon-Kontakte in der Peripherie des Nukleosoms, unter Freigabe von 20-40 bp DNA, auseinanderbrechen. Die Interaktionen zwischen dem (H3-H4)₂-Tetramers scheinen bei diesem ersten Übergang stabil zu bleiben (Bashkin et al. 1993). Es folgt ein zweiter Übergang bei etwa 74 °C, der dem Auseinanderbrechen von Protein-DNA-Verbindungen des gesamten Partikels entspricht. Während der erste Vorgang reversibel war, ist der zweite Vorgang irreversibel (Bashkin et al. 1993; Ausio et al. 1989). Dagegen denaturiert freie DNA derselben Länge in einem einzigen Schritt bei etwa 44 °C (Weischet et al. 1978). Erhöht man die Salzkonzentration im Puffer geringfügig auf 10 mM zeigen die Nukleosomkernpartikel jedoch eine nahezu monophasische Schmelzkurve (Weischet et al. 1978) bei ca. 78 °C.

Die Untersuchung der humanen und Plasmodium 601-Nukleosomen wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 50 mM Tris/HCl pH 7,6 durchgeführt (siehe Punkt 3.6.2). Die mit 3 µl zugegebenen Nukleosomen (227 mM NaCl) führen insgesamt zu einer Salzkonzentration von etwa 34 mM NaCl und stellen somit eine relativ niedrige Ausgangskonzentration für die Temperaturuntersuchungen dar. Ab einer Temperatur von 54 °C und mit zunehmender Dauer der Inkubation bei 58 °C zeigt sich, dass Plasmodium Nukleosomen im Gegensatz zu humanen Nukleosomen ihre Struktur verändern (siehe Punkt 4.6.2). Dies ist daraus ersichtlich, dass sich eine Abnahme der Bandenstärke der Nukleosomen sowie eine Zunahme der Bandenstärke der freien DNA beobachten ließ. Für humane Nukleosomen konnte dies nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Weischet et al. muss bei der vorliegenden Salzkonzentration eher von einem monophasischen Übergang ausgegangen werden. Die Plasmodium Nukleosomen zeigen bei im Vergleich niedrigeren Temperaturen einen Verlust der Nukleosomenintegrität.

Ein verminderter Zusammenhalt innerhalb des Histonoktamers zum einen, geringer ausgeprägte DNA-Histon-Interaktionen zum anderen können das Temperaturverhalten der Nukleosomen verändern. Die Histone H3 und H4, die das Tetramer ausbilden und wesentlich für die Stabilität des Histonoktamers und den Kontakt mit der DNA sind, weisen nur geringfügige Unterschiede zwischen humanen und Plasmodium Histonen auf. Dies würde auf veränderte Interaktionen des Histonoktamers mit der DNA als Ursache der verminderten Stabilität hinweisen. Jedoch können möglicherweise veränderte α 2- sowie α 3-Helix-Strukturen der Histonproteine H2A und H2B, die für den Zusammenhalt des Tetramers, bzw. des Histonoktamers mitverantwortlich sind (siehe Abbildung 9), durchaus einen Einfluss auf die Stabilität des Histonoktamers nehmen. Da die freie DNA zunimmt ist zudem nicht von einer Aggregation der Nukleosomen bei hohen Temperaturen auszugehen. Durch die abweichenden Proteinstrukturen scheinen sich die Wechselwirkungen innerhalb des Histonoktamers zu ändern und auch, durch veränderte Oberflächen-Aminosäuren der Histonproteine, die Wechselwirkungen

mit der DNA. Möglicherweise, da die Chromatinstruktur während des Lebenszyklus der Plasmodien einer großen Flexibilität bedarf, sind die Nukleosomen flexibler, im Sinne von geringer ausgeprägten Histon-DNA-Interaktionen, die einen schnellere Positionsänderung auf der DNA ermöglichen.

Es bleibt jedoch zu beachten, dass unter Verwendung des humanen Histon H4, andere Bedingungen innerhalb des Histonoktamers herrschen, als unter Verwendung aller Plasmodium Histone. Die Veränderungen der Aminosäuren zwischen pf H4 und hs H4 betreffen auch Bereiche, die für den Kontakt zwischen H3 und H4 relevant sind (siehe Abbildung 35). Dadurch kann ebenfalls eine Verminderung der Stabilität der Nukleosomen bedingt sein, beispielsweise insofern, als das Tetramer geringer mit der DNA assoziiert ist.

Des Weiteren bleibt zu beachten, dass die Plasmodium Histonoktamere im Plasmodium Organismus an eine sehr AT-reiche DNA binden, die sicherlich ebenfalls Einfluss auf die Stärke der Bindung nimmt.

5.6 Remodeling Maschinen abhängige Dynamik von Plasmodium falciparum Nukleosomen

Chromatin-Remodeling-Komplexe verändern die Position des Nukleosoms auf der DNA. Dabei binden die Maschinen an die Linker-DNA und an das Nukleosom in Bewegungsrichtung. Der Loop-Recapture Mechanismus ermöglicht, unter Bildung einer DNA-Schleife die über die gesamte Oberfläche des Histonoktamers migriert, eine Bewegung, ohne das Nukleosom auseinanderzubrechen. Die Hydrolyse des ATP reicht dabei aus, um die Histon-DNA-Wechselwirkung im Bereich des „loops“ aufzubrechen. Durch die Neupositionierung befindet sich das Nukleosom an einer neuen DNA-Sequenz, was sich auf die Bindungseigenschaften zwischen Nukleosom und Maschine auswirkt.

Es wird angenommen, dass die Chromatin-Remodeling-Reaktion einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Rippe et al. 2007). Dies impliziert, dass „gute“ Substrate für Enzyme durch eine hohe Affinität von Chromatin-Remodeling-Komplexen zum Nukleosom (dadurch einen niedrigen K_m -Wert als Michaeliskonstante) sowie eine hohe katalytische Geschwindigkeitskonstante k_{cat} charakterisiert sind. Die k_{cat}/K_m -Ratio ist hierbei als Zeichen eines effizienten katalytischen Prozesses hoch. Als Gegenteil wäre für „schlechte“ Substrate eine niedrige k_{cat}/K_m -Ratio anzunehmen. Diese Überlegungen führen zu der Annahme, dass die Nukleosomen-Translokation ihren Ausgang von „guten“ Substraten nimmt, um diese zu Positionen zu verschieben, an denen die Nukleosomen „schlechte“ Substrate darstellen. Abbildung 36A zeigt die verschiedenen Dissoziationskonstanten K_d sowie die Geschwindigkeitskonstanten k für die Enzym-Substrat-Zusammenlagerung. Das Nukleosom N kann sich an den Positionen i , $i+1$ oder $i-1$ befinden, wobei als i die Ausgangsposition bildet. Die Chromatin-Remodeling-Maschinen R binden an die Nukleosomen. Der Ausgangs RN_i -Komplex kann das Nukleosom nun, mit einer für das Enzym spezifischen Anzahl an Basenpaaren (SWI/SNF ca. 50 bp) und mit der Geschwindigkeitskonstante k_{i-1} oder k_{i+1} verschieben, oder der RN_i -Komplex mit der Dissoziationskonstante $K_{d,i}$ dissoziiert in das Nukleosom N_i und ein

freies Remodeling-Enzym R. Dieselbe Reaktion kann an den Positionen $i+1$ und $i-1$ stattfinden. Um das Nukleosom an einem spezifischen DNA-Abschnitt zu positionieren wird von Rippe, Schrade et al. vorgeschlagen, dass gewisse DNA-Sequenzen, die Nukleosomen zu „schlechten“ Substraten mit einer niedrigen Geschwindigkeitskonstante k machen, so dass diese Substrate Endpunkte der Remodeling-Reaktion darstellen. Abbildung 36B zeigt eine solche Reaktion mit Präferenz und damit Endpunkt für die Position $i+1$ und stellt zwei Modelle dafür vor.

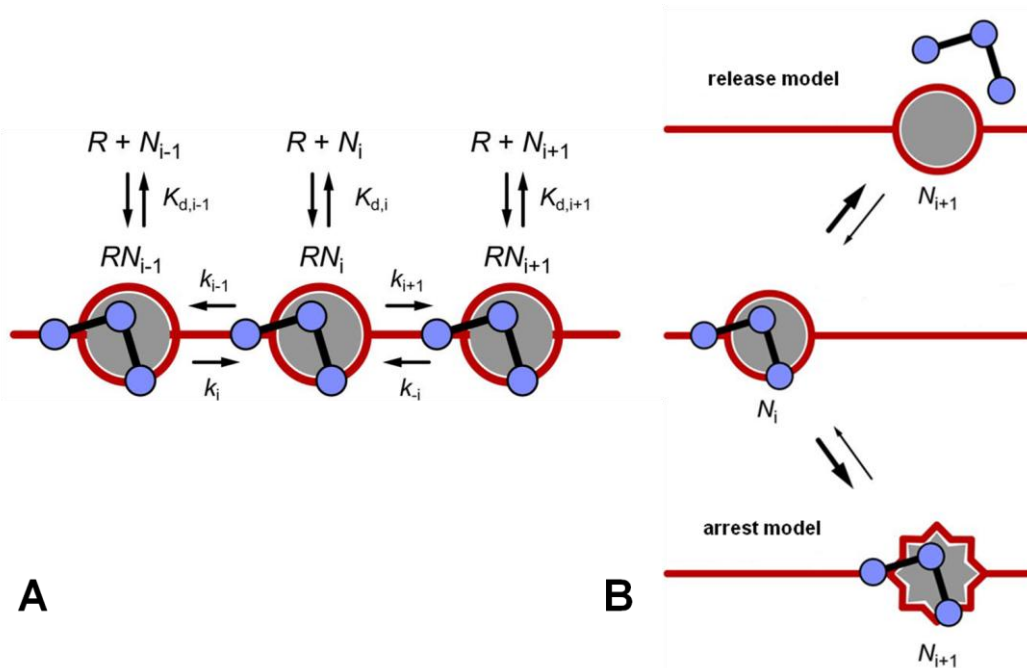


Abbildung 36: Positionierung von Nukleosomen durch Chromatin-Remodeling-Enzyme (Rippe et al. 2007). **A:** Schema der Remodeling-Reaktion, drei Positionen auf der DNA ($i-1$, i und $i+1$) werden betrachtet. Das Remodeling-Enzym R kann an jeder dieser drei Positionen mit einer Dissoziationskonstante K_d an das Nukleosom N binden. Die Translokationen laufen mit den eingezeichneten Reaktionskonstanten k ab. **B:** Zwei Modelle der Nukleosomenpositionierung durch Chromatin-Remodeling-Enzyme. Nach dem „release model“ ist die Bindungsaffinität an das Nukleosom an der Endposition $i+1$ niedriger als an der Ausgangsposition i , was zu einer Dissoziation der Remodeling-Maschine führt. Nach dem „arrest model“ ist die Geschwindigkeitskonstante k_{i+1} für die Translokation aus der Position $i+1$ zurück zur Position i reduziert.

Es lassen sich zwei verschiedene Modelle für die Nukleosomenpositionierung annehmen (siehe Abbildung 36B). Um das Nukleosom an $i+1$ zu positionieren, muss entweder die Geschwindigkeitskonstante k_{i+1} oder mit $K_{d,i+1}$ die Affinität des Enzyms zum Substrat reduziert sein. Die Verminderung der Affinität zum Substrat wird durch das „release“ Modell beschrieben, bei dem das Chromatin-Remodeling-Enzym mit hoher Affinität an die „falsche“ Position N_i bindet und das Nukleosom an die „richtige“ Position N_{i+1} verschiebt. Diese stellt eine Position niedriger Affinität dar, was zu einer Dissoziation der Remodeling-Maschine führt. Nach dem „arrest model“ weisen die Chromatin-Remodeling-Maschinen eine besonders hohe Affinität für das N_{i+1} Nukleosom auf, bleiben nach der Translokation daran gebunden und verhindern weitere Positionenänderungen.

rungen. Die Geschwindigkeitskonstante k_i für die Translokation aus der Position $i+1$ zurück zu Position i ist dabei reduziert.

Unter der Annahme, dass Chromatin-Remodeling-Komplexe unterschiedliche Affinitäten zu ihren Substraten aufweisen, können zum einen eine Dynamik der Chromatinstruktur, zum anderen definierte Anordnungen von Nukleosomen erreicht werden.

Nun verhalten sich die Plasmodium 601-Nukleosomen während Remodeling-Reaktionen mit Snf2H, CHD1, CHD3 und CHD4 identisch wie humane 601-Nukleosomen, im Sinne des Abschlusses einer effizienten Reaktion. Dies bedeutet zunächst, dass sich die Position von Plasmodium Nukleosomen nach demselben Mechanismus verändern lässt, was, im Hinblick auf die Wichtigkeit einer dynamischen Genregulation während des komplexen Lebenszyklus des Parasiten, nicht weiter verwunderlich ist. Wie in der Einleitung beschrieben, wurden im Genom von Plasmodium falciparum 11 Snf2/Swi2 ATPasen mit Ähnlichkeit zu den bestehenden vier Klassen an Chromatin-Remodeling-Enzymen entdeckt.

Im Vergleich von humanen und Plasmodium Nukleosomen zeigt sich zudem, dass die Verschiebung der Nukleosomen gleich schnell, das heißt bei vergleichbaren Mengen an hinzugegebenem Remodeling-Enzym, erfolgt. Hierbei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass das Plasmodium Histonoktamer mit dem humanen Histon H4 rekonstituiert wurde. Zudem könnte für die Durchführung eines genauen Kinetik-Versuchs die Untersuchung des Verhaltens bei einer Bedingung zu verschiedenen Zeiten ergänzt werden, indem eine festgelegte Menge an Remodeling-Enzym zugegeben wird und die Reaktionsansätze nach unterschiedlichen Zeitspannen abgestoppt werden.

Da die N-Termini der Histone über die Oberfläche des Histonoktamers hinausreichen wird angenommen, dass sie für den Kontakt des Nukleosoms zum Remodeling-Enzym relevant sind. Dies gilt vor allem für den N-Terminus von H4 (und davon die ersten 20 Aminosäuren), für den gezeigt wurde, dass die Konservierung essentiell für die Aktivität der ISWI ATPase ist (Clapier et al. 2001).

In Abbildung 31E-H war, vor allem bei der Remodeling-Reaktion mit CHD3 (Abbildung 31E-F), am Ende der Reaktion eine Bande unterhalb derer randständiger Nukleosomenbanden zusehen. Diese lässt sich durch eine Verschiebung von Nukleosomen über den Rand hinaus erklären.

5.7 Positionierung und Dynamik humaner und Plasmodium falciparum Nukleosomen auf DNA-Fragmenten mit mehreren Nukleosomenpositionen

Um die Struktur der Plasmodium Histonoktamere näher zu untersuchen wurden für die Rekonstitution von Plasmodium Nukleosomen DNA-Fragmente verwendet, die die Positionierung an mehreren 147 bp Sequenzen entlang des DNA-Fragments zulassen. Dabei besetzten Plasmodium Histonoktamere, im Vergleich zu humanen Histonoktamern, andere Positionen auf dem Hsp70 Fragment und wurden durch Snf2H an unterschiedliche Positionen verschoben.

Die Verpackung der DNA in Nucleosomen begrenzt grundsätzlich die Zugänglichkeit regulatorischer DNA-bindender Proteine. Die exakte Kenntnis der Positionierung von Nucleosomen ermöglicht daher ein besseres Verständnis und eine bessere Vorhersagbarkeit, zu welchem Zeitpunkt und an welcher Lokalisation DNA-bindende Proteine agieren. Andererseits können Nucleosomen nicht nur als Verpackungs-Strukturbestandteile aufgefasst werden, die die Zugänglichkeit blockieren, da sie die Interaktionen zu regulatorischen Proteinen vermitteln, beispielsweise bei der Initiierung der Transkription (Teif und Rippe 2009). Wie die Nucleosomen positioniert sind hat auch eine Auswirkung darauf, wie Zellen auf externe Stimulationen reagieren, oder wie eine Fehlregulation der Nucleosomenpositionierung zu embryonalen Entwicklungsstörungen oder Krebserkrankungen führen kann (Jiang und Pugh 2009).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, nehmen innerhalb eines Organismus zahlreiche Faktoren, wie die DNA-Sequenz an sich, aber auch RNA-Polymerase, Chromatin-Remodeling-Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Histonvarianten und posttranslationale Histonmodifikationen sowie benachbarte Nucleosomen, Einfluss auf die exakte Positionierung der Nucleosomen.

Die DNA-Sequenz spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle für die Positionierung von Nucleosomen. Die Entstehung von Nucleosomen als Struktureinheiten wird dabei grundsätzlich durch energetisch günstige Histon-DNA-Interaktionen ermöglicht, die den Arbeitsprozess der DNA-Bindung erleichtert (Lowary und Widom 1998). Nicht alle 147 bp-Sequenzen zeigen dasselbe Potential für eine feste Bindung, so dass eine Verteilung entlang von DNA-Fragmenten stattfindet. Nach Lowary und Widom ist die Wahrscheinlichkeit mit der spezifische Sequenzen besetzt werden zum einen von der Energie abhängig, die während der Rekonstitution der Nucleosomen notwendig ist und die möglichst niedrig gehalten wird, zum anderen von der Zahl alternativer Positionierungsstellen (Lowary und Widom 1998). Auch die Translokation von Nucleosomen durch Chromatin-Remodeling-Komplexe wird von der DNA-Sequenz beeinflusst, wobei verschiedene Remodeling-Komplexe hinsichtlich dessen charakteristische Aktivitäten zeigen (Rippe et al. 2007).

Im Hinblick auf die Untersuchung von Plasmodium Nucleosomen erscheint die Überlegung interessant, inwiefern die veränderte Struktur der Histonoktamere einen Einfluss auf das Positionierungsverhalten hat. Während des Lebenszyklus des Parasiten ändert sich die Dichte der Nucleosomenbesetzung deutlich. Außerdem scheint es möglich, dass die Interaktionen der DNA mit den Histonoktamern durch den hohen AT-Gehalt des Genoms erschwert werden (Ponts et al. 2010). Die getesteten DNA-Fragmente unterscheiden sich von der AT-reichen Sequenz innerhalb des Einzellers. Dennoch zeigen Plasmodium Histonoktamere eine unterschiedliche Sequenzpräferenz im Vergleich mit humanen Histonoktamern.

Die unterschiedliche Aminosäuresequenz der Plasmodium Histone, betreffend vor allem H2A und H2B, scheint grundsätzlich zu unterschiedlichen energetischen Eigenschaften bezüglich der Bindungsaffinitäten für bestimmte DNA-Abschnitte während des Assemblys zu führen. Während der Salzgradientdialyse, mit einer kontinuierlichen Reduktion der Salzkonzentration, sind die Histonoktamere und DNA einer großen Bandbreite von Konzentrationen ausgesetzt, bevor die Nucleosomen bei 227 mM NaCl in subphysiologischen Salzkonzentrationen „eingefroren“ werden und nicht mehr ausei-

inander dissoziieren können. Shrader und Crother hatten dabei gezeigt, dass es sich bei der Nukleosomenrekonstitution *in vitro* um einen Gleichgewichtsprozess handelt, der den Bedingungen *in vivo* und nicht kinetischen Effekten, entspricht (Shrader und Crothers 1989, 1990). Während der Dialyse mit ihren unterschiedlichen Salzkonzentrationen, sind die sich bildenden Nukleosomen in einem weiten Bereich physiologischen Salzkonzentrationen ausgesetzt, während derer sie sich zwischen thermodynamisch günstigen Lokalisationen bewegen (Lowary und Widom 1997). Damit ist davon auszugehen, dass *in vitro* rekonstituierte Nukleosomen dieselben Histon-DNA-Interaktionen wie *in vivo* reflektieren. Flaus et. al. hatten jedoch angemerkt, dass die Positionen von mittels Salzgradientdialyse rekonstituierten Nukleosomen nicht unbedingt dieselben wie durch intakte Nukleosomen darstellen, da das Tetramer während der Salzdialyse zuerst an die DNA bindet und möglicherweise andere Stellen besetzt, als ein intaktes Histonoktamer (Flaus und Owen-Hughes 2003a). Die in physiologischen Salzkonzentrationen rekonstituierten Nukleosomen können jedoch für eine lange Zeitdauer ihre Bindung zur DNA lösen und anschließend wieder an das DNA-Fragment binden, entsprechend ihrer thermodynamischen Präferenzen, was einer Positionierung der Nukleosomen während eines echten Gleichgewichtsprozesses entspricht. Hinsichtlich der Untersuchung der Plasmodium Histonoktamer-Positionierung, werden somit die direkten Effekte einer im Hinblick auf humane Histone veränderten Histonstruktur dargestellt.

Während die Plasmodium Histonoktamere auf dem Hsp70 Fragment definierte Positionen einnehmen, zeigen sie auf dem O2-40/-60 Fragment interessanterweise ein unscharfes Bandenmuster auf dem Gel. Dies kann zum einen durch die Besetzung sehr vieler, verschiedener Positionen auf dem DNA-Fragment bedingt sein, die dementsprechend viele unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten auf dem Gel hervorrufen und so zu einem „verwischten“ Bandenmuster beitragen. Zum anderen kann dieses Bild auch durch ein „breathing“ der Nukleosomen erklärt werden (Blossey und Schiessel 2011), bei dem sich die DNA teilweise spontan vom Histonoktamer wickelt und die Nukleosomen durch diese Instabilität ein verändertes Laufverhalten zeigen. Dieser „breathing“-Effekt könnte durch einen Verdau mit Micrococcal Nuclease (MNase), einer Ca²⁺-abhängige Endonuklease ohne ausgeprägte Sequenzspezifität, die bei Verwendung von milden Verdaubedingungen bevorzugt in den Linker-DNA-Abschnitten schneidet, nachgewiesen werden. Die 147 Basenpaare würden schneller zu kleineren Fragmenten hydrolysiert werden.

Wie bereits erwähnt, sind *in vivo* nicht ausschließlich intrinsische Histon-Bindungspräferenzen für gewisse DNA-Abschnitte, sondern auch weitere Faktoren, wie beispielsweise Chromatin-Remodeling Komplexe, die die Lokalisation eines Nukleosoms in einem ATP-abhängigen Prozess verändern können, relevant (Teif und Rippe 2009). Es wurde zudem gezeigt, dass Nukleosomen unterschiedlich positioniert werden, abhängig von der jeweiligen Remodeling-Maschine (Rippe et al. 2007). Diese Beobachtungen legen einen „Chromatin Remodeling Code“ nahe, nach dem bestimmte DNA-Sequenzen spezifisch durch die jeweiligen Remodeling Komplexe interpretiert werden und das Verteilungsmuster und damit die Zugänglichkeit der DNA bestimmen.

Um den Einfluss einer Chromatin-Remodeling-Maschine auf das Positionierungsmuster von Plasmodium Nukleosomen hin zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze mit

Snf2H angesetzt und nachfolgend analysiert. Dabei erbrachte die Reaktion zwischen humanen und Plasmodium Nukleosomen deutliche Unterschiede im Muster der Nukleosomenbanden. So wurden jeweils neue Positionen besetzt, als auch auf vorbestehende Positionen umgelagert.

Eine Remodeling-Maschine positioniert ein Nukleosom neu, auf eine andere, energetisch günstige Position. Dabei bildet sich ein neues Gleichgewicht aus. Die Tatsache, dass Nukleosomen zwischen relativ energetisch vorteilhaften Positionen bewegt werden zeigt, dass Remodeling-Komplexe, wie viele andere klassische Enzyme, die ansonsten langsam ablaufende Verteilung ihrer Substrate beschleunigen (Stockdale et al. 2006). Da beim Vergleich der Dynamik humaner und Plasmodium Nukleosomen dasselbe DNA-Substrat und dieselbe Remodeling-Maschine verwendet wurden, scheinen die Histon-Bindungspräferenzen ausschlaggebend für das unterschiedliche Positionierungsverhalten gewesen zu sein.

6 Literaturverzeichnis

- Adl, Sina M.; Simpson, Alastair G. B.; Farmer, Mark A.; Andersen, Robert A.; Anderson, O. Roger; Barta, John R. et al. (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. In: *J. Eukaryot. Microbiol* 52 (5), S. 399–451.
- Alano, Pietro (2007): Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. In: *Mol. Microbiol* 66 (2), S. 291–302.
- Allfrey, V. G.; Mirsky, A. E. (1964): Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. In: *Science* 144 (3618), S. 559.
- an Jansen; Verstrepen, Kevin J. (2011): Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 75 (2), S. 301–320.
- Andersson, Robin; Enroth, Stefan; Rada-Iglesias, Alvaro; Wadelius, Claes; Komorowski, Jan (2009): Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. In: *Genome Res* 19 (10), S. 1732–1741.
- Arents, G.; Burlingame, R. W.; Wang, B. C.; Love, W. E.; Moudrianakis, E. N. (1991): The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88 (22), S. 10148–10152.
- Ausio, J.; Dong, F.; van Holde, K. E. (1989): Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. In: *J. Mol. Biol* 206 (3), S. 451–463.
- Ball, Philip (2003): Portrait of a molecule. In: *Nature* 421 (6921), S. 421–422.
- Bannister, Andrew J.; Kouzarides, Tony (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. In: *Cell Res* 21 (3), S. 381–395.
- Bannister, L. H.; Hopkins, J. M.; Fowler, R. E.; Krishna, S.; Mitchell, G. H. (2000): A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. In: *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 16 (10), S. 427–433.
- Bashkin, J.; Hayes, J. J.; Tullius, T. D.; Wolffe, A. P. (1993): Structure of DNA in a nucleosome core at high salt concentration and at high temperature. In: *Biochemistry* 32 (8), S. 1895–1898.
- Beard, P. (1978): Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40. In: *Cell* 15 (3), S. 955–967.
- Beauchamps, P.; Tourvieille, B.; Cesbron-Delauw, M. F.; Capron, A. (1997): The partial sequence of the *Plasmodium falciparum* histone H4 gene. In: *Res. Microbiol* 148 (3), S. 201–203.
- Berger, Shelley L. (2007): The complex language of chromatin regulation during transcription. In: *Nature* 447 (7143), S. 407–412.
- Bernstein, Bradley E.; Liu, Chih Long; Humphrey, Emily L.; Perlstein, Ethan O.; Schreiber, Stuart L. (2004): Global nucleosome occupancy in yeast. In: *Genome Biol* 5 (9), S. R62.
- Blossey, Ralf; Schiessel, Helmut (2011): The dynamics of the nucleosome: thermal effects, external forces and ATP. In: *FEBS J* 278 (19), S. 3619–3632.

- Bodansky, S.; Mintz, L. B.; Holmes, D. S. (1979): The mesokaryote *Gyrodinium cohnii* lacks nucleosomes. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 88 (4), S. 1329–1336.
- Bousema, Teun; Drakeley, Chris (2011): Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. In: *Clin. Microbiol. Rev* 24 (2), S. 377–410.
- Bowman, S.; Lawson, D.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Churcher, C. M. et al. (1999): The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 400 (6744), S. 532–538.
- Bozdech, Zbynek; Llinás, Manuel; Pulliam, Brian Lee; Wong, Edith D.; Zhu, Jingchun; DeRisi, Joseph L. (2003): The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. In: *PLoS Biol* 1 (1), S. E5.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem* 72, S. 248–254.
- Bruno, Michael; Flaus, Andrew; Stockdale, Chris; Rencurel, Chantal; Ferreira, Helder; Owen-Hughes, Tom (2003): Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. In: *Mol. Cell* 12 (6), S. 1599–1606.
- Burnett, V. L.; Springer, D. L. (1999): High-level expression of human histone H4 in *E. coli*. In: *BioTechniques* 26 (1), S. 30-2, 34.
- Burton, D. R.; Butler, M. J.; Hyde, J. E.; Phillips, D.; Skidmore, C. J.; Walker, I. O. (1978): The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. In: *Nucleic Acids Res* 5 (10), S. 3643–3663.
- Bustin, Michael; Catez, Frédéric; Lim, Jae-Hwan (2005): The dynamics of histone H1 function in chromatin. In: *Mol. Cell* 17 (5), S. 617–620.
- Cary, C.; Lamont, D.; Dalton, J. P.; Doerig, C. (1994): *Plasmodium falciparum* chromatin: nucleosomal organisation and histone-like proteins. In: *Parasitol. Res* 80 (3), S. 255–258.
- Chen, Jianguang; Kinyamu, H. Karimi; Archer, Trevor K. (2006): Changes in attitude, changes in latitude: nuclear receptors remodeling chromatin to regulate transcription. In: *Mol. Endocrinol* 20 (1), S. 1–13.
- Chen, Q.; Fernandez, V.; Sundström, A.; Schlichtherle, M.; Datta, S.; Hagblom, P.; Wahlgren, M. (1998): Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 394 (6691), S. 392–395.
- Chookajorn, Thanat; Ponsuwanna, Patrath; Cui, Liwang (2008): Mutually exclusive var gene expression in the malaria parasite: multiple layers of regulation. In: *Trends Parasitol* 24 (10), S. 455–461.
- Clapier, Cedric R.; Cairns, Bradley R. (2009): The biology of chromatin remodeling complexes. In: *Annu. Rev. Biochem* 78, S. 273–304.
- Clapier, C. R.; Längst, G.; Corona, D. F.; Becker, P. B.; Nightingale, K. P. (2001): Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. In: *Mol. Cell. Biol.* 21 (3), S. 875–883.
- Coulson, Richard M. R.; Hall, Neil; Ouzounis, Christos A. (2004): Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Genome Res* 14 (8), S. 1548–1554.

- Cox, Francis Eg (2010): History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. In: *Parasit Vectors* 3 (1), S. 5.
- Cui, Liwang; Miao, Jun (2010): Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Eukaryotic Cell* 9 (8), S. 1138–1149.
- Eberharter, Anton; Längst, Gernot; Becker, Peter B. (2004): A nucleosome sliding assay for chromatin remodeling factors. In: *Meth. Enzymol* 377, S. 344–353.
- Eickbush, T. H.; Moudrianakis, E. N. (1978): The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. In: *Biochemistry* 17 (23), S. 4955–4964.
- Eisen, J. A.; Sweder, K. S.; Hanawalt, P. C. (1995): Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. In: *Nucleic Acids Res* 23 (14), S. 2715–2723.
- Feagin, J. E. (1992): The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. In: *Mol. Biochem. Parasitol* 52 (1), S. 145–148.
- Felsenfeld, G. (1978): Chromatin. In: *Nature* 271 (5641), S. 115–122.
- Felsenfeld, Gary; Groudine, Mark (2003): Controlling the double helix. In: *Nature* 421 (6921), S. 448–453.
- Fichera, M. E.; Roos, D. S. (1997): A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. In: *Nature* 390 (6658), S. 407–409.
- Field, Yair; Kaplan, Noam; Fondufe-Mittendorf, Yvonne; Moore, Irene K.; Sharon, Eilon; Lubling, Yaniv et al. (2008): Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. In: *PLoS Comput. Biol* 4 (11), S. e1000216.
- Flaus, Andrew; Owen-Hughes, Tom (2003a): Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. In: *Mol. Cell. Biol* 23 (21), S. 7767–7779.
- Flaus, Andrew; Owen-Hughes, Tom (2003b): Mechanisms for nucleosome mobilization. In: *Biopolymers* 68 (4), S. 563–578.
- Flaus, Andrew; Owen-Hughes, Tom (2011): Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodeling: the means to the end. In: *FEBS J* 278 (19), S. 3579–3595.
- Flaus, Andrew; Martin, David M. A.; Barton, Geoffrey J.; Owen-Hughes, Tom (2006): Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. In: *Nucleic Acids Res* 34 (10), S. 2887–2905.
- Ganesan, Karthikeyan; Ponmee, Napawan; Jiang, Lei; Fowble, Joseph W.; White, John; Kamchonwongpaisan, Sumalee et al. (2008): A genetically hard-wired metabolic transcriptome in *Plasmodium falciparum* fails to mount protective responses to lethal antifolates. In: *PLoS Pathog* 4 (11), S. e1000214.
- Gardner, M. J.; Tettelin, H.; Carucci, D. J.; Cummings, L. M.; Aravind, L.; Koonin, E. V. et al. (1998): Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Science* 282 (5391), S. 1126–1132.
- Gardner, Malcolm J.; Hall, Neil; Fung, Eula; White, Owen; Berriman, Matthew; Hyman, Richard W. et al. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 419 (6906), S. 498–511.
- Germond, J. E.; Bellard, M.; Oudet, P.; Chambon, P. (1976): Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatin. In: *Nucleic Acids Res.* 3 (11), S. 3173–3192.

- Hall, N.; Pain, A.; Berriman, M.; Churcher, C.; Harris, B.; Harris, D. et al. (2002): Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. In: *Nature* 419 (6906), S. 527–531.
- Hamiche, A.; Sandaltzopoulos, R.; Gdula, D. A.; Wu, C. (1999): ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. In: *Cell* 97 (7), S. 833–842.
- Hewish, D. R.; Burgoyne, L. A. (1973): Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 52 (2), S. 504–510.
- Hiepe, Theodor (Hg.) (2006): Allgemeine Parasitologie. Mit den Grundzügen der Immunbiologie Diagnostik und Bekämpfung. 1. Aufl. Stuttgart: Parey.
- Horrocks, Paul; Pinches, Robert A.; Chakravorty, Srabasti J.; Papakrivos, Janni; Christodoulou, Zóe; Kyes, Susan A. et al. (2005): PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. In: *J. Cell. Sci* 118 (Pt 11), S. 2507–2518.
- Horrocks, Paul; Wong, Eleanor; Russell, Karen; Emes, Richard D. (2009): Control of gene expression in *Plasmodium falciparum* - ten years on. In: *Mol. Biochem. Parasitol* 164 (1), S. 9–25.
- Hyman, Richard W.; Fung, Eula; Conway, Aaron; Kurdi, Omar; Mao, Jennifer; Miranda, Molly et al. (2002): Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome 12. In: *Nature* 419 (6906), S. 534–537.
- James, A. A.; Rossignol, P. A. (1991): Mosquito salivary glands: Parasitological and molecular aspects. In: *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 7 (10), S. 267–271.
- Jenuwein, T.; Allis, C. D. (2001): Translating the histone code. In: *Science* 293 (5532), S. 1074–1080.
- Ji, D. D.; Arnot, D. E. (1997): A *Plasmodium falciparum* homologue of the ATPase subunit of a multi-protein complex involved in chromatin remodelling for transcription. In: *Mol. Biochem. Parasitol* 88 (1-2), S. 151–162.
- Jiang, Cizhong; Pugh, B. Franklin (2009): Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. In: *Nat. Rev. Genet.* 10 (3), S. 161–172.
- Kaplan, Noam; Moore, Irene K.; Fondufe-Mittendorf, Yvonne; Gossett, Andrea J.; Tillo, Desiree; Field, Yair et al. (2009): The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. In: *Nature* 458 (7236), S. 362–366.
- Khorasanizadeh, Sepideh (2004): The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. In: *Cell* 116 (2), S. 259–272.
- Kim, Yeonjung; McLaughlin, Neil; Lindstrom, Kim; Tsukiyama, Toshio; Clark, David J. (2006): Activation of *Saccharomyces cerevisiae* HIS3 results in Gcn4p-dependent, SWI/SNF-dependent mobilization of nucleosomes over the entire gene. In: *Mol. Cell. Biol* 26 (22), S. 8607–8622.
- Klug, William S.; Cummings, Michael R.; Spencer, Charlotte A. (2007): Genetik. 8. Aufl. München [u.a.]: Pearson Studium (Biologie).
- Kornberg, R. D. (1974): Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. In: *Science* 184 (139), S. 868–871.

- Kornberg, R. D. (1977): Structure of chromatin. In: *Annu. Rev. Biochem* 46, S. 931–954.
- Kornberg, R. D.; Thomas, J. O. (1974): Chromatin structure; oligomers of the histones. In: *Science* 184 (139), S. 865–868.
- Kouzarides, Tony (2007): Chromatin modifications and their function. In: *Cell* 128 (4), S. 693–705.
- Längst, Gernot; Becker, Peter B. (2004): Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? In: *Biochim. Biophys. Acta* 1677 (1-3), S. 58–63.
- Längst, G.; Bonte, E. J.; Corona, D. F.; Becker, P. B. (1999): Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. In: *Cell* 97 (7), S. 843–852.
- Le Roch, Karine G.; Johnson, Jeffrey R.; Ahiboh, Hugues; Chung, Duk-Won D.; Prudhomme, Jacques; Plouffe, David et al. (2008): A systematic approach to understand the mechanism of action of the bithiazolium compound T4 on the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. In: *BMC Genomics* 9, S. 513.
- Le Roch, Karine G.; Johnson, Jeffrey R.; Florens, Laurence; Zhou, Yingyao; Santrosyan, Andrey; Grainger, Munira et al. (2004): Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. In: *Genome Res* 14 (11), S. 2308–2318.
- Lee, Cheol-Koo; Shibata, Yoichiro; Rao, Bhargavi; Strahl, Brian D.; Lieb, Jason D. (2004): Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. In: *Nat. Genet* 36 (8), S. 900–905.
- Lee, K. M.; Narlikar, G. (2001): Assembly of nucleosomal templates by salt dialysis. In: *Curr Protoc Mol Biol* 21, S. Unit 21.6.
- Lee, William; Tillo, Desiree; Bray, Nicolas; Morse, Randall H.; Davis, Ronald W.; Hughes, Timothy R.; Nislow, Corey (2007): A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. In: *Nat. Genet* 39 (10), S. 1235–1244.
- Leech, J. H.; Barnwell, J. W.; Aikawa, M.; Miller, L. H.; Howard, R. J. (1984): *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. In: *J. Cell Biol* 98 (4), S. 1256–1264.
- Levine, N. D. (1988): Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. In: *J. Protozool* 35 (4), S. 518–520.
- Linxweiler, W.; Hörz, W. (1984): Reconstitution of mononucleosomes: characterization of distinct particles that differ in the position of the histone core. In: *Nucleic Acids Res* 12 (24), S. 9395–9413.
- Liu, Ying; Lu, Chenning; Yang, Ye; Fan, Yanping; Yang, Renliang; Liu, Chuan-Fa et al. (2011): Influence of Histone Tails and H4 Tail Acetylations on Nucleosome-Nucleosome Interactions. In: *Journal of molecular biology*.
- Lohr, D.; Tatchell, K.; van Holde, K. E. (1977): On the occurrence of nucleosome phasing in chromatin. In: *Cell* 12 (3), S. 829–836.
- Lopez-Rubio, Jose Juan; Gontijo, Alisson M.; Nunes, Marta C.; Issar, Neha; Hernandez Rivas, Rosaura; Scherf, Artur (2007): 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. In: *Mol. Microbiol* 66 (6), S. 1296–1305.

- Lowary, P. T.; Widom, J. (1997): Nucleosome packaging and nucleosome positioning of genomic DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (4), S. 1183–1188.
- Lowary, P. T.; Widom, J. (1998): New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. In: *J. Mol. Biol.* 276 (1), S. 19–42.
- Lucius, Richard; Loos-Frank, Brigitte (2008): *Biologie von Parasiten*. 2. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. (1997a): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* 389 (6648), S. 251–260.
- Luger, K.; Richmond, T. J. (1998): The histone tails of the nucleosome. In: *Curr. Opin. Genet. Dev* 8 (2), S. 140–146.
- Luger, K.; Rechsteiner, T. J.; Richmond, T. J. (1999): Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. In: *Methods Mol. Biol.* 119, S. 1–16.
- Luger, K.; Rechsteiner, T. J.; Flaus, A. J.; Waye, M. M.; Richmond, T. J. (1997b): Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. In: *J. Mol. Biol.* 272 (3), S. 301–311.
- Lusser, Alexandra; Kadonaga, James T. (2003): Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. In: *Bioessays* 25 (12), S. 1192–1200.
- Marzluff, William F.; Gongidi, Preetam; Woods, Keith R.; Jin, Jianping; Maltais, Lois J. (2002): The human and mouse replication-dependent histone genes. In: *Genomics* 80 (5), S. 487–498.
- Miao, Jun; Fan, Qi; Cui, Long; Li, Junsuo; Li, Jianyong; Cui, Liwang (2006): The malaria parasite *Plasmodium falciparum* histones: organization, expression, and acetylation. In: *Gene* 369, S. 53–65.
- Mota, M. M.; Pradel, G.; Vanderberg, J. P.; Hafalla, J. C.; Frevert, U.; Nussenzweig, R. S. et al. (2001): Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. In: *Science* 291 (5501), S. 141–144.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, S. 263–273.
- Németh, Attila; Längst, Gernot (2004): Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. In: *Brief Funct Genomic Proteomic* 2 (4), S. 334–343.
- Olins, A. L.; Olins, D. E. (1974): Spheroid chromatin units (v bodies). In: *Science* 183 (4122), S. 330–332.
- Oudet, P.; Gross-Bellard, M.; Chambon, P. (1975): Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. In: *Cell* 4 (4), S. 281–300.
- Pasternak, Noa D.; Dzikowski, Ron (2009): PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (7), S. 1463–1466.
- Paweletz, N. (2001): Walther Flemming: pioneer of mitosis research. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (1), S. 72–75.

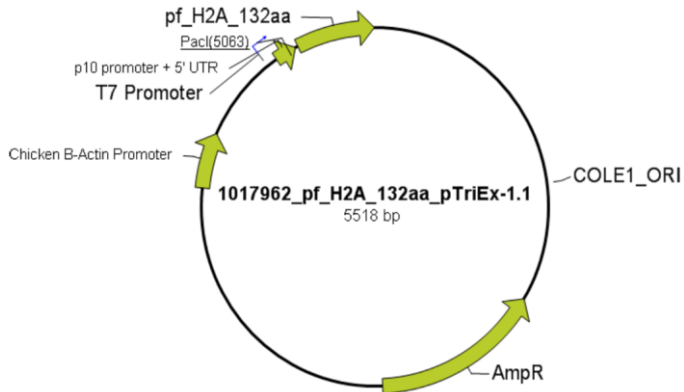
- Pennings, S.; Meersseman, G.; Bradbury, E. M. (1991): Mobility of positioned nucleosomes on 5 S rDNA. In: *J. Mol. Biol* 220 (1), S. 101–110.
- Pham, Chuong D.; He, Xi; Schnitzler, Gavin R. (2010): Divergent human remodeling complexes remove nucleosomes from strong positioning sequences. In: *Nucleic Acids Res* 38 (2), S. 400–413.
- Ponts, Nadia; Harris, Elena Y.; Prudhomme, Jacques; Wick, Ivan; Eckhardt-Ludka, Colleen; Hicks, Glenn R. et al. (2010): Nucleosome landscape and control of transcription in the human malaria parasite. In: *Genome Res* 20 (2), S. 228–238.
- Prudêncio, Miguel; Rodriguez, Ana; Mota, Maria M. (2006): The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. In: *Nat. Rev. Microbiol* 4 (11), S. 849–856.
- Ralph, Stuart A.; Scheidig-Benatar, Christine; Scherf, Artur (2005): Antigenic variation in Plasmodium falciparum is associated with movement of var loci between subnuclear locations. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (15), S. 5414–5419.
- Ramakrishnan, V. (1995): The histone fold: evolutionary questions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (25), S. 11328–11330.
- Richards, B. M.; Pardon, J. F. (1970): The molecular structure of nucleohistone (DNH). In: *Exp. Cell Res* 62 (1), S. 184–196.
- Richmond, Timothy J.; Davey, Curt A. (2003): The structure of DNA in the nucleosome core. In: *Nature* 423 (6936), S. 145–150.
- Rippe, Karsten; Schrader, Anna; Riede, Philipp; Strohner, Ralf; Lehmann, Elisabeth; Längst, Gernot (2007): DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (40), S. 15635–15640.
- Schein, C. H. (1993): Solubility and secretability. In: *Curr. Opin. Biotechnol* 4 (4), S. 456–461.
- Scherf, Artur; Lopez-Rubio, Jose Juan; Riviere, Loïc (2008): Antigenic variation in Plasmodium falciparum. In: *Annu. Rev. Microbiol* 62, S. 445–470.
- Schiessel, H.; Widom, J.; Bruinsma, R. F.; Gelbart, W. M. (2001): Polymer reptation and nucleosome repositioning. In: *Phys. Rev. Lett* 86 (19), S. 4414–4417.
- Schones, Dustin E.; Cui, Kairong; Cuddapah, Suresh; Roh, Tae-Young; Barski, Artem; Wang, Zhibin et al. (2008): Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. In: *Cell* 132 (5), S. 887–898.
- Schwartz, Schraga; Meshorer, Eran; Ast, Gil (2009): Chromatin organization marks exon-intron structure. In: *Nat. Struct. Mol. Biol* 16 (9), S. 990–995.
- Shrader, T. E.; Crothers, D. M. (1989): Artificial nucleosome positioning sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86 (19), S. 7418–7422.
- Shrader, T. E.; Crothers, D. M. (1990): Effects of DNA sequence and histone-histone interactions on nucleosome placement. In: *J. Mol. Biol.* 216 (1), S. 69–84.
- Smith, M. M. (1991): Histone structure and function. In: *Curr. Opin. Cell Biol* 3 (3), S. 429–437.
- Stockdale, Chris; Flaus, Andrew; Ferreira, Helder; Owen-Hughes, Tom (2006): Analysis of nucleosome repositioning by yeast ISWI and Chd1 chromatin remodeling complexes. In: *J. Biol. Chem.* 281 (24), S. 16279–16288.

- Strohner, Ralf; Wachsmuth, Malte; Dachauer, Karoline; Mazurkiewicz, Jacek; Hochstatter, Julia; Rippe, Karsten; Längst, Gernot (2005): A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. In: *Nat. Struct. Mol. Biol* 12 (8), S. 683–690.
- Subramanya, H. S.; Bird, L. E.; Brannigan, J. A.; Wigley, D. B. (1996): Crystal structure of a DExx box DNA helicase. In: *Nature* 384 (6607), S. 379–383.
- Sullivan, William J.; Monroy, M. Alexandra; Bohne, Wolfgang; Nallani, Karuna C.; Chrivia, John; Yaciuk, Peter et al. (2003): Molecular cloning and characterization of an SRCAP chromatin remodeling homologue in *Toxoplasma gondii*. In: *Parasitol. Res* 90 (1), S. 1–8.
- Talbert, Paul B.; Henikoff, Steven (2010): Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 11 (4), S. 264–275.
- Teif, Vladimir B.; Rippe, Karsten (2009): Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities. In: *Nucleic Acids Res.* 37 (17), S. 5641–5655.
- Templeton, Thomas J.; Iyer, Lakshminarayan M.; Anantharaman, Vivek; Enomoto, Shinichiro; Abrahante, Juan E.; Subramanian, G. M. et al. (2004): Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. In: *Genome Res* 14 (9), S. 1686–1695.
- Thoma, F.; Koller, T.; Klug, A. (1979): Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. In: *J. Cell Biol* 83 (2 Pt 1), S. 403–427.
- Thomas, J. O.; Butler, P. J. (1977): Characterization of the octamer of histones free in solution. In: *J. Mol. Biol* 116 (4), S. 769–781.
- Tsukiyama, Toshio (2002): The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 3 (6), S. 422–429.
- Voss, Till S.; Tonkin, Christopher J.; Marty, Allison J.; Thompson, Jennifer K.; Healer, Julie; Crabb, Brendan S.; Cowman, Alan F. (2007): Alterations in local chromatin environment are involved in silencing and activation of subtelomeric var genes in *Plasmodium falciparum*. In: *Mol. Microbiol* 66 (1), S. 139–150.
- Waller, R. F.; Keeling, P. J.; Donald, R. G.; Striepen, B.; Handman, E.; Lang-Unnasch, N. et al. (1998): Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (21), S. 12352–12357.
- Weiler, K. S.; Wakimoto, B. T. (1995): Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. In: *Annu. Rev. Genet* 29, S. 577–605.
- Weischet, W. O. (1979): On the de novo formation of compact oligonucleosomes at high ionic strength. Evidence for nucleosomal sliding in high salt. In: *Nucleic Acids Res* 7 (2), S. 291–304.
- Weischet, W. O.; Tatchell, K.; van Holde, K. E.; Klump, H. (1978): Thermal denaturation of nucleosomal core particles. In: *Nucleic Acids Res* 5 (1), S. 139–160.
- Wells, D.; McBride, C. (1989): A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. In: *Nucleic Acids Res* 17, S. r311-46.
- Westenberger, Scott J.; Cui, Long; Dharia, Neekesh; Winzeler, Elizabeth; Cui, Liwang (2009): Genome-wide nucleosome mapping of *Plasmodium falciparum* reveals histone-rich coding and histone-poor intergenic regions and chromatin remodeling of core and subtelomeric genes. In: *BMC Genomics* 10, S. 610.

- Widom, J. (2001): Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics. In: *Q. Rev. Biophys* 34 (3), S. 269–324.
- Wilson, R. J.; Denny, P. W.; Preiser, P. R.; Rangachari, K.; Roberts, K.; Roy, A. et al. (1996): Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *J. Mol. Biol* 261 (2), S. 155–172.
- Winzeler, Elizabeth Ann (2008): Malaria research in the post-genomic era. In: *Nature* 455 (7214), S. 751–756.
- Woodcock, C. L.; Safer, J. P.; Stanchfield, J. E. (1976): Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence. In: *Exp. Cell Res* 97, S. 101–110.
- Zhou, Y. B.; Gerchman, S. E.; Ramakrishnan, V.; Travers, A.; Muyltermans, S. (1998): Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. In: *Nature* 395 (6700), S. 402–405.
- Zuegge, J.; Ralph, S.; Schmuker, M.; McFadden, G. I.; Schneider, G. (2001): Deciphering apicoplast targeting signals--feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. In: *Gene* 280 (1-2), S. 19–26.

7 Anhang

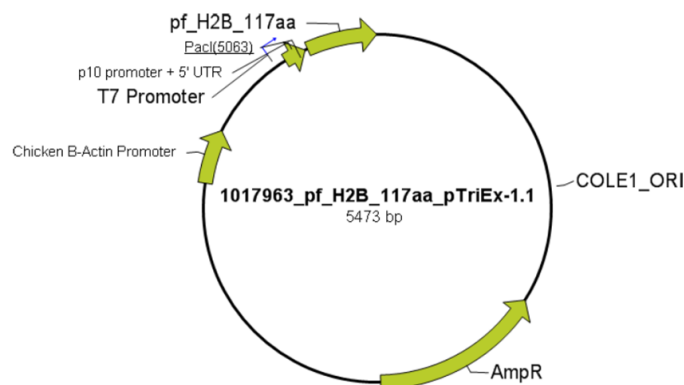
7.1 Nukleotid-Sequenz von pf H2A im Vektor pTriEx-1.1



DNA-Sequenz von pf H2A:

```
CCATGTCAGCAAAGGCCAAAACAGGGCGTAAAAAAGCGTCCAAAGGCACCAGCAATTCGGCAAAGC
GGGTCTGCAGTTCAGTAGGGCGTATCGGTCGTTATCTGAAAAAAGGAAAATATGCCAAACGTGTG
GGGGCAGGAGCACCAGTTTATCTGGCGGCAGTTCTGGAGTATCTGTGTGCCGAGATCCTGGAGCTG
GCAGGCAATGCTGCTCGTGACAACAAAAATCCCGTATCACCCCTCGTCATATCCAACCTGGCGGTTT
GTAATGATGAAGAGCTGAACAAATTCCTGGCGGGTGTGACATTTGCTAGTGGTGGTGTACTGCCTAAC
ATCCACAATGTCCTGCTGCCAAAAAATCCCAGCTGAAAGCAGGCACCGCTAATCAGGATTATTGATA
```

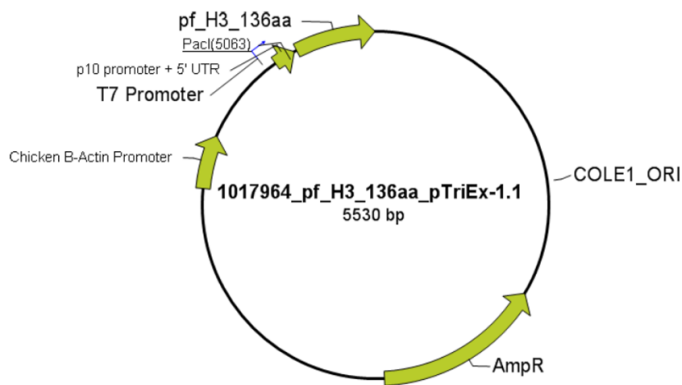
7.2 Nukleotid-Sequenz von pf H2B im Vektor pTriEx-1.1



DNA-Sequenz von pf H2B:

```
CCATGGTCAGCAAACCGGCCAAAGCGAAAAAACAGGAACAGGTCCAGACGGCAAACAAAAACG
TAAAAAAGCCGCTATGACTCCTATGGGCTGTATATCTTCAAAGTTCTGAAACAAGTTCACCCGGATAC
CGGAATTTCTCGTAAAAGCATGAATATTATGAACAGCTTTCTGGTGGACACCTTCGAAAAAATTGCCAC
CGAAGCATCTCGCCTGTGTAAATATACCCGCCGTGATACACTGAGTTCCTCGTAAATCCAAACCGCCA
TTCGCCTGGTTCTGCCTGGTGTGAGCTGGCTAAACACGCCGTTAGTGAAGGCACAAAAGCGGTGCGCAA
ATTCACGAGCAAATGATA
```

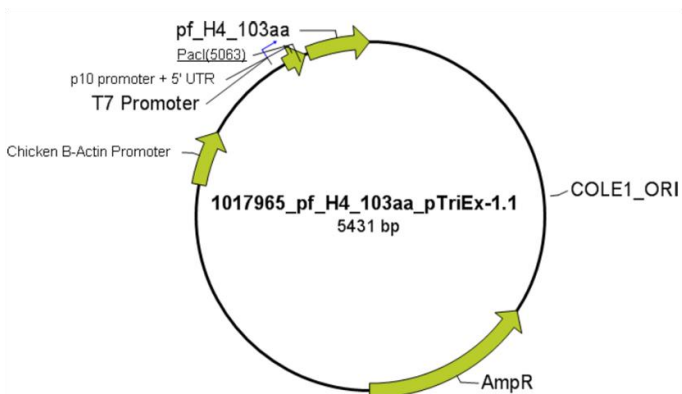

7.3 Nukleotid-Sequenz von pf H3 im Vektor pTriEx-1.1



DNA-Sequenz von pf H3:

```
CCATGGCTCGTACAAAACAAACCGCCCGTAAAAGCACAGCAGGCAAAGCTCCTCGTAAACAACCTGGC
ATCCAAAGCAGCCCGTAAAAGCGCTCCGATTTTCAGCAGGCATCAAAAAACCTCACCGCTATCGTCCT
GGTACTGTTGCACTGCGTGAGATCCGTCGTTATCAGAAAAGCACCGATCTGCTGATCCGTAAACTGC
CGTTTCAACGTCTGGTTCGTGAGATTGCTCAGGATTATAAAACCGACCTGCGTTTTTCAGTCATCTGCC
GTGATGGCACTGCAGGAAGCAGCCGAAGCATATCTGGTTGGCCTGTTTGAGGATACGAATCTGTGTG
CTATTCACGCCAAACGTGTGACCATTATGCCGAAAGACATCCAGCTGGCACGCCGTATTCGTGGTGA
ACGTTCTTGATA
```

7.4 Nukleotid-Sequenz von pf H4 im Vektor pTriEx-1.1



DNA-Sequenz von pf H4:

```
CCATGTCTGGTCGTGGAAAAGGCGGTAAAGGGCTGGGCAAAGGTGGGGCTAAACGTCATCGTAAAAT
CCTGCGTGATAACATTCAAGGCATTACAAAACCGCCATTCGTCGTCTGGCTCGCCGTGGTGGAGTG
AAACGTATTAGTGGCCTGATCTATGAGGAGATCCGTGGAGTTCTGAAAAGTGTTCCTGGAAAACGTGAT
TAAAGACAGCATCATGTATACAGAGCACGCCAAACGTAAAACCGTTACGGCCATGGATATCGTGTATT
CCCTGAAACGCCAAGGTCGTACCCTGTATGGCTTTGGTGGTTGATA
```

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allen voran bei Prof. Dr. Gernot Längst für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und seine fortwährende Unterstützung und Betreuung, sowohl während meiner Zeit im Labor, als auch beim Erstellen dieser Arbeit, bedanken. Des Weiteren bedanke ich bei Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls von Prof. Dr. Herbert Tschochner, für die Hilfsbereitschaft und nette Atmosphäre, insbesondere bei allen Mitgliedern der AG-Längst: Regina Gröbner-Ferreira, Elisabeth Silberhorn, Julia Rothammer, Claudia Huber, Thomas Gross, Sarah Diermeier, Jana Stanurova, Dr. Helen Hoffmeister, Dr. Laura Manelyte sowie Dr. Attila Nemeth, Thomas Schubert, Michael Filarsky und Karina Zillner aus dem „oberen Labor“.

Liebe Regina, vielen Dank für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, die Vorarbeit und die vielen guten Tipps bei Problemen mit den Proteinen. Liebe Elisabeth, vielen Dank an dich für die ständige Problemsuche mit unseren Remodeling-Maschinen, für lustige Momente im Labor und die vielen praktischen Tipps fürs Leben.

Mein Dank gilt insbesondere auch Claudia für die Hilfe im Umgang mit der Äkta und Julia für die nette Zusammenarbeit und Freundschaft innerhalb und außerhalb des Labors.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, für die Ermöglichung der Uni-Auszeit für die Arbeit im Labor und die ständige Unterstützung sowie bei Moriz, der immer für mich da ist und so manchen Rückschlag im Labor mit auffangen musste.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum, Unterschrift